

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 159882 B



(21) Patentansøgning nr.: 3250/88

(51) Int.Cl.⁵ C 12 N 9/20

(22) Indleveringsdag: 15 jun 1988

(24) Løbedag: 16 okt 1987

(41) Alm. tilgængelig: 15 jun 1988

(44) Fremlagt: 24 dec 1990

(86) International ansøgning nr.: PCT/DK87/00127

(86) International indleveringsdag: 16 okt 1987

(85) Videreførelsesdag: 15 jun 1988

(83) Deponering af mikroorganismer Udlev.t.exp.

(30) Prioritet: 17 okt 1986 DK 4966/86 28 sep 1987 DK 5072/87

(71) Ansøger: *Novo Nordisk A/S; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK

(72) Opfinder: Michiyo *Ishii; JP

(74) Fuldmægtig: -

(54) **Termostabilt positions-uspecifikt lipasepræparat og fremgangsmåde til fremstilling heraf**

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

3250-88

Hidtil ukendt lipase fra Candida sp. er positions-uspecifik og mere termostabil end tidligere kendte Candida-lipaser. Den er nyttig i opløselig eller immobiliseret form til omestring, esterhydrolyse og estersyntese ved 60°C eller derover.

DK 159882 B

Opfindelsen angår et hidtil ukendt positions-uspecifikt lipasepræparat med forbedret termostabilitet i opløselig og immobiliseret form og en fremgangsmåde til fremstilling deraf.

5 Følgende definitioner af de understregede ord skal gælde i denne beskrivelse med krav.

Ved lipase skal forstås et enzym som katalyserer reaktioner, hvori indgår esterbindinger (såsom hydrolyse, syntese og udbytning af esterbindinger) i vandopløselige
10 carboxylsyreestere.

Immobiliseret lipase betegner lipase i form af et immobiliseret enzym eller immobiliserede celler, som defineret i "Guidelines for the Characterization of Immobilized Biocatalysts" (1983), Enzyme Microb. Technol., 5, 304-307.
15 Deriveret lipase betegner lipase, der er blevet kemisk modificeret uden immobilisering. Opløselig lipase betegner umodificeret lipase, der hverken er immobiliseret eller deriveret.

En positions-specifik lipase (eller for kortheds skyld specifik lipase) er en lipase, der fortrinsvis reagerer
20 med fedtsyregrupperne i 1- og 3-stillingen af et triglyceridmolekyle, og en positions-uspecifik lipase (eller for kortheds skyld uspecifik lipase) er en lipase, der reagerer ved nogenlunde samme hastighed med alle tre fedtsyregrupper af et triglycerid.

25 Mange forskellige typer lipaser af mikrobiel oprindelse (både intracellulære og extracellulære), såvel som af plante- og animalsk oprindelse er kendte. For en generel redegørelse for extracellulære mikrobielle lipaser, se A. R. Macrae, s. 225ff i Microbial Enzymes and Biotechnology (Ed.
30 W. Fogarty), ISBN 0-85334-185-0, Applied Science Publishers Ltd., 1983.

Uspecifikke lipaser fra følgende mikrobielle kilder er kendte: Staphylococcus aureus (Vadehra, D.V. (1974). Lipids, 9, 158); Penicillium cyclopium (Okumura, S., et al.

(1976). Agricultural and Biological Chemistry, 40, 655 og Renshaw E.C. og San Clemente C.L. (1966) Developments in Industrial Microbiology, 8, 214), Corynebacterium acnes (Hassing, G.S. (1971). Biochimica et Biophysica Acta, 242, 381 og Pablo G. (1974) The Journal of Investigative Dermatology, 63, 231), Propionibacterium acnes (Ingham, E. et al. (1981). Journal of General Microbiology, 124, 393), Candida cylindracea (også kendt som C. rugosa) (Benzonana, G. & Esposito, S. (1971). Biochimica et Biophysica Acta, 231, 15; og Kimura Y. (1983) Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 17, 107), Candida curvata (D. Montet et al. (1985), Fette Seifen Anstrichmittel, 87, 181). Dog viser dataene i den nævnte litteratur og i et eksempel i denne beskrivelse, at alle disse lipaser har en utilstrækkelig termostabilitet ved lang tids brug ved ca. 60°C eller derover. Også S. aureus, C. acnes og P. acnes mistænkes for eller er bevist værende patogene.

Lipase fra Geotrichum candidum (Jensen R.G. (1974) Lipids, 9, 149; Jensen R.G. et al. (1972) Lipids, 7, 738; og Tsujisaka Y. og Iwai M. (1984) Kagaku til Kogyo, 58, 60) er positions-uspecifik, men er overordentlig specifik for visse umættede fedtsyregrupper. Desuden er den ikke termostabil.

Desuden er lipaser fra Humicola lanuginosa (Liu, W.H., Beppu, T. & Arima, K. (1973). Agricultural and Biological Chemistry, 37, 1349) og Chromobacterium viscosum (Sugiura, M. & Isobe, M. (1975). Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 23, 1226) blevet beskrevet som uspecifikke. Senere resultater (Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, Vol. 3 (September 1985), s. 200) viser dog, at disse to lipaser faktisk er specifikke. Data i et eksempel i denne beskrivelse viser også, at C. viscosum lipasen er specifik.

Immobiliseret uspecifik lipase er beskrevet i Y. Kimura et al., Eur. J. Microbiol. Biotechnol. (1983) 17:107-112. Lipasen er afledt fra Candida cylindracea, og dataene i

artiklen viser, at den immobiliserede lipase har temperatur-optimum ved ca. 40°C, og der sker en signifikant nedgang i aktiviteten ved 50°C.

Immobiliseret uspecifik lipase og dens anvendelse til tilfældig omestring af fedt er beskrevet i Macrae, A.R. (1983), Journal of the American Oil Chemists' Society (JAOCs), 60, 291. Procestemperaturen var dog kun 40°C. Denne lave temperatur blev sandsynligvis valgt på grund af Candida cylindracea-lipasens ringe termostabilitet.

10 Der foreligger et behov for termostabile, uspecifikke lipaser til behandling af højtsmeltende substrater ved ca. 60°C eller derover uden opløsningsmiddel, f.eks. til randomisering af fedt i margarineindustrien. Der kan henvises til A.R. Macrae og R.C. Hammond: "Present and Future Applications of Lipases", Biotechnology and Genetic Engineering
15 Reviews, 3, 193-217 (1985). Kendte præparater er ikke tilstrækkelige varmemestabile, og det er formålet med opfindelsen at tilvejebringe et uspecifikt lipasepræparat, der er termostabil nok til langtids brug ved 60°C eller derover i
20 opløselig eller immobiliseret form. Lipasen bør være mikrobiel, da disse kan fremstilles på den billigste måde.

Vi har overraskende fundet, at et antal arter tilhørende slægten Candida danner hidtil ukendte uspecifikke lipaser. Disse hidtil ukendte lipaser er overraskende mere
25 varmemestabile i opløselig eller immobiliseret form end enhver anden tidligere kendt uspecifik lipase, inklusive lipase fra C. curvata og C. rugosa (C. cylindracea).

Opfindelsen angår således et termostabilt positions-uspecifikt Candida lipase-præparat, hvilket
30 præparat er ejendommelig ved, at det omfatter en lipase, der er afledt fra en stamme af C. antarctica, C. tsukubaensis, C. auriculariae, C. humicola eller C. foliorum, og at lipasens restaktivitet efter 60 minutters inkubation ved 70°C i 0,1 M citrat-phosphat-puffer ved pH 6,5 er over 10%, fortrinsvis
35 over 50% og mest for-trinsvis over 80%.

Opfindelsen angår endvidere en fremgangsmåde til fremstilling af et sådant positions-uspecifikt lipasepræparat, der er ejendommelig ved, at den omfatter dyrkning af en stamme af Candida antarctica, C. tsukubaensis, C. auriculariae, C. humicola eller C. foliorum under 5 aerobe betingelser i et næringsmedium indeholdende assimilerbare kilder af kulstof, kvælstof og phosphor, hvorefter man fortrinsvis udvinder lipasen fra gæringsvæsken.

Mikroorganismer

- 10 Lipasepræparatet ifølge opfindelsen kan fremstilles ved dyrkning af stammer tilhørende slægten Candida Gruppe I som defineret af N.J.W. Kreger van Rij: The Yeasts, a Taxonomic Study tredje reviderede og udvidede udgave, Elsevier, Amsterdam (1984). Gruppe I omfatter de basidio-
15 mycete anamorfer af Candida. Arter der anvendes ifølge opfindelsen er C. antarctica (Goto et al.) Kurtzman et al., C. tsukubaensis, C. auriculariae, C. humicola eller C. foliorum, som defineret i omtalte bog. Det bemærkes, at C. antarctica endvidere er beskrevet under synonymerne
20 Sporobolomyces antarcticus Goto et al., Sterigmatomyces aphidis Henninger & Windisch og Trichosporon oryzae Ito et al., og at C. auriculariae er blevet beskrevet under synonymet Torulopsis auriculariae.

Foretrukne Candida-stammer er de, der danner uspecifisk lipase, som viser immunokemisk identitet med én eller 25 flere af de i det følgende eksemplificerede lipaser.

Foretrukne stammer inkluderer følgende tre stammer af C. antarctica, som er deponeret hos Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM) under Budapesttraktatens bestemmelser:

<u>Deponeringsnr.</u>	<u>Deponeringsdato</u>
DSM 3855	29. sep 1986
DSM 3908	8. dec 1986
DSM 3909	8. dec 1986

5 De foretrukne stammer omfatter endvidere nedenstående stammer, som er frit tilgængelige for offentligheden fra Centralbureau voor Schimmelculturen (CBS), American Type Culture Collection (ATCC), Agricultural Research Culture Collection (NRRL) og Institute of Fermentation, Osaka (IFO)

10 med nedenfor angivne deponeringsnr:

	<u>C. antarctica:</u>	CBS 5955, ATCC 34888, NRRL Y-8295 (type-stamme)
	<u>C. antarctica:</u>	CBS 6678, ATCC 28323
	<u>C. antarctica:</u>	CBS 6821, NRRL Y-7954
15	<u>C. tsukubaensis:</u>	CBS 6389, ATCC 24555, NRRL Y-7792 (type-stamme)
	<u>C. auriculariae:</u>	CBS 6379, ATCC 24121, IFO 1580 (type-stamme)
20	<u>C. humicola:</u>	CBS 571, ATCC 14438, IFO 0760 (type-stamme)
	<u>C. humicola:</u>	CBS 2041, ATCC 9949, NRRL Y-1266, IFO 0753
	<u>C. humicola:</u>	IFO 1527
	<u>C. foliorum:</u>	CBS 5234, ATCC 18820 (typestamme)

Som ovenfor angivet fandt man, at typestammer fra

25 alle fem foretrukne Candida-arter frembringer lipaser, der kan indgå i lipasepræparatet ifølge opfindelsen.

Termostabilitet

Lipaserne, der anvendes i præparatet ifølge opfindelsen har god termostabilitet i opløselig og

30 immobiliseret form. Lipaser fra C. antarctica, C.

auriculariae og C. tsukubaensis er foretrukne, og lipaser, der af afledt fra C. antarctica, er specielt foretrukne på grund af deres høje termostabilitet.

For nogle af lipasepræparaterne ifølge opfindelsen
5 fremgår det af de nedenfor anførte eksempler, at de under varmebehandling i starten taber aktivitet rimeligt hurtigt, men at aktiviteten, der er tilbage efter en vis tid, er meget stabil overfor videre varmebehandling. Dette kan skyldes tilstedeværelsen af to eller flere lipaser med forskellig
10 termostabilitet og/eller tilstedeværelsen af varmelabil protease og/eller tilstedeværelsen af en begrænset mængde af lipasestabiliserende bestanddele.

Varmebehandling af C. antarctica lipase, f.eks. 1-3 timer ved 60°C, resulterer i et særligt termostabilt lipase-
15 præparat.

C. antarctica stammen, der er anvendt i denne opfindelse, kan dyrkes i et næringsmedium indeholdende assimilerbare kulstof- og nitrogenkilder sammen med andre essentielle næringsstoffer, idet mediet er sammensat efter de i tek-
20 nikken kendte retningslinier.

Egnede kulstofkilder kan være kulhydrater, lipider og andre estere. Egnede nitrogenkilder kan være uorganiske (f.eks. nitrat eller ammoniumsalte) eller organiske (f.eks. gærekstrakt, majsstøbevand, sojamel, bomuldsfrøkage eller
25 majs gluten).

pH i mediet kan være 3,5 - 9,5, fortrinsvis 5,5 - 8,5. Gæringstemperaturer kan være 15-40°C, fortrinsvis 20-34°C.

Efter gæring kan flydende enzymkoncentrater
30 fremstilles ved at fjerne groft materiale fra væsken og om ønsket koncentreret ved fordampning ved lav temperatur eller ved omvendt osmose. Til sidst kan konserveringsmidler tilsættes koncentratet.

Enzympræparater i fast form kan fremstilles af den oprensede og/eller koncentrerede væske ved fældning med salte, såsom Na_2SO_4 eller med vandblandbare opløsninger, såsom ethanol eller acetone; væsken kan også afvandes ved egne-
5 de tørringsmetoder såsom spraytørring.

Deriveret (kemisk modificeret) lipase kan fremstilles ved enhver kendt fremgangsmåde. Et eksempel er polyethylenglycol (PEG) modificering, beskrevet i Matsushima A. et al. (1986), Biotechnology Letters, 8, 72-78.

10 Det har vist sig, at C. antarctica lipase indeholder to lipasebestanddele A og B. Der vil blive redegjort for hver deres egenskaber og anvendelse senere i denne beskrivelse.

Oprensat lipase A og B kan fremstilles af lipase
15 efter gæring, f.eks. ved gelfiltrering.

Endvidere kan gensplejsningsteknologi anvendes til selektivt at overføre gener, der koder for lipase A og B. En foretrukken fremgangsmåde til dette vil blive beskrevet i det følgende.

20 Lipase A er den mest termotabile, og lipase B er mere alkali-resistent end A, så behandling ved høje temperaturer eller høj pH kan anvendes til at opnå et præparat, der hovedsageligt indeholder henholdsvis lipase A eller B.

Lipase A har en molekylvægt på 43 kD og et isoelektrisk punkt på $8,0 \pm 0,2$. Lipase B har MW på 33 kD og pI på $6,0 \pm 0,2$.
25

De foretrukne lipaser, der kan anvendes i præparatet ifølge opfindelsen udviser immunologisk identitet med en lipase fra en af de ovennævnte Candida-arter, især fra
30 en af de ovennævnte stammer, og især lipase A eller B fra DSM 3855.

De mest foretrukne lipaser har både immunologisk identitet og identisk molekylvægt med en af disse lipaser.

Fremstilling af antiserum til anvendelse i immunologiske forsøg er beskrevet i kapitel 41 af N.H. Axelsen: Handbook of Immunoprecipitation-in-Gel Techniques (Blackwell Scientific Publications, 1983).

5 Immunologisk identitet og molekylvægt af proteiner kan bestemmes ved SDS-polyacrylaid-gel-elektroforese (SDS-PAGE) (f.eks. i henhold til Novo analysemetode AF 217-GB) efterfulgt af immunoblotting ifølge J. Hald et al., Journal of Reproductive Immunology, vol. 10, side 15-26
10 (1987).

Monospecifik antiserum fra kanin, der er rejst mod oprenset lipase A fra DSM 3855 (fra eksempel 7) blev anvendt til immunoblotting af SDS-PAGE ved den ovenfor anførte fremgangsmåde for at undersøge følgende lipaser:

- 15 - C. antarctica: 0,2 OU opløsning af pulver fremstillet som i eksempel 3
- C. tsukubaensis: 0,2 OU opløsning af pulver fra eksempel 5
 - C. auriculariae: 0,1 OU opløsning af pulver fra eksempel 6
 - C. humicola: 0,75% opløsning af pulver fra eksempel 6B
- 20 - C. foliorum: 3% opløsning af pulver fra eksempel 6A

C. antarctica lipasen udviste et stærkt bånd, og C. tsukubaensis og C. humicola lipaserne udviste svage bånd i 43 kD-stillingen, dvs. de frembringer en lipase, som er immunologisk identisk med lipase A fra C. antarctica, og som har
25 den samme molekylvægt. Der blev ikke bemærket nogle bånd for C. auriculariae og C. foliorum lipase.

Identitetsforsøgene kan endvidere udføres med den velkendte Ouchterlony dobbelt immunodiffusionsmetode eller ved tandem krydset immuno-elektroforese i henhold til kapitel
30 5 og 14 fra den ovennævnte bog af N.H. Axelsen.

Gensplejsningsteknik kan anvendes for at opnå et højere udbytte af lipase eller for at frembringe en enkelt lipasebestanddel, såsom ovenfor angivne lipase A eller B fra C. antarctica, i godt udbytte.

5 En foretrukken fremgangsmåde anvender en Aspergillus-stamme som værten og omfatter følgende trin:

- (a) tilvejebringelse af en egnet rekombinant DNA-kloningsvektor omfattende DNA-sekvenser, der koder for funktioner, der letter genudtrykkelsen, og en DNA-sekvens, der
10 koder for Candida lipase;
- (b) transformering af en egnet værtsorganisme med kloningsvektoren fra trin (a); og
- (c) dyrkning af den transformerede vært i et egnet dyrkningsmedium og om ønsket udvinding af lipasen fra dyrk-
15 ningsmediet.

Det er specielt foretrukket at anvende A. oryzae som vært, jfr. europæisk patentskrift nr. EP 0,238,023.

Fremgangsmåde til immobilisering

Lipaser kan immobiliseres ved enhver kendt
20 fremgangsmåde, se f.eks. K. Mosbach (ed.): Methods in Enzymology 44, "Immobilized Enzymes", Academic Press, New York (1976). Tilgængelige fremgangsmåder til immobilisering af enzymer inkluderer: krydsbinding af homogeniserede celler, kovalent binding til uopløselige uorganiske og organiske
25 bærere, gelentrapment og adsorption på ionbyttere eller andet adsorberende materiale. Endvidere kan coatning på en partikelformet bærer anvendes, som beskrevet i Macrae A.R. og Hammond R.C. (1985), Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 3, 193.

En foretrukken immobiliseringsmetode anvender en partikelformet, makroporøs harpiks. Lipasen kan helt enkelt adsorberes på harpiksen, eller den kan bindes til harpiksen ved krydsbinding med glutaraldehyd eller andre kendte kryds-
5 bindingsmidler.

En foretrukken harpikstype er en svagt basisk anionbytter, f.eks. af acryl-, polystyren- eller phenol-formaldehyd-typen. Eksempler på kommercielle produkter er Lewatit® E 1999/85 (produkt fra Bayer, Vesttyskland) og
10 Duolite® ES-568 (Rohm & Haas). Immobilisering på denne type harpiks er fortrinsvis beskrevet i europæisk patentskrift nr. EP 0 140 542.

En anden foretrukken harpikstype er en adsorberende harpiks af phenol-formaldehyd-typen. Immobilisering på denne
15 harpiks udføres fortrinsvis som beskrevet i DK B153762, som der herved henvises til.

Endnu en foretrukken harpikstype er adsorberende harpiks af acryltypen. Et eksempel på et kommercielt produkt er Lewatit® E2001/85 (produkt fra Bayer).

20 En anden foretrukken immobiliseringsmetode anvender et uorganisk bærermateriale, og lipasen er fortrinsvis fastgjort til bæreren ved adsorption eller kovalent binding. Sådanne bærermaterialer og fremgangsmåder til immobilisering er beskrevet i K. Mosbach (ed.): Methods in Enzymology, 44,
25 "Immobilized Enzymes" (Academic Press, 1976).

Lipasepræparatet ifølge opfindelsen kan anvendes i enhver af nedenstående fremgangsmåder (reaktanterne er angivet i parentes):

- Esterhydrolyse (ester + vand)
- 30 - Estersyntese (syre + alkohol)
- omestring, der inkluderer:

- Acidolyse (ester + syre)
- Alkoholyse (ester + alkohol)
- esterudveksling eller transesterificering (ester + ester)

Alkoholen kan være mono- eller polyvalent primær 5 og/eller sekundær alkohol eller en blanding deraf. Syren kan være enhver carboxylsyre eller en blanding deraf. Esteren kan være enhver ester, der er afledt fra før omtalte alkohol og syre eller en blanding af disse.

Figur 1, 2 og 3 viser pH-aktivitetskurverne for lipaser fra 10 henholdsvis C. antarctica, C. tsukubaensis og C. auriculariae. Detaljer gives i eksempel 16.

Figur 4 viser pH-aktivitetskurverne for C. antarctica lipase A og B. Detaljer gives i eksempel 10.

Figur 5 og 6 viser resultaterne af henholdsvis acidolyse og 15 transesterificering med immobiliseret C. antarctica lipase ved forskellige temperaturer. Detaljer gives i eksempel 30.

Figur 7 og 8 viser resultaterne af syntese af myristinsyre- 20 ester med immobiliseret C. antarctica lipase, hvor henholdsvis n-propanol og isopropanol anvendes. Detaljer gives i eksempel 35.

Figur 9 og 10 viser resultaterne af henholdsvis kontinuerlig acidolyse og transesterificering med immobiliseret C. antarctica lipase. Detaljer gives i eksempel 36 og 39.

Bestemmelse af aktiviteten af opløselig lipase (LU og OU)

25 Der anvendes to metoder. Den første metode er baseret på hydrolyse af tributyrin i en pH-stat. 1 LU (lipaseenhed) er mængden af enzym, som frigør 1 μ mol titrer-

bar smørsyre pr. minut ved 30°C, pH 7,0 med gummi arabicum som emulgeringsmiddel. Yderligere detaljer gives i Novo analytiske metode AF 95/5, der efter anmodning kan rekvireres.

Målinger af aktivitet i lipaseenheder ved hydrolyse af olivenolie (OU) udføres som følger: 1 ml enzymopløsning, 5 ml emulsion (25 ml olivenolie og 75 ml 2% polyvinylalkohol, MW ca. 72.000 emulgeret i en Waring-blender), og 5 ml puffer (50 mM trismaleatpuffer pH 7,0) blandes og inkuberes i et ryste-vandbad ved 40°C i 10 minutter. Reaktionen stoppes ved tilsætning af 20 ml stopreagens (500 ml acetone, 500 ml ethanol og 11 ml 1 N NaOH). Prøven og en blindprøve (stopreagens tilsættes før emulsionen) titreres til pH 9,2 med 0,05 N NaOH. Aktiviteten (OU) beregnes ud fra forskellen i titreret NaOH mellem prøven og blindprøven og udtrykkes som 1 µm fri-15 gjort fri fedtsyre pr. minut.

Uspecificitet af opløselig lipase

Dette kan bestemmes ved kort tids hydrolyse af triglycerid og analyse af de fremkomne diglycerider (DG). En specifik lipase vil næsten udelukkende danne 1.2-DG, hvorimod 20 en uspecifik lipase vil give et betydeligt indhold af 1.3-DG i DG-fraktionen. Tiden for hydrolyse og viderebehandling skal være kort for at undgå, at acyl-grupperne skifter plads.

Mere specifikt udføres målingerne som følger: 250 µl enzymopløsning (4-100 OU/ml), 250 µl Trismaleatpuffer, pH 25 7,0, and 500 µl substrat (triolein: 2% polyvinylalkohol, MW 72.000; 1:3) blandes i et Eppendorf centrifugerør og rystes i 30-90 minutter ved 42°C. Reaktionen stoppes ved at iblande 10 ml CHCl₃ (0,2% lithocholinsyre kan anvendes som en intern standard). CHCl₃ tørres med Na₂SO₄. 1 µl dryppes på en 30 tyndt-lags-chromatografipind (Chromarod Type S II, Newman-Howell Associates ltd) og fremkaldes i 20 minutter med hexan/ether/eddikesyre (70:30:1) som opløsningsmiddel. De partielle glycerider bestemmes kvantitativt med et FID analyseapparat (Iatroscan TH 10, Newman-Howell Associates ltd).

Resultater angives som 1.3-DG i % af totale DG. En specifik lipase ville således give 0, og en fuldt uspecifik lipase ville forventes at give ca. 33%.

Acidolyseaktivitet af immobiliseret lipase (B.U, BIU-2)

5 Aktiviteten bestemmes ved at lade palmitinsyre reagere med triolein med eller uden opløsningsmiddel. Total inkorporering af palmitinsyre måles ved FAME-GLC af triglycerid. Inkorporering i 2-stillingen måles ved at behandle triglyceriderne med pankreas-lipase for at hydrolysere 1- og 3-
10 stillingerne, og derefter analysere de fremkomne 2-monoglycerider med FAME-GLC.

FAME-GLC (gas-væske-chromatografi af fedtsyremethylester) kan udføres i henhold til metoderne Ce 2-66 og Ce 1-62, der er offentliggjort af the American Oil Chemists'
15 Society (AOCS).

I tilfælde af reaktion med opløsningsmiddel består reaktionsblandingen af 0,6 g triolein, 0,174 g palmitinsyre og 8,083 g petroleumether. Ved reaktion uden opløsningsmiddel anvendes 3,0 g triolein og 0,87 g palmitinsyre.

20 I begge tilfælde hydratiseres en passende mængde enzym, og inkuberes med ovennævnte reaktionsblanding ved en given temperatur i 1-4 timer og filtreres dernæst for at stoppe reaktionen. Filtratet oprenses på en alumina-søjle, og triglyceriderne analyseres ved FAME-GLC.

25 Separat oprenses triglyceriderne fra 2 ml af filtratet på samme måde på 4 g aktiveret alumina. Ca. 100 mg af triglyceriderne, 3 ml opløsning af pankreas-lipase (250 mg pankreas-lipase grad II fra Sigma cat. no. L3126 opløst i 10 ml 1M trispuffer pH 8), 300 µl 2M CaCl₂ og 0,75 ml 0,2% w/v
30 taurocholat blandes. Emulsionen opvarmes i et vandbad ved 40°C i 2 minutter og blandes på en Whirley-blander i 1 1/2 minut før reaktionen stoppes ved tilsætning af 4 ml 96% ethanol. Prøven overføres til en skilletragt og ekstraheres med 4 x 20 ml diethylether. Etherfasen vaskes 4 gange med 20 ml

deioniseret vand før det tørres med et Na_2SO_4 -filter og fordampes. Prøven genopløses i 1 ml 1.1.1-trichlorethan. Glyceriderne separeres ved præparativ TLC på forcoatet TLC plader silikagel 60 fra Merck (aktiveret 30 minutter ved 110°C) i en
5 godt mættet fremkaldelsesbeholder med diethylether og n-hexan (70:30) som et fremkaldelsesopløsningsmiddel. TLC-processen kører i 40 minutter ved 20°C .

Monoglyceridbåndet identificeres med ioddamp, skrubes af og ekstraheres med 3 x 10 ml diethylether. Ether-
10 fasen filteres, inddampes og prøven methyleres og analyseres med GLC.

En BIU (batch-omeststringsenhed) er mængden af immobiliseret lipase, der inkorporerer palmitinsyre med en initial hastighed af $1 \mu\text{mol}/\text{minut}$ ved den angivne temperatur med
15 eller uden opløsningsmiddel. En BIU-2 (BIU i 2-stillingen) defineres på samme måde udfra inkorporeringen i 2-stillingen.

Transesterificeringsaktivitet af immobiliseret lipase (BTU)

Aktiviteten bestemmes ved at lade en ækvimolær blanding af triolein og tripalmitin reagere. Dannelse af
20 blandede triglycerider (POO, PPO etc.) måles ved HPLC (high-performance liquid chromatography).

Mere specifikt smeltes 0,8855 g triolein (OOO) og 0,8073 g tripalmitin (PPP) (1 mM af hver), og 250 mg enzym (på tørstofbasis) befugt til 10% w/w vand tilsættes. Prøv-
25 erne rystes i vandbad i 15 minutter ved en given temperatur og analyseres dernæst ved HPLC.

HPLC kan udføres i henhold til G.W. Jensen, J. Chromatogr., 204, 407(1981).

En BTU (batch-transesterificeringsenhed) defineres
30 som mængden af immobiliseret lipase, der fremstiller blandet triglycerid med en initial hastighed af $1 \mu\text{mol}/\text{minut}$ ved den angivne temperatur.

Non-Specificitetsindeks af immobiliseret lipase (NSI_1 , NSI_2)

Dette bestemmes bedst ved omestring (f.eks. acidolyse). Måling af udveksling i 2-stillingen indikerer non-specificiteten. To sådanne metoder er anvendt her: NSI_1 -metoden med triolein og palmitinsyre og NSI_2 -metoden med XOX triglycerid (X = palmitin/stearinsyre, O = oliesyre) og laurinsyre. Den bedste metode er NSI_1 , men analysen er meget besværlig. NSI_2 -metoden er lettere at udføre, men resultatet påvirkes af lipasens fedtsyre-specificitet. De to acidolysemetoder er mindre udsat for fejl på grund af acyl-bevægelsen end hydrolysemetoden, der anvendes til opløselig lipase.

Ved NSI_1 -metoden måles BIU og BIU-2, og et indeks beregnes som $NSI_1 = 3 \times BIU-2/BIU$. Dette vil give 0 for en fuldstændig specifik lipase, og give 1 for en uspecifik lipase, der reagerer ens i alle tre stillinger.

Ved NSI_2 -metoden hydratiseres immobiliseret lipase, som nødvendigt til aktivering, sædvanligvis til ca. 10% vand. Nedenstående blanding anvendes:

- 345 mg kakaosmørstearin (solgt af Århusolie A/S, Danmark, og indeholdende ca. 95% XOX triglycerider)
- 480 mg laurinsyre (Merck), 99% ren
- 8,1 g petroleumæther (BDH), kogepunkt 80-100°C
- 250 mg (som tørstof) af den immobiliserede lipase

En blanding af ovennævnte ingredienser inkuberes i et ryste-vandbad i en time og temperatur (i området 40-60°C) som nødvendigt for at opnå en egnet konvertering. Rene triglycerider isoleres dernæst ved alumina-chromatografi, og fedtsyresammensætningen bestemmes ved FAME-GLC.

Et indeks defineres som følger:

$$NSI_2 = 3 \times (\text{nedgang i oliesyre})/(\text{inkorporering af laurinsyre})$$

For at kunne skelne mellem specifik og uspecifik lipase anses en inkorporering af laurinsyre i området 30-65% at være mest egnet.

5 Kulturmedier

Medier med nedenstående sammensætninger anvendtes i eksemplerne. Hvert medium blev autoklaveret ved 121-130°C i 20-90 minutter.

<u>Bestanddele (g/l)</u>	<u>Agar-3</u>	<u>YeDP</u>	<u>YPG-agar</u>	<u>Bou-3</u>
10 Pepton	6	-	-	6
Trypsinnedbrudt casein	4	-	-	4
Gærekstrakt	3	5	4	3
Kødekstrakt	1,5	-	-	1,5
Dextrose	1	20	15	1
15 Agar (Difco)	24	-	20	-
K ₂ HPO ₄	-	-	1	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	0,5	-
Polypepton	-	10	-	-

<u>Bestanddele (g/l)</u>	<u>Cale</u>	<u>Cale-2</u>	<u>Ca4a</u>	<u>YS-4</u>	<u>YS-25</u>
Pharmamedia*	40	40	40	20	-
Gærekstrakt	5	5	5	5	10
Majsstøbevand	-	-	-	40	-
5 Dextrose	3	-	-	3	5
Saccharose	-	3	5	-	-
Sojabønneolie (ml/l)	30	30	30	30	20
K ₂ HPO ₄	5	5	5	5	5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	1	1	1	1
10 Pepton	-	-	-	-	10
Pluronic® L61 (ml/l)	0	0.86	-	-	-
pH	6,2	6,2	6,0	6,5	6,5

* Sammensætningen af Pharmamedia er beskrevet i Traders' Guide to Fermentation Media Formulation, 1980, Traders' Oil 15 Mill Co., s. 50-51.

<u>Bestanddele (g/l)</u>	<u>CG1g</u>	<u>CG4h</u>	<u>Cal9g</u>
Pharmamedia*	20	40	40
Gærekstrakt	5	-	-
Sojabønnepulver	20	-	-
20 Dextrose	5	5	-
Dextrin	-	-	5
Kokosnøddolie	-	5	-
Sojabønneolie (ml/l)	20	-	20
Oleylalkohol	-	-	6
25 K ₂ HPO ₄	5	5	5
(NH ₄) ₂ HPO ₄	-	5	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	1	1
NaNO ₃	-	-	2
Thiamin, HCl (mg/l)	10	-	10
30 Sporstoffer (Difco)			
manual (ml/l)	10	10	10
Pluronic® 60L (10%, ml/l)	3	3	3
Vitaminblanding (ml/l)	-	3	-
pH	-	-	6.0

* Sammensætningen af Pharmamedia er beskrevet i Traders' Guide to Fermentation Media Formulation, 1980, Traders' Oil Mill Co., s. 50-51.

Vitaminblanding:

5 Biotin	2 mg/l
Calciumpantothenat	400 -
Inositol	2.000 -
Nicotinsyre	400 -
Thiamin, HCl	400 -
10 Pyridoxin, HCl	400 -
p-aminobenzoesyre	200 -
Riboflavin	200 -
Folinsyre	10 -

EKSEMPEL 1

15 Fremstilling af lipase fra C. antarctica

En kultur af Candida antarctica stamme DSM 3855 på Agar-3 skrårør blev overført til en 2000 ml rystekolbe med 800 ml Bou-3 medium, og rystet ved 26°C en dag (200 rpm, amplitude ca. 2 cm).

20 Den fremkomne kulturvæske blev anvendt som podedkultur til en 10 l konventionel gæringstank med 7 liter Cale-2 medium.

Gæringsbetingelser var som følger:

Fermentertype: Laboratory fermenter FL 110 fra Biotec AB,

25 Bromma, Sverige.

Beluftning: 6 Nl/min
Omrøring: 520 rpm med en røremaskine med to rotor
hver med seks blade
Temperatur: 26°C
5 pH: Der var ingen kontrol af pH
Tid: 119 timer

Lipaseudbyttet var 157 LU/ml

Kulturvæsken fra gæringstanken blev centrifugeret i 35 minutter ved 4100 rpm ved hjælp af en Sorvall RC-3B 10 centrifuge med en 6000 A rotor. Supernatanten (ialt 5 l) blev koncentreret ved ultrafiltrering (og vasket 5 gange med et volumen vand hver gang) til 600 ml med et Pellicon ultrafiltreringsapparat fra Millipore med en filterplade med en molekylvægtsafskæringsværdi på 10.000. 600 ml 99% kold ethanol 15 blev tilsat til 560 ml af UF-koncentratet og blandingen blev omrørt i 30 minutter ved 4°C efterfulgt af en centrifugering (som ovenfor). 2,5 volumina kold 99% ethanol blev dernæst tilsat til supernatanten fra den første ethanoludfældning. Blandingen blev omrørt i 30 minutter og centrifugeret (som 20 ovenfor). Bundfaldet fra denne centrifugering blev opløst i ca. 230 ml vand og frysetørret, hvilket gav 22 g pulver med 16.200 LU/g

Lipasen blev yderligere oprenset ved brug af hydrofob interaktionschromatografi med ethanoleluering efterfulgt 25 af vacuumtørring, hvilket gav et pulver med ca. 92.000 LU/g.

Sammenligningseksempel 1

Fremstilling af *C. curvata* lipase

Candida curvata stamme CBS 570 (alias ATCC 10567) blev anvendt. CBS betegner Centraalbureau voor Schimmel- 30 cultures, Baarn, Holland, og ATCC betegner American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA. En kultur af denne

stamme på et Agar-3 skrårør (se eksempel 1) blev overført til fire 500 ml rysteflasker med 100 ml Bou-3 medium (se eksempel 1) hver, og rystet ved 26°C 1 dag (200 rpm, amplitude ca. 2 cm).

- 5 Kulturvæsken af Bou-3 rystekolberne blev anvendt som podekultur til podning af tohundrede 500 ml rystekolber, hver med 200 ml LR-15 medium:

Sammensætningen af LR-15 medium var som følger:

<u>Bestanddel</u>	<u>Koncentration</u>
10 Pharmamedia	50 g/l
K_2HPO_4	5 -
$NaNO_3$	1 -
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5 -
Tween-80	20 -

- 15 pH indstillet til 7,0 med HCl
Autoklaveret ved 121°C i 40 minutter.

Tween-80 er Polyoxyethylensorbitanmonooleat (rekvireret fra Merck).

- Hver rystekolbe blev podet med 0,5-2 ml Bou-3
20 kulturvæske og rystet med 200-300 rpm (amplitude ca. 2 cm) ved 26°C i 4 dage.

- Kulturvæsken fra rystekolberne blev samlet sammen ved gæringsafslutningen, hvormed man fik ialt 29,5 l med en lipaseaktivitet på 15 LU/ml. Kulturvæsken blev centrifugeret
25 som beskrevet i eksempel 1, efterfulgt af en koncentrering, også som beskrevet i eksempel 1, men kun vasket to gange med et volumen vand, hvilket gav 3,9 l koncentrat med en lipaseaktivitet på 168 LU/ml.

EKSEMPEL 2Fremstilling af lipase fra *C. antarctica* i pilot plant

En kultur af *Candida antarctica* stamme DSM 3855 blev podet på en Fernbach-kolbe indholdende YPG-agar.

- 5 Fernbach-kolben blev inkuberet i 8 dage ved 26°C før den blev anvendt til at pode en konventionelt omrørt og beluftet podefermenter indeholdende 300 liter medium med nedenstående sammensætning

	Gærekstrakt	3,0 kg
10	KH_2PO_4	0,2 -
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	0,2 -
	Glucose	0,3 -
	Pluronic® 60 L	125 ml
	pH	5,6

- 15 Efter 1 dags gæring ved 26°C blev væsken anvendt til at pode en konventionelt omrørt og beluftet podefermenter indeholdende 300 liter medium med nedenstående sammensætning:

	Gærekstrakt	7,0 kg
	Pharmamedia	56,0 -
20	KH_2PO_4	4,0 -
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	3,0 -
	Saccharose	4,2 -
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,4 -
	Sojabønneolie	42 l
25	Pluronic® 60 L	600 ml
	pH	6,2

Gæringen gennemførtes i 5 dage ved 26°C med 1000 Nl/min beluftning og 200 rpm omrøring. Udbyttet var 82 LU/ml.

Lipasen blev udvundet ved følgende fremgangsmåde:
 1) tromlefiltrering af kulturvæsken, 2) klarfiltrering, 3) koncentrering ved ultrafiltrering, 4) tilsætning af ethanol til 50% w/w, 5) klarfiltrering, 6) koncentrering ved ultrafiltrering, 7) tilsætning af ethanol til 77% w/w, 8) centrifugering, 9) vakuumentørring, 10) genopløsning i vand, 11) diskontinuerlig hydrofob interaktionsoprensning (lipasen blev absorberet på en hydrofob matrix, vasket med vand og fortyndet med 50% w/w ethanol), og 12) fordampning af ethanolet og frysetørring. Det fremkomne pulver havde en aktivitet på 143.000 LU/g.

EKSEMPEL 3

Fremstilling af C. antarctica lipasepulver

Candida antarctica kultur DSM 3855 blev opbevaret på PDA-agar skrårør.

Sammensætning af PDA-agar:

Bacto kartoffeldextroseagar (Difco)	39 g/l
Agar	10 -

Autoklaveret ved 121°C i 20 minutter.

50 rystekolber med Cale medium blev podet fra agar-skrårør og dyrket ved 25°C i 64 timer.

Væsken (46 OU/ml) blev centrifugeret ved maksimalt 4.400 g i 20 minutter. Supernatanten blev koncentreret til 1 liter og afsaltet med 1 liter vand på et Amicon ultrafiltreringsapparat med en HLP 10-20 patron (afskæringsværdi 10.000 MW) og frysetørret. Aktiviteten af pulveret var 4000 OU/g.

EKSEMPEL 4Fremstilling af *C. antarctica* lipase

Kulturer af stammerne DSM 3908 og DSM 3909, opbevaret på PDA-agarskrårør (se eksempel 3) blev overført til 5 rystekolber indeholdende YS-4, YS-25 eller Ca4a medium og dyrket i 2 eller 3 dage ved 25°C. Væskens lipaseaktivitet (OU) blev målt.

Resultater:

	<u>Stamme</u>	<u>Medium</u>	<u>Gæringstid</u>	<u>OU/ml</u>
10 1.	DSM 3908	YS-4	3 dage	8,5
2.	DSM 3908	YS-25	2 -	4,0
3.	DSM 3908	Ca4a	3 -	26,0
4.	DSM 3909	YS-4	3 -	10,5
5.	DSM 3909	YS-25	2 -	5,0
15 6.	DSM 3909	Ca4a	2 -	23,3

EKSEMPEL 5Fremstilling af *C. tsukubaensis* lipase

Candida tsukubaensis kulturen CBS 6389 blev opbevaret på PDA-agarskrårør (sammensætningen af PDA-agar er angivet i eksempel 3).

To YeDP rystekolber blev podet og dyrket i 24 timer ved 25°C.

Denne kultur blev anvendt til at pøde 52 rystekolber med CG-lg medium.

25 Rystekolberne blev dyrket i 4 dage ved 25°C. Væsken blev centrifugeret ved maximum 4.400 g i 20 minutter. Supernatanten (3 l) blev koncentreret til 450 ml og afsaltet med 2

liter vand på et Amicon ultrakoncentreringsapparat med en HLP 10-20 patron og frysetørret, hvorved der fremkom 24 g pulver med 223 OU/g, 135 LU/g.

EKSEMPEL 6

5 Fremstilling af *C. auriculariae* lipase

Candida auriculariae kulturen CBS 6379 blev opbevaret på PDA-agarskrårør.

70 CG4h rystekolber blev podet fra agarskrårør og dyrket ved 25°C i 4 dage.

- 10 Væsken blev centrifugeret ved maksimalt 4.400 g i 20 minutter og maksimalt 12.200 g i 10 minutter. Supernatanten blev koncentreret fra 5,5 l til 950 ml på et Amicon ultrakoncentreringsapparat med en HLP 10-20 patron og frysetørret, hvorved der fremkom 29,1 g pulver med 93 OU/g og 3,4 LU/g.

15 EKSEMPEL 7

Fremstilling af *C. foliorum* lipase

- En kultur af CBS 5234 blev opbevaret på PDA-agarskrårør. 60 rystekolber, hver indeholdende 150 ml CG4h medium, blev podet fra agarskrårørene og blev derefter dyrket 20 i 4 dage ved 25°C.

- 25 Væsken blev centrifugeret ved 4.000 rpm i 25 minutter, og dernæst ved 10.000 rpm i 10 minutter. Supernatanten blev koncentreret fra 6 liter til 550 ml på et Amicon ultrafiltreringsapparat (PlH 10-20), afsaltet med 1 liter deioniseret vand og dernæst frysetørret, hvorved der fremkom 38,4 g pulver med en aktivitet af 275 OU/g eller 313 LU/g.

EKSEMPEL 8Fremstilling af *C. humicola* lipase

CBS 571 blev dyrket på PDA-agarskrårør i 4 dage ved 25°C. En podekultur af YePD medium (sammensætning er angivet i eksempel 5) blev podet fra skrårørene og blev dyrket i 17 timer ved 25°C. 39 rystekolber med YS-4 medium (se eksempel 4) blev podet fra podekulturen og blev dernæst dyrket i 4 dage ved 25°C.

Væsken blev centrifugeret ved 4.000 rpm i 15 minutter, og dernæst ved 12.000 rpm i 15 minutter. Supernatanten (1.300 ml) blev koncentreret på Amicon PIH 10-20 og afsaltet med 4 liter deioniseret vand til et endeligt volumen på 200 ml. Dette blev frysetørret, hvorved der fremkom 10,4 g pulver med en aktivitet af 2.000 OU/g.

15 EKSEMPEL 9Fremstilling af lipase fra 5 *Candida* arter

Hver af de ovenfor angivne stammer blev podet på et PDA-skrårør (se eksempel 3) og dyrket i 3 dage ved 25°C. Cellerne blev dernæst opslået i 9 ml sterilt, deioniseret vand og dyrket i 17-23 timer. 2 til 7 ml af kulturvæsken blev genpodet i rystekolber med Cal9g medium, YS-4 medium eller YS-25 medium (se eksempel 4) og dyrket i 3 dage ved 25°C under rystning. pH og lipaseaktivitet (OU) af væsken blev derefter målt.

Results:

	<u>Art</u>	<u>Stammenr.</u>	<u>Medium</u>	<u>pH</u>	<u>OU/ml</u>
1.	<u>C. antarctica</u>	DSM 3855	Cal9g	7,0	27,8
2.	- -	CBS 5955	Cal9g	6,7	25,3
5 3.	- -	CBS 6678	Cal9g	6,6	25,3
4.	- -	CBS 6821	Cal9g	6,6	46,8
5.	<u>C. tsukubaensis</u>	CBS 6389	Cal9g	7,5	11,8
6.	- -	CBS 6389	YS-4	-	11,8
7.	<u>C. auriculariae</u>	CBS 6379	YS-4	-	0,8
10 8.	<u>C. foliorum</u>	CBS 5234	Cal9g	7,0	7,3
9.	<u>C. humicola</u>	CBS 2041	Cal9g	5,9	15,0
10.	- -	CBS 2041	YS-4	7,7	20,5
11.	- -	CBS 571	Cal9g	-	10,8
12.	- -	CBS 571	YS-4	7,2	38,8
15 13.	- -	IFO 1527	Cal9g	-	1,8

Til sammenligning blev C. curvata CBS 570 dyrket på samme måde med 4 dages dyrkning i YS-25 medium. Aktiviteten var 34,8 OU/g.

EKSEMPEL 10

20 Separation og karakterisering af lipasebestanddelene A og B fra C. antarctica

Delvist oprensede lipaser fra C. antarctica fremkommet som i eksempel 2 blev yderligere oprenset som følger. 1 g af enzympulveret blev suspenderet i 50 mM Tris-acetat pH 6. 1 g DEAE-Sephadex A50 blev kvældet og vasket i 50 mM Tris-acetat pH 6 og blev tilsat til enzymsuspensionen. Blandingen blev omrørt i 1 time ved stuetemperatur og filtreret på en sintret glastragt. Filtratet blev derefter koncentreret

ved ultrafiltrering og dialyseret overfor 20 mM citratpuffer pH 4,5 og påført på CM-Sepharose søjle ækvilibreret med den samme puffer. B-enzym blev elueret som udgående væske og A-enzym blev elueret med saltgradient.

5 Molekylvægten af A- og B-enzymet blev bestemt ved Pharmacia PhastTM systemet ved brug af 8-25% SDS PAGE gradient geler. Molekylvægtene for A- og B-enzymerne viste sig at være henholdsvis 43 og 33 kD. Isoelektriske punkter for A- og B-enzymerne blev bestemt ved brug af LKB Ampholine "page
10 plate" med pH i området 3,5 til 9,5. pI for A-enzymet var 8,0 ± 0,2 og for B-enzymet 6,0 ± 0,2.

Til yderligere oprensning af B-enzym blev den samlede mængde, der var fremkommet som udgående materiale fra CM-Sepharose, dialyseret mod 20 mM borat pH 10 og påført på
15 Mono-QTM (Pharmacia) søjle ækvilibreret med den samme puffer. Aktiviteten af B-enzymet blev elueret med saltgradient under anvendelse af Pharmacia FPLC-apparatur.

pH-stabilitet af enzymet

A- og B-enzym blev fortyndet i 20 mM phosphat-
20 puffer til pH 6 eller 7 og 20 mM boratpuffer pH 8, 9 eller 10. Den færdige enzymkoncentration blev indstillet til OD₂₈₀=1 og inkuberet i 1 1/2 time ved stuetemperatur og natten over ved 4°C. Nedenstående tabel viser % restaktivitet målt ved LU-metoden. Aktiviteten af enzymerne ved pH 7 blev
25 sat til 100%. Det fremgår, at A-enzymet var totalt inaktivt ved pH 10 efter inkubation natten over ved 4°C, hvorimod B-enzymet bibeholdt mere end 78% af sin aktivitet ved pH 10, men var mindre stabilt ved pH 6.

Inkubations- tid	A-enzym		B-enzym	
	1 1/2 time	20 timer	1 1/2 time	20 timer
5	pH			
	6	85	91	87
10	7	100	100	72
	8	101	100	88
	9	125	103	101
15	10	18	0	91

Virkningen af temperaturen på aktiviteten

Lipaseaktiviteten blev målt ved LU-metoden, med undtagelse af at temperaturen blev varieret. Resultaterne fremgår af nedenstående, hvor aktiviteten ved 30°C er sat til 100%.

		% forøgelse af aktiviteten	
25	Temperatur	A-enzym	B-enzym
	30°C	100	100
	40°C	128	103
30	50°C	160	119
	60°C	169	112
35	70°C	192	116

Virkning af pH på aktiviteten

Lipaseaktiviteten blev målt ved LU-metoden, med undtagelse af, at pH blev varieret. Resultaterne, der blev opnået ved de respektive pH-værdier i fravær af enzymet, blev

anvendt som blindværdier for spontan hydrolyse. Resultaterne er vist på fig. 4. Det fremgår heraf, at det optimale pH for både A- og B-enzymen viste sig at være ca. 7.

EKSEMPEL 11

5 Termostabilitet af lipaser

Prøver af kulturvæsken fremstillet som i eksempel 9 (med Cal9g eller YS-4 medium) blev varmebehandlet i 30 minutter ved 60, 70 og 84°C. Lipaseaktiviteten af de varmebehandlede prøver og af en kontrolprøve uden varmebehandling blev derefter påvist ved at anbringe prøven på en diffusionsplade indeholdende olivenolie, polyvinylalkohol (PVA) og brilliantgrønt i agar ved pH 5,5, og ved at måle zonen for farveskift (diameter i mm) efter 24 timers diffusion ved 30°C.

15			Varmebehandling			
	Art	Stamme nr.	Ingen	60°C	70°C	84°C
	<u>C. antarctica</u>	CBS 5955	6,0	6,0	5,5	5,0
	<u>C. foliorum</u>	CBS 5234	6,0	6,5	6,5	ND
20	<u>C. humicola</u>	CBS 2041	7,5	4,5	4,5	4,5
	- -	CBS 571	7,0	4,5	4,5	4,5
	- -	CBS 1527	7,0	4,5	4,5	4,5
	<u>C. auriculariae</u>	CBS 6379	6,0	6,0	0	ND
	<u>C. curvata</u> (reference)		9,5	0	0	0

25 Det fremgår, at lipaser fra C. antarctica og C. humicola var stabile op til 84°C, C. foliorum lipase op til 70°C og C. auriculariae lipase op til 60°C, hvorimod den kendte C. curvata var ustabil ved 60°C.

EKSEMPEL 12

Termostabilitet af opløselige lipaser

Termostabiliteterne af nedenfor angivne lipaser blev sammenlignet.

5 Opfindelse:

C. antarctica: En 0,8% opløsning af pulver fra eksempel 1

10 Oprensset lipase A: Prøven fra eksempel 10 blev dialyseret natten over mod 15 mM tris-maleatpuffer pH 7.

Reference:

C. cylindracea: En 1% opløsning af Lipase OF rekvideret fra Meito Sangyo

15 C. curvata: UF-koncentratet fra sammenlignings-eksempel 1.

Følgende puffere blev anvendt i forsøget:

Tris-maleatpuffer 0,1 M, pH 6,0:

50 ml 0,1 M tris (hydroxymethyl)-aminomethan plus

26 ml 0,1 M maleinsyre

20 Citrat-phosphat-puffer 0,1 M, pH 6,5:

142 ml 0,05 M citronsyre plus

355 ml 0,1 M dibasisk natriumphosphat (Na_2HPO_4)

Phosphatpuffer 0,1 M, pH 7,5:

16 ml 0,1 M NaH_2PO_4 plus

25 84 ml 0,1 M Na_2HPO_4

Termostabiliteten blev målt ved at blande 1 ml lipaseopløsning med 4 ml puffer i et reagensglas. Reagensglasset blev inkuberet i 60 minutter i et 60, 65 eller 70°C

varmt vandbad. Termostabiliteten udtrykkes som restaktiviteten (LU/ml) i procent af aktiviteten (LU/ml) af enzym-pufferblandingen før inkubation.

Resultaterne (restaktiviteterne) var som følger:

5	OPFINDELSE									REFERENCE					
	Enzym-in-	<u>C. antarctica</u>			<u>Lipase A</u>			<u>C. curvata</u>			<u>C. cylindracea</u>				
	kubations-														
	temperatur	60°C	65°C	70°C	60°C	65°C	70°C	60°C	65°C	70°C	60°C	65°C	70°C		
10	Buffer pH														
	6,0							32%	3,5%	0,9%					
	6,5	82%	78%	83%	98%	95%	93%	10%	0,9%	0,9%	1,1%	1,1%	0,6%		
	7,5	29%	18	8%				2,2%	0,8%	1,0%	0,2%	0,2%	0,5%		

15 pH 6 inkubationerne for C. curvata med tris-maleat-puffer blev taget med, da disse var de betingelser, som D. Montet et al. anvendte i deres beskrivelse af lipase (Fette Seifen Anstrichmittel 1985, 87:181-185), og som derfor anses for egnet til denne lipase.

20 Det kan fastslås, at C. antarctica lipase og lipase A er langt mere termostabil end de kendte C. cylindracea og C. curvata lipaser.

EKSEMPEL 13

Termostabilitet af lipaser efter varmebehandling

25 I dette forsøg blev lipaseprøverne først forbe-handlet i 1 time ved 60°C, pH 6,5 som følger:

C. tsukubaensis: Pulveret fra eksempel 5 blev opløst (7%) i pH 6,5 puffer (se ovenfor), og forbehandlet i 1 time ved 60°C.

5 Oprensat lipase A: Det eluerede stof fra søjlen (eksempel 10) blev dialyseret natten over mod 15 mM tris-maleatpuffer pH 7, fortyndet 5 gange med pH 6,5 puffer og forbehandlet i 1 time ved 60°C.

Reference:

10 C. curvata: UF-koncentratet fra sammenligningseksempel 1. Koncentratet blev indstillet på pH 6,5 og inkuberet i 1 time ved 60°C, pH 6,5. Denne forhandlede prøve blev fortyndet 5 gange i puffer (pH 6, 6,5, 7,5, se ovenfor) til brug ved termostabilitetsforsøgene.

15 Ovennævnte forhandlede prøver blev dernæst inkuberet i 1 time ved 65°C og pH 6,0, 6,5 eller 7,5.

Resultaterne var som følger:

Lipase	OPFINDELSE		REFERENCE		
	<u>C. tsukubaensis</u>	Oprensat lipase A	<u>C. curvata</u>		
20 Resterende aktivitet efter forvarmebehandling	26%	9%	49%		
25 Inkubation pH	6,5	6,5	6,0	6,5	7,5
30 Resterende aktivitet efter 1 time ved:					
0°C	100%	100%	100%	100%	100%
65°C	46,2%	99 %	2,8%	1,2%	1,1%

Det fremgår, at de to lipaser ifølge opfindelsen taber nogen aktivitet under forbehandlingen ved 60°C, men at de forbehandlede prøver er meget stabile ved 65°C. Den kendte lipase fra C. curvata inaktiveres hurtigt ved 65°C.

5 EKSEMPEL 14

Termostabilitet af C. antarctica lipase

Lipasepulver fremkommet som i eksempel 3 blev opløst i vand (1%), og yderligere fortyndet 5 gange i 50 mM tris-maleatpuffer pH 7. Denne opløsning blev forbehandlet ved 60°C i 0, 60 og 180 minutter, og derefter varmebehandlet i 30 minutter ved forskellige temperaturer. Den resterende aktivitet efter hvert trin blev målt ved OU-metoden.

Forbehandlings- tid ved 60°C		0 min	60 min	180 min
15	Resterende aktivitet efter forbehandling	100%	39%	-
Varmebehandling i				
20	30 minutter ved			
	0°C	100%	100%	100%
	30°C	100%	103%	126%
	40°C	96%	105%	137%
25	50°C	81%	108%	148%
	60°C	62%	86%	135%
	70°C	60%	86%	135%
	80°C	29%	55%	111%

Resultaterne viser, at nogen lipaseaktivitet går tabt under forbehandling ved 60°C, men den resterende lipaseaktivitet er yderst varmestabil, selv ved 80°C.

Det er ikke klart, hvorfor nogle tal ligger væsentligt over 100%.

EKSEMPEL 15

Aktivitet i forhold til temperatur for *C. antarctica* lipase

Enzymaktiviteten af *C. antarctica* lipase (0,1% af pulveret fra eksempel 3) blev målt ved 30, 40, 50, 60, 65 og 5 70°C. Aktiviteterne blev målt ved den i teksten beskrevne OU-metode, men med inkubation ved forskellige temperaturer. Resultaterne var som følger:

Inkubationstemperatur	30	40	50	60	65	70
Aktivitet OU/ml	2,1	2,3	3,4	5,2	6,3	5,8

10 EKSEMPEL 16

pH-aktivitet af lipaser

pH-afhængigheden af aktiviteterne af lipase fra *C. antarctica* (0,2% opløsning af pulveret fra eksempel 3), *C. tsukubaensis* (3,0% opløsning af pulveret fra eksempel 5), *C. auriculariae* (3,0%) opløsning af pulveret fra eksempel 6), *C. humicola* (eksempel 7) og *C. foliorum* (eksempel 8) blev målt. 15

pH blev varieret fra 4,0 til 10,5 i trin af 0,5 enheder. De anvendte puffer var natriumacetat/eddikesyre ved pH 4,0-5,5 (200 mM for *C. antarctica* og 100 mM for de andre 20 lipaser), 50 mM tris-maleat/NaOH ved pH 5,5-8,5 og glycin/-NaOH ved pH 9,0-10,5 (200 mM for *C. antarctica* og 100 mM for de andre lipaser).

Målingerne blev udført som ved OU-metoden, men med 5 ml enzym opløst i puffer i stedet for 1 ml enzymopløsning 25 og 5 ml tris-maleatpuffer.

pH-aktivitetskurverne fremgår af fig. 1, 2 og 3 for henholdsvis C. antarctica, C. tsukubaensis og C. auriculariae. Kurverne for C. humicola og C. foliorum lipaserne var de samme. Alle lipaser viste således optimum ved ca. pH 7 til 5 8.

EKSEMPEL 17

Uspecificitet af opløselige lipaser

Kulturvæsken, fremstillet som i eksempel 9 blev undersøgt under anvendelse af den tidligere angivne uspecifici- 10 citetsmetode. Resultaterne angives som 1,3-diglycerid i % af totalt diglycerid:

	<u>Art</u>	<u>Stamme nr.</u>	<u>% 1,3-diglycerid</u>
	<u>C. antarctica</u>	CBS 6678	32%
	<u>C. humicola</u>	CBS 2041	51%
15	<u>C. tsukubaensis</u>	CBS 6389	48%
	<u>C. foliorum</u>	CBS 5234	45%
	<u>C. auriculariae</u>	CBS 6379	50%

Lipaser fra Candida antarctica (0,2% opløsning af et pulver fremkommet som i eksempel 3), C. tsukubaensis (3,0% 20 af pulveret fra eksempel 5), C. auriculariae (3,0% af pulveret fra eksempel 6) blev målt ved samme metode.

<u>C. antarctica</u>	:	41%
<u>C. tsukubaensis</u>	:	48%
<u>C. auriculariae</u>	:	50%

Det ses, at alle lipaserne er uspecifikke.

EKSEMPEL 18

Substratspecificitet af bestanddele af C. antarctica lipase

Aktiviteterne af oprensede lipaser A og B (fra eksempel 10) på forskellige substrater blev sammenlignet. Aktiviteterne overfor tributyrin og olivenolie blev målt ved henholdsvis LU- og OU-metoderne. Aktiviteterne overfor methyloleat, methyllaurat og racemisk diolein blev målt ved hjælp af LU-metoden med følgende modifikationer: 1% substrat (methyllaurat 99% rent fra Nu Check præparat, methyloleat med en renhed af 99% Nu Check præparat, eller racemisk diolein med en renhed af 99% fra Sigma) i stedet for tributyrin, og med NaOH titrering ved pH 8,5 i stedet for pH 7,0.

Nedenfor er resultaterne angivet som procent aktivitet i forhold til tributyrinen:

<u>Substrat</u>	Lipase A	Lipase B
Tributyrin (LU)	100%	100%
Olivenolie (OU)	110%	65%
Racemisk diolein	27%	313%
20 Methyllaurat	22%	140%
Methyloleat	8%	60%

Det ses, at lipase B har høj aktivitet med diglycerider og methylestere, hvorimod lipase A har relativ lav aktivitet overfor disse i forbindelse med aktiviteten overfor 25 triglycerid.

EKSEMPEL 19Immobilisering af *C. antarctica* lipase på anionbytter

0,6 g *Candida antarctica* lipase fremkommet som beskrevet i eksempel 1 blev fortyndet med vand til 7,5 g og blandet med 1,5 g Lewatit® E1999/85 svagt basisk anionbytter (produkt fra Bayer) på tørstofbasis indstillet til pH 7.

Blandingen blev omrørt i 24 timer ved stuetemperatur. Efter vask med vand blev præparatet tørret under vakuum ved stuetemperatur, hvorved der fremkom 1,83 g (tørstofindhold 98%). Den resterende aktivitet i filtratet var 39% svarende til en ladning på ca. 19.000 LU/g immobiliseret lipase på tørstofbasis.

EKSEMPEL 20Immobilisering på anionbytter

15 12,5 ml lipaseopløsning (12.500 LU/ml) af *C. antarctica* lipase, fremkommet som i eksempel 2 og 4,25 g Duolite® ES-568 svagt basisk anionbytter (produkt fra Rohm & Haas) på tørstofbasis, indstillet til pH 7 blev blandet og omrørt i 24 timer ved stuetemperatur. Efter vask med vand
20 blev præparatet tørret under vakuum ved stuetemperatur, hvorved der fremkom 4,6 g immobiliseret lipase på tørstofbasis. Den resterende aktivitet i filtratet var 33%, svarende til en ladning på ca. 22.700 LU/g immobiliseret lipase på tørstofbasis. Aktiviteten var 9,2 BIU/g, målt ved den tidligere an-
25 givne fremgangsmåde.

EKSEMPEL 21Immobilisering på anionbytter

100 ml med 15.000 LU/ml C. antarctica lipase, fremkommet som i eksempel 2 blev blandet med 46 g vasket Lewatit® E1999/85 svagt basisk anionbytter (produkt fra Bayer) på tørstofbasis, indstillet til pH 7. Blandingen blev omrørt i 24 timer ved stuetemperatur. Efter vask med vand blev præparatet tørret under vakuum ved stuetemperatur, hvorved der fremkom 51,5 g (tørstofindhold 99%). Den aktivitet, der var tilbage i 10 filtratet, var 1% svarende til en ladning på 29.200 LU/g. Aktiviteten var 37,6 BIU/g.

EKSEMPEL 22Immobilisering på adsorberende harpiks

60 ml med 12.500 LU C. antarctica lipase/ml fremkommet som beskrevet i eksempel 2 blev blandet med 25 g vasket Lewatit® E2001/85 non-ionisk harpiks (produkt fra Bayer) på tørstofbasis, indstillet til pH 7. Blandingen blev omrørt i 24 timer ved stuetemperatur. Efter vask med vand blev præparatet tørret under vakuum ved stuetemperatur, hvorved der 20 fremkom 25 g (tørstofindhold 98%). Aktiviteten af resten af filtratet var 1,6% svarende til en ladning på 30.200 LU/g.

EKSEMPEL 23Immobilisering på adsorberende harpiks

Det foregående eksempel blev gentaget med anvendelse af 100 ml med 15.000 LU C. antarctica lipase/ml og 50 g harpiks, hvorved der fremkom 58 g (tørstofindhold 98%). Aktiviteten af resten af filtratet var 2% svarende til en ladning på 25.800 LU/g. Aktiviteten var 52,2 BIU/g.

EKSEMPEL 24Immobilisering af oprenset lipase A

10 Fremstilling af bærer: 10 g Lewatit® 2001/85 blev vasket på et G-2 glasfilter, pH blev indstillet til pH 7 ved pH-stat under anvendelse af 0,05 N NaOH (2 timers drift), der blev vasket igen og tørret på glasfilteret. Tørstoffet blev målt som 61,55%, og en mængde svarende til 2,5 g tørvægt blev anvendt til immobiliseringen.

Fremstilling af enzymet: Lipase A (eksempel 10) blev dialyseret natten over overfor 15 mM Tris-maleatpuffer pH 8, hvorved der fremkom 15 ml med en aktivitet af 8000 LU/ml.

Immobilisering: Bærer og enzym blev blandet natten over, vasket på et glasfilter, og tørret i 2 timer under vakuum. Tørstoffet var 96%. 2% af aktiviteten forblev i opløsningen svarende til en ladning på 28.200 LU/g.

EKSEMPEL 25Immobilisering af oprenset lipase A

Bæreren blev fremstillet som i det foregående eksempel. Tørstoffet blev målt til 76,32%, og en mængde svarende til 4,4 g tørvægt blev anvendt til immobilisering.

Enzymet blev fremstillet som i det foregående eksempel, hvorved der fremkom 24,7 ml med en aktivitet af 5400 LU/ml.

Immobilisering: Bærer og enzym blev blandet natten over, vasket på et glasfilter og tørret i 5 timer under vakuum. Tørstoffet var 100%. 28% af aktiviteten forblev i opløsningen svarende til en ladning på 22.300 LU/g.

EKSEMPEL 26Immobilisering af oprenset lipase B

15 2,6 g(på tørstofbasis) bærer fremstillet som i det foregående eksempel blev anvendt til immobiliseringen.

Lipase B (eksempel 10) blev fremstillet som i eksempel 24, hvorved der fremkom 24,9 ml med en aktivitet af 3200 LU/ml.

20 Immobilisering: Bærer og enzym blev blandet natten over, vasket på et glasfilter og tørret i 5 timer under vakuum. Tørstoffet var 100%. 6,4% af aktiviteten forblev i opløsningen svarende til en ladning på 29.200 LU/g.

Aktiviteten var 4,4 BIU/g. En NSI_2 -test blev udført i 2 timer med 250 mg lipase på tørstofbasis og kun 4 ml af reaktionsblandingerne. Inkorporeringen af laurinsyre var kun 14 mol-% og NSI_2 var 0,65, hvilket indikerer, at lipase B er 5 uspecifik.

EKSEMPEL 27

Egenskaberne af immobiliseret C. antarctica lipase og immobiliseret lipase A

Aktiviteten, termostabiliteten og uspecificiteten 10 af immobiliseret Candida antarctica lipase fra eksempel 22 og immobiliseret oprenset lipase A fra eksempel 24 blev sammenlignet.

Aktiviteten blev målt både med BIU-metoden (60°C, uden organisk opløsningsmiddel) og med BTU-metoden ved 70°C.

15 Uspecificitet blev målt både ved NSI_1 og NSI_2 metoderne.

Termostabiliteten blev målt ved følgende metode:

1,2 g triolein blev tilsat til 150 mg enzym på tørstofbasis med 10% hydratisering. Prøven blev dernæst inku- 20 beret ved 80°C i 3 dage. Den tiloversblevne aktivitet (BIU) blev målt ved 40°C efter tilsætning af 12 ml petroleumsether med 348 mg palmitinsyre. Termostabiliteten udtrykkes i % af aktiviteten af en referenceprøve, der var anbragt i et køleskab i 3 dage.

25 Resultaterne er angivet i nedenstående tabel:

Enzym:	Immobiliseret <u>C. antarctica</u>	Immobiliseret lipase A
BIU/g (60°C, intet opløsningsmiddel)	41,9	21,4
5 BTU/g (70°C)	186	128
NSI ₂ (ved % fremkommet in- korporering af laurinsyre)	0,87 (58%)	0,81 (58%)
NSI ₁	0,67	0,75
Termostabilitet,		
10 3 dage ved 80°C	78%	69%

De to immobiliserede produkter har i alle disse forsøg egenskaber, der i høj grad minder om hinanden. Begge er uspecifikke og er velegnede til at katalysere acidolyse og transesterificering, og begge er yderst termostabile.

15 EKSEMPEL 28

Aktivitet og specificitet af immobiliserede lipaser

Nedenstående immobiliserede lipaser blev fremstillet til sammenligning:

- A) 2,72 g Candida cylindracea lipase med en aktivitet på 20 120.000 LU/g (produkt fra Meito Sangyo Co.) blev opløst i 25 ml vand. 8,5 g (på tørstofbasis) Lewatit® E1999/85 svagt basisk anionbytter (produkt fra Bayer) blev indstillet til pH 6 og blandet med lipaseopløsningen. Efter omrøring i 24 timer ved stuetemperatur og vask med vand blev 25 præparatet tørret under vakuum ved stuetemperatur, hvilket resulterede i 9,27 g (tørstofindhold 97%). Den aktivitet, der blev tilbage i filtratet, var 0,2% svarende til en ladning på 28.000 LU/g immobiliseret lipase på tørstofbasis.

- B) 2,0 g Chromobacterium viscosum lipase med aktivitet på 65.700 LU/g (produkt fra Toyo Jozo, Japan) blev opløst i 25 ml vand. 4,25 g (på tørstofbasis) Duolite® ES-568N svagt basisk anionbytter (produkt fra Rohm & Haas) blev indstillet til pH 7 og blandet med lipaseopløsningen. Efter omrøring i 4 timer ved stuetemperatur og vask med vand blev præparatet tørret under vakuum. Udbyttet var 4,52 g (tørstofindhold 94%), og den tiloversblevne aktivitet i filtratet var 6% svarende til en ladning på 28.000 LU/g immobiliseret lipase på tørstofbasis.

Uspecificitetsindeks (NSI_2) blev målt som beskrevet tidligere i denne beskrivelse under anvendelse af immobiliseret C. antarctica lipase (præparat ifølge eksempel 19), de to ovennævnte præparater og immobiliseret Mucor miehei lipase (Lipozyme® IM 20, produkt fra Novo Industri A/S).

I nedenstående tabel angives fedtsyresammensætningerne i mol-% efter reaktioner i 2 timer ved 60°C.

Lipase-præparat	Fedtsyresammensætning				NSI_2
	La	P	S	Ol	
Opfindelse:					
<u>Candida antarctica</u>	62,8	9,6	14,4	13,2	0,96
Reference:					
<u>Candida cylindracea</u>	53,0	9,8	22,2	15,0	1,04
<u>Chromobac. viscosum</u>	31,4	10,0	25,4	33,1	0,02
<u>Mucor miehei</u>	45,5	8,5	13,1	33,0	0,02
Kakaosmør-stearin	0,0	24,6	41,2	32,1	-

Disse resultater viser, at de to Candida lipaser er positions-uspecifikke, og at Chromobacterium og Mucor lipaserne er 1,3-specifikke.

EKSEMPEL 29

5 Termostabilitet af immobiliserede lipaser

Termostabiliteten af de immobiliserede præparater fra Candida antarctica og Candida cylindracea lipaserne (henholdsvis eksempel 19 og 28) blev bestemt som følger:

250 mg præparat på tørstofbasis blev hydratiseret til 10% w/w. 600 mg triolein blev tilsat og inkubationer blev udført i 0, 2, 4 og 24 timer ved 70°C. Efter inkubation blev prøven afkølet, 12 ml petroleumsether indeholdende 174 mg palmitinsyre blev tilsat, og blandingen blev inkuberet i 1 time ved 40°C. I hvert tilfælde blev inkorporeret palmintinsyre (% w/w) målt, som beskrevet i den AF 206-metode, hvortil der er henvist tidligere, som følger:

<u>Inkubation, timer</u>		<u>C. antarctica</u>	<u>C. cylindracea</u>
20	0	21,6	25,1
	2	20,5	14,0
	4	20,7	13,4
	24	20,8	6,7

Resultaterne viser, at den immobiliserede C. antarctica lipase har udmærket termostabilitet, da den bevarer næsten hele sin aktivitet efter 24 timer ved 70°C, hvorimod den kendte lipase taber det meste af sin aktivitet.

Ved beregning som en første ordens reversibel reaktion anslås det, at C. antarctica lipase har bevaret ca. 90% af sin aktivitet efter 24 timer ved 70°C, og at restaktiviteten for C. cylindracea lipase er under 10%.

EKSEMPEL 30**Acidolyse og transesterificering med immobiliseret
C. antarctica lipase**

Det immobiliserede produkt ifølge eksempel 22 blev
5 anvendt til acidolyse (triolein + palmitinsyre) og trans-
esterificering (triolein + tripalmitin) uden opløsningsmiddel
ved forskellige temperaturer i henhold til BIU- og BTU-
metoderne.

Aktiviteterne (BIU og BTU) fremgår af henholdsvis
10 fig. 5 og 6. Disse viser klart den høje termostabilitet af
den immobiliserede lipase, da den højeste aktivitet blev
fundet ved den højeste temperatur, der blev anvendt i for-
søgene, dvs. 85-90°C.

EKSEMPEL 31**15 Estersyntese med immobiliserede C. antarctica lipaser**

Evnen til at katalysere estersyntese af immobili-
seret C. antarctica lipase (præparat fra eksempel 22), immo-
biliseret, oprenset lipase A (præparat fra eksempel 25) og
immobiliseret, oprenset lipase B (præparat fra eksempel 26)
20 blev sammenlignet ved følgende metode: 150 mg lipase (tør-
stofbasis) hydratiseret 10% 20 timer før brug, 1,5 millimol
alkohol (1-propanol, 2-propanol eller oleylalkohol (teknisk
kvalitet, BDH)) og 1,5 millimol fri fedtsyre (myristinsyre
(99% renhed, Sigma) eller oliesyre (92%, BDH)) blev blandet i
25 en 8 ml hætteflaske og rystet i et vandbad ved 60°C. Prøver
af ca. 1 g blev udtaget efter 20 minutters og 90 minutters
inkubation. 150 ml neutraliseret ethanol blev tilsat til prø-
ven og de resterende frie fedtsyrer blev titreret med KOH.
Den opnåede estersyntese beregnes som 100% minus de titrere-
30 de, tilbageblivende frie fedtsyrer.

Resultaterne er angivet i nedenstående tabel:

Immobiliseret enzym	Alkohol	Frie fedt- syrer	% opnået estersyntese	
			efter 20 min	efter 90 min
5 Ren lipase A	1-propanol	myristinsyre	10%	22%
	2-propanol	myristinsyre	7%	16%
	oleylalkohol	myristinsyre	14%	52%
	1-propanol	oliesyre	12%	15%
	2-propanol	oliesyre	14%	15%
	oleylalkohol	oliesyre	12%	36%
10 Ren lipase B	1-propanol	myristinsyre	78%	83%
	2-propanol	myristinsyre	59%	75%
	oleylalkohol	myristinsyre	42%	66%
	1-propanol	oliesyre	43%	84%
	2-propanol	oliesyre	62%	68%
	oleylalkohol	oliesyre	32%	47%
15 20 <u>C. antarctica</u> lipase	1-propanol	myristinsyre	82%	84%
	2-propanol	myristinsyre	43%	71%
	oleylalkohol	myristinsyre	34%	82%
	1-propanol	oliesyre	62%	90%
	2-propanol	oliesyre	38%	65%
	oleylalkohol	oliesyre	43%	83%

25 Det ses, at immobiliseret lipase B i alle forsøgene er bedre til estersynese end lipase A, både med langkædede og kortkædede alkoholer, og begge med primære og sekundære alkoholer.

Immobiliseret lipase A giver lave esterudbytter i
30 tilfælde af kortkædede alkoholer, men er bedre i tilfælde af langkædede alkoholer.

Immobiliseret C. antarctica lipase (indeholdende både lipase A og lipase B) giver samme udbytte som lipase B for kortkædede alkoholer og bedre udbytte end lipase A eller
35 B for langkædede alkoholer.

EKSEMPEL 32

Indvirkning af fedtsyre ved acidolyse med immobiliseret lipase

250 mg tørstof af immobiliseret C. antarctica lipase
 5 (præparat fra eksempel 22) eller 150 mg tørstof af immobili-
 seret lipase A (præparat fra eksempel 25) blev hydratiseret
 til 10% i 20 timer og derefter blandet med 3 millimol tri-
 caprylin (Sigma kvalitet II) og 3 millimol af en af følgende
 fedtsyrer: laurinsyre (Merck vare nr. 805333), myristinsyre
 10 (Sigma kvalitet 99%), palmitinsyre (BDH særlig ren), stearin-
 syre (Merck vare nr. 800673), oliesyre (Nu Check præparat
 99%) og linolsyre (Nu Check præparat 99%) i en 8 ml hætte-
 flaske. Blandingen blev inkuberet i ryste-vandbad ved 70°C,
 og prøver blev udtaget efter en passende tid til beregning af
 15 aktiviteten. Triglyceriderne blev oprenset, metyleret, ana-
 lyseret på GLC, og aktiviteterne blev beregnet som beskrevet
 i den tidligere beskrevne BIU-metode.

Resultaterne fremgår af nedenstående:

Immobiliseret C. antarctica lipase:

20		Aktivitet	
		μmol inkorporeret fedtsyre (initial aktivitet) pr. minut	
25	Acidolyse af tricaprylin med:		
	laurinsyre	116	U/g
	myristinsyre	100	U/g
	palmitinsyre	121	U/g
	stearinsyre	134	U/g
30	oliesyre	74	U/g
	linolsyre	56	U/g

Immobiliseret oprenset lipase A:

		Aktivitet	
		μmol inkorporeret fedtsyre (initial aktivitet) pr. minut	
5	Acidolyse af tricaprylin med: laurinsyre oliesyre	13 U/g 3 U/g	

10 EKSEMPEL 33

Indvirkning af fedtsyre på acidolyse med immobiliseret lipase

I en andet forsøg blev 150 mg tørstof af immobiliseret C. antarctica lipase (præparat fra eksempel 22) eller immobiliseret oprenset lipase A (præparat fra eksempel 25) hydratiseret til 10% i 20 timer og derefter blandet med 3 millimol af hver af følgende reaktanter: trilaurin (Sigma kvalitet II) og palmitinsyre (BDH, særlig ren), oliesyre (Nu Check præparat 99%) og linolsyre (Nu Check præparat 99%) i en 8 ml hætteflaske. Reaktionsblandingen blev anbragt i rystevandbad ved 70°C. Prøver blev udtaget efter 1 1/2 og 3 1/2 time for immobiliseret C. antarctica lipase og efter 1 1/2 og 5 1/2 for immobiliseret oprenset lipase A, og triglyceriderne blev oprenset, methyleret og analyseret ved GLC som tidligere beskrevet. Resultaterne fremgår af nedenstående tabel:

Enzym, immobiliseret	Oprenset lipase A		C. antarctica lipase	
	1 1/2 t	5 1/2 t	1 1/2 t	3 1/2 t
Reaktionstid				
30 Triglyceridsammensætning:				
mol-% laurinsyre	92,3	85,4	78,5	65,9
mol-% palmitinsyre	5,0	10,1	9,3	14,5
mol-% oliesyre	1,7	2,6	6,4	10,1
35 mol-% linolsyre	0,7	1,7	5,8	9,4

Det ses, at lipase A har en meget lavere aktivitet overfor mono- og di-umættet syre end overfor mættet syre. C. antarctica lipase (indeholdende både lipase A og lipase B) har kun lidt lavere aktivitet overfor mono- og di-umættet 5 syre.

EKSEMPEL 34

Acidolyse af immobiliserede lipaser med poly-umættet fedtsyre

Evnen til at inkorporere poly-umættede fedtsyrer i triglycerider, som immobiliseret C. antarctica lipase (præ-
10 paratet fra eksempel 22), immobiliseret oprenset lipase A (præparatet fra eksempel 25) og immobiliseret specifik lipase fra Mucor miehei (Lipozyme® IM 20 fra NOVO INDUSTRI A/S) besidder, blev sammenlignet ved at blande 250 mg immobiliseret lipase på tørstofbasis (hydratiseret til 10% vand), 1276 mg
15 trilaurin (Sigma kvalitet 98%) og 2500 mg fedtsyreblanding i en 8 ml hætteflaske. Fedtsyreblandingen blev opnået ved at blande palmitinsyre med en poly-umættet fedtsyrerig fraktion (fremkommet ved vakuumdestillation) fra hydrolyseret Menhaden-olie. Fedtsyreblandingen indeholdt 24,9 mol-% palmitinsyre (C16:0), 20,4 mol-% eicosapentaensyre (C20:5), 7,2 mol-%
20 docosapentaensyre (C22:5) og 26,2 mol-% docosahexansyre (C22:6). Reaktionen blev udført i et ryste-vandbad ved 70°C. Prøver blev udtaget efter 3 og 5 timer, og triglyceriderne blev oprenset, methyleret og analyseret ved GLC som tidligere
25 beskrevet.

Triglyceridernes fedtsyresammensætning (i mol-%) og forholdet imellem disse angives nedenfor:

Immobiliseret lipase	OPFINDELSE				REFERENCE	
	Ren lipase A	C. antarctica			Mucor miehei	
Reaktionstid i timer	3	5	3	5	3	5
5						
Fedtsyre:						
laurinsyre						
(C12:0)	63,8	54,1	40,4	41,5	62,7	53,9
palmitinsyre						
10 (C16:0)	16,4	20,8	17,4	16,4	15,2	15,9
C20:5	4,1	7,1	11,6	12,5	6,2	8,5
C22:5	1,2	3,0	4,1	4,7	2,4	4,8
C22:6	2,8	5,4	13,0	14,3	2,4	3,2
15 Forhold:						
$\frac{C20:5}{C16:0}$	0,25	0,34	0,67	0,76	0,41	0,53
20 $\frac{C22:6}{C16:0}$	0,17	0,46	0,75	0,87	0,16	0,20

Det ses, at C. antarctica lipase på effektiv måde kan inkorporere poly-umættet fedtsyre, næsten med samme let-
hed som for mættet syre. De to lipaser ifølge opfindelsen kan
25 på effektiv måde inkorporere C22:6 syre.

EKSEMPEL 35

Estersyntese med immobiliseret lipase

Belysning af forskellen i aktivitet mellem lipase
fra Candida antarctica og en 1,3-positions-specifik lipase
30 fra Mucor miehei ved syntese af estere af primære og sekund-
ære alkoholer.

11,42 g (0,05 mol) myristinsyre (Merck, renhed 98%)
og 3,01 g (0,05 mol) n-propanol eller isopropanol (Merck,
renhed 99%) blev rystet sammen ved 60°C med 1 g af en immo-

biliseret lipase. Enten en immobiliseret lipase fra Candida antarctica (præparat fra eksempel 22) indstillet til 10% vandindhold eller en almindeligt tilgængelig 1,3-positions-specifik lipase fra Mucor miehei (Lipozyme® IM 20).

- 5 Esterificeringsreaktionen blev fulgt ved at udtage prøver og titrere den ikke-omsatte fedtsyre (som beskrevet i eksempel 31).

Resultater med n-propanol og isopropanol vises i henholdsvis fig. 7 og 8.

- 10 Resultaterne viser, at C. antarctica lipase på effektiv måde kan anvendes til estersyntese med både primær og sekundær alkohol, hvorimod den positions-specifikke Mucor lipase kun fungerer med primær alkohol.

- 15 Candida antarctica lipasens evne til at syntetisere langkædede estere blev også undersøgt.

- 20 11,42 g (0,05 mol) myristinsyre (Merck, renhed 98%) og 10,72 g (0,05 mol) myristinalkohol (Merck, renhed 98%) blev omsat sammen med den immobiliserede lipase (præparat fra eksempel 22) under vacuum ved 60°C. Den målte ester-procent er vist nedenfor.

Enzymdosering

Reaktionstid	1 g	0,2 g
1/2 time	98%	57%
1 -	98%	86%
25 2 -	-	97%
3 -	-	98%

Resultaterne viser, at C. antarctica lipase på effektiv måde kan anvendes til estersyntese både med kortkædede og langkædede alkoholer.

EKSEMPEL 36

Kontinuert acidolyse

4,5 g immobiliseret C. antarctica lipase (eksempel 21) blev hældt i en søjle med vandkappe med en indre diameter 5 på 1,5 cm.

Søjlen var udstyret med en vandkappe med varmt cirkulerende vand og blev holdt på 60°C eller 80°C. En forkolonne indeholdende vandmættet harpiks (Duolite® ES561) blev anbragt foran enzymsøjlen og holdt på samme temperatur. Et substrat bestående af 71% godt rensat sojabønneolie med en peroxid-værdi mindre end 3 og 29% laurinsyre af analysekvalitet blev pumpet gennem søjlerne. Fra udløbet af enzymsøjlen blev der udtaget prøver til analyse, og inkorporeringen af laurinsyre blev målt ved GLC. Der tilstræbtes en inkorporering på 14% w/w laurinsyre, og strømningshastigheden blev indstillet for at holde konverteringen på denne værdi. Der blev udført målinger af strømningshastigheden, når den faktiske konvertering var $14 \pm 1\%$. Når forkolonnen var tør, blev den erstattet af en ny.

Prøverne blev analyseret ved at fjerne den frie fedtsyre og mono- og diglycerid ved Al_2O_3 -søjlechromatografi, efterfulgt af methylering af triglyceriderne med NaOCH_3 og slutteligt ved analyse af methylesteren på en GLC.

Resultaterne fremgår af fig. 9 som den naturlige logaritme af strømningshastigheden (g triglycerid/time/g immobiliseret enzym) versus tid (timer). Det ses, at lipaseaktiviteten ved 60°C er næsten konstant i 2400 timer, dvs. præparatet er yderst stabilt.

EKSEMPEL 37Fedthydrolyse

Olivenolie blev hydrolyseret ved 60°C med C. antarctica lipase (fremstillet som i eksempel 2) i en 8 l termostateret beholder under omrøring. Forholdet olie/vand var 60:40 eller 70:30 (w/w), og lipasedoseringen var 75 LU/g olie. Resultaterne (% hydrolyse) var som følger:

<u>Tid, timer</u>		Forholdet olie/vand	
		<u>60:40</u>	<u>70:30</u>
10	24	80	70
	48	91	85
	72	93	89
	96	95	91

Det ses, at der kan opnås i det væsentlige fuldstændig hydrolyse, og at lipasen fortsætter med at være aktiv selv efter 4 dage ved 60°C.

EKSEMPEL 38Termostabilitet af lipaser efter varmebehandling

Man undersøgte lipaser fra C. antarctica (0,1% op-20 løsning af pulver fra eksempel 1), C. tsukubaensis (3% fra eksempel 5) og C. auriculariae (3% fra eksempel 6).

Hver enzymopløsning blev først forbehandlet ved 60°C i 1 time og dernæst inkuberet i 30 minutter ved 0, 40, 50, 60, 70 eller 80°C. Aktiviteterne blev målt ved OU-metoden.

	<u>C. antarctica</u>	<u>C. tsukubaensis</u>	<u>C. auriculariae</u>
5 Rest-aktivitet efter forbehandling	34,7%	60,6%	65,2%
10 30 minutter ved:			
0°C	100%	100%	100%
40°C	107%	104,2%	93,3%
50°C	93,3%	116,1%	88,8%
60°C	98,7%	115,4%	88,8%
15 70°C	89,7%	60,8%	15,2%
80°C	94,2%	0	0

Det ses, at varmebehandlet C. antarctica lipase er yderst termostabil, selv ved 80°C. Varmebehandlet C. tsukubaensis lipase er stabil op til 70°C og varmebehandlet C. auriculariae lipase op til 60-70°C.

EKSEMPEL 39

Kontinuerlig transesterificering

Immobiliseret lipase fra eksempel 23 blev anvendt ved 60°C med en substratblanding af lige volumendele midter-
25 fraktion af palmeolie og sojabønneolie. Andre betingelser var som i eksempel 36.

Prøver fra udløbet blev analyseret ved HPLC, og strømningshastigheden blev indstillet i et forsøg på at holde indholdet af trilinolein i udløbet nær 6%. Dette repræsenterer en ligevægtskonvertering af ca. 63%, da indløbsindholdet var 11,0%. Man udførte målinger, når udløbsindholdet var 6% ± 1%.

Resultaterne fremgår af fig. 10 på samme måde som fig. 9 (eksempel 36). Strømningshastigheden viser en variation af ca. ± 20%, men der kan ikke konstateres nogen inaktivering efter ca. 1000 timers drift ved 60°C.

PATENTKRAV

1. Termostabilt positions-uspecifikt Candida lipasepræparat, kendetegnet ved, at det omfatter en lipase, der er afledt fra en stamme af C. antarctica, C. tsukubaensis, C. auriculariae, C. humicola eller C. foliorum, og at lipasens restaktivitet efter 60 minutters inkubation ved 70°C i 0,01 M citrat-phosphat-puffer ved pH 6,5 er over 10%, fortrinsvis over 50% og mest fortrinsvis over 80%.
2. Positions-uspecifikt lipasepræparat ifølge krav 1, kendetegnet ved, at lipasens restaktivitet efter (a) 60 minutter ved pH 6,5 og 60°C efterfulgt af (b) 60 minutter ved 65°C ved pH 6,5 i 0,1 M citrat-phosphat-puffer er mindst 20% af restaktiviteten efter (a).
3. Positions-uspecifikt lipasepræparat ifølge krav 1 - 2, kendetegnet ved, at lipasen er immobiliseret.
4. Positions-uspecifikt Candida lipasepræparat ifølge krav 3, kendetegnet ved, at lipaseaktivitetens halveringstid ved 60°C ved kontinuerlig omestring i fast leje, hvorved substratet helt eller delvist mættes med vand, er over 1.000 timer.
5. Positions-uspecifikt Candida lipasepræparat ifølge krav 3 - 4, kendetegnet ved, at den residuale lipaseaktivitet efter 72 timers inkubation ved 80°C i triolein er over 10%.

6. Fremgangsmåde til fremstilling af positions-uspecifikt lipasepræparat ifølge krav 1 - 7, kendetegnet ved, at den omfatter dyrkning af en stamme af Candida antarctica, C. tsukubaensis, C. auriculariae, C. humicola eller C. foliorum
5 under aerobe betingelser i et næringsmedium indeholdende assimilerbare kilder af kulstof, kvælstof og phosphor, hvorefter man fortrinsvis udvinder lipasen fra gæringsvæsken.

1/8

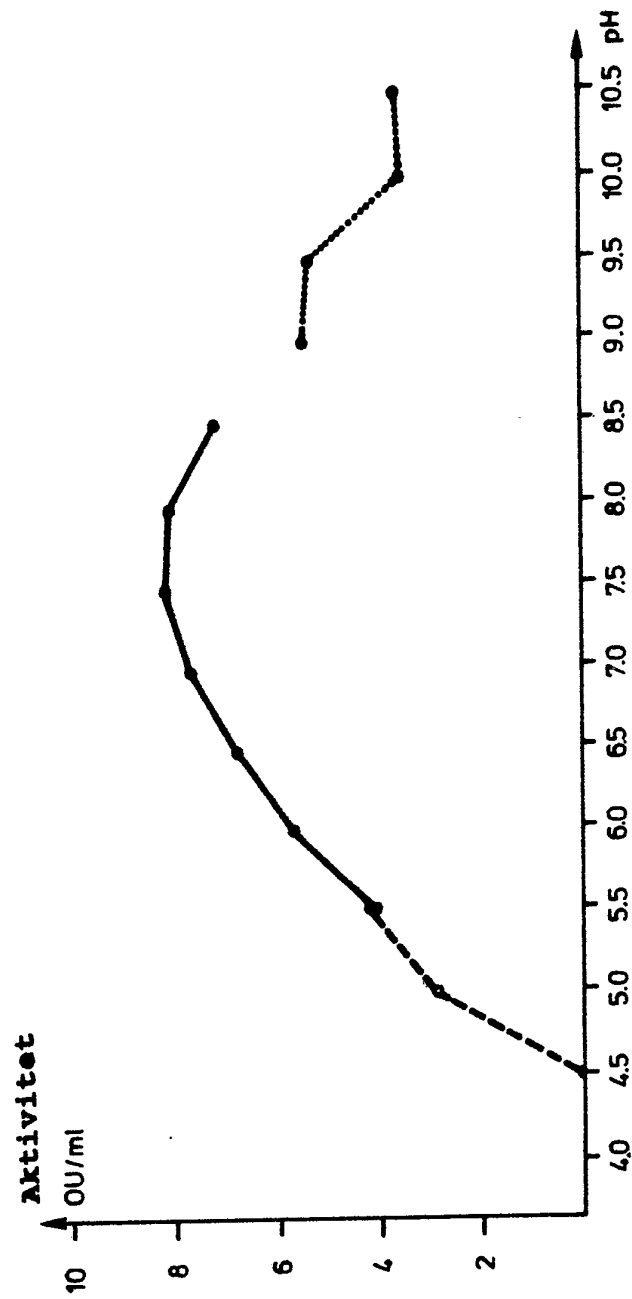
Lipase fra *C. antarctica*

Fig.1

2/8

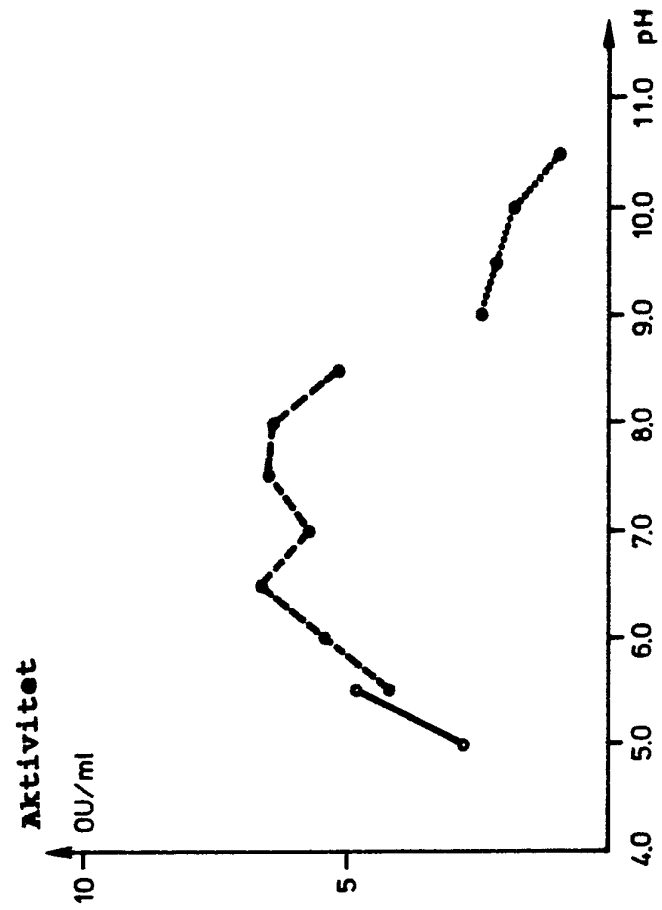
Lipase fra *C. tsukubaensis*

Fig. 2

3/8

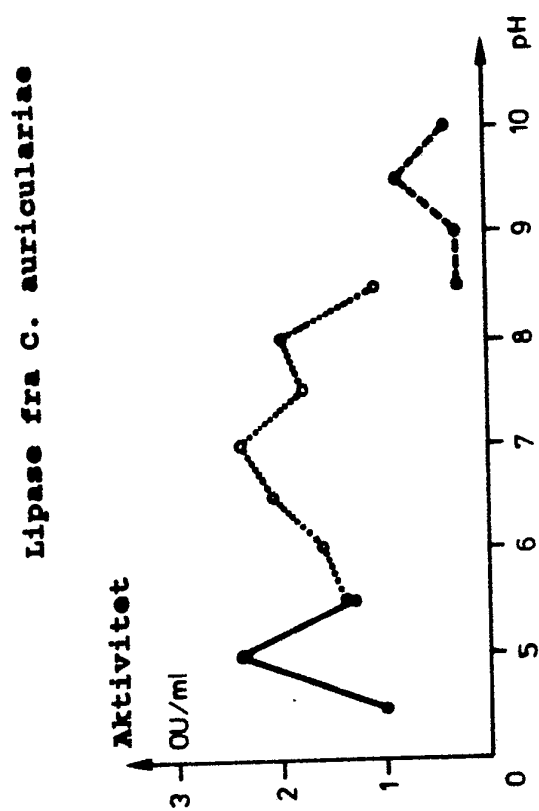


Fig. 3

4/8

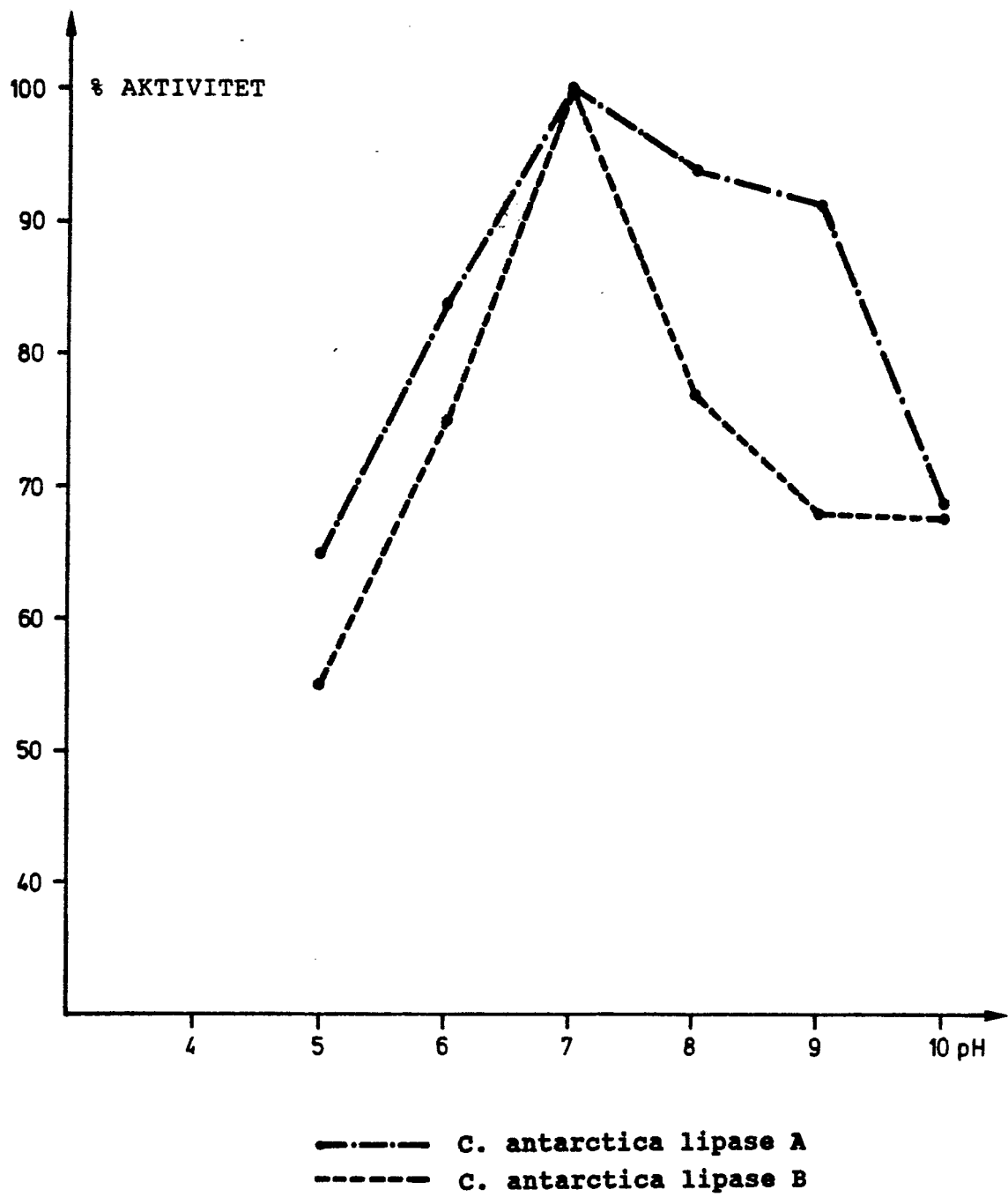
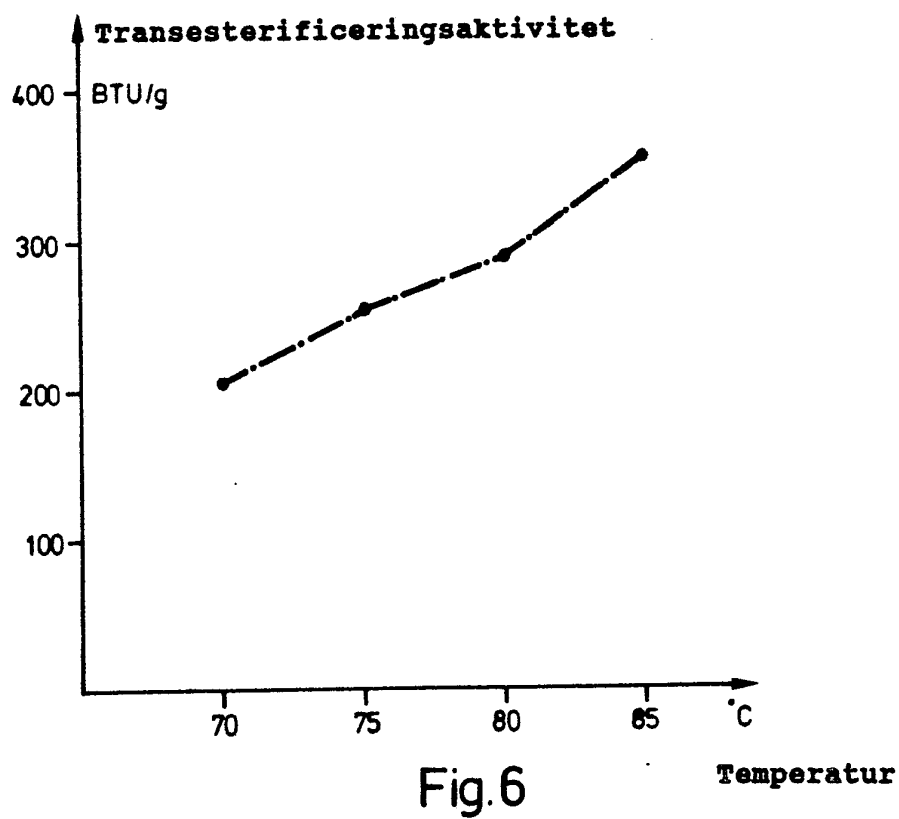
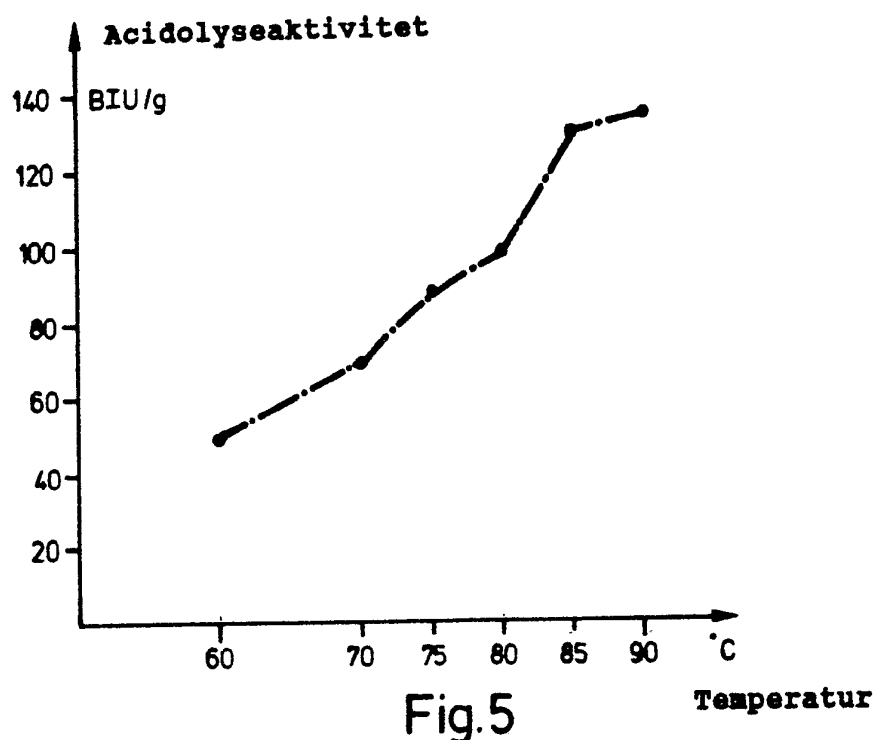


Fig. 4

5/8



6/8

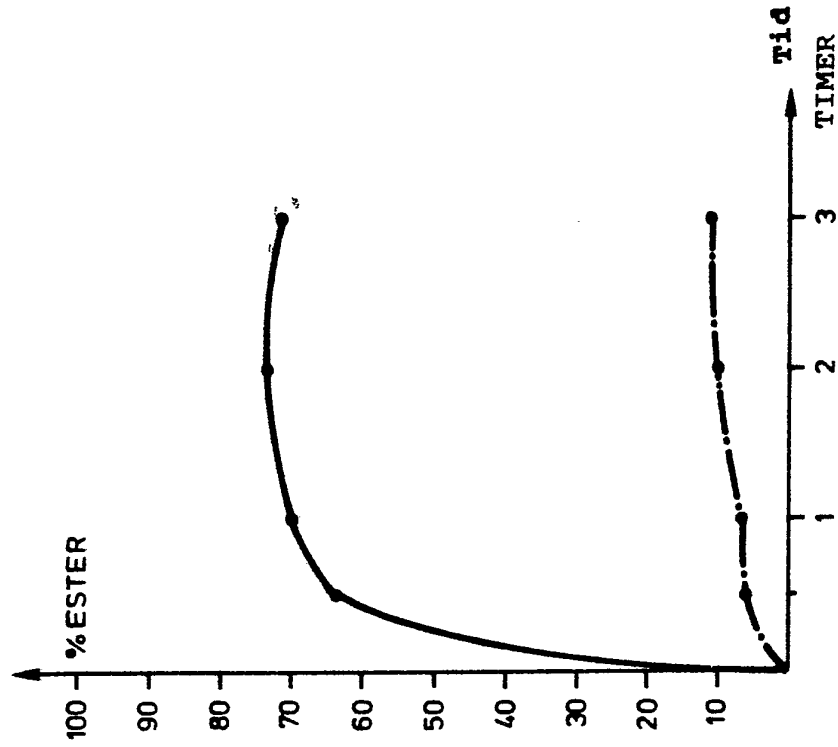


Fig. 8

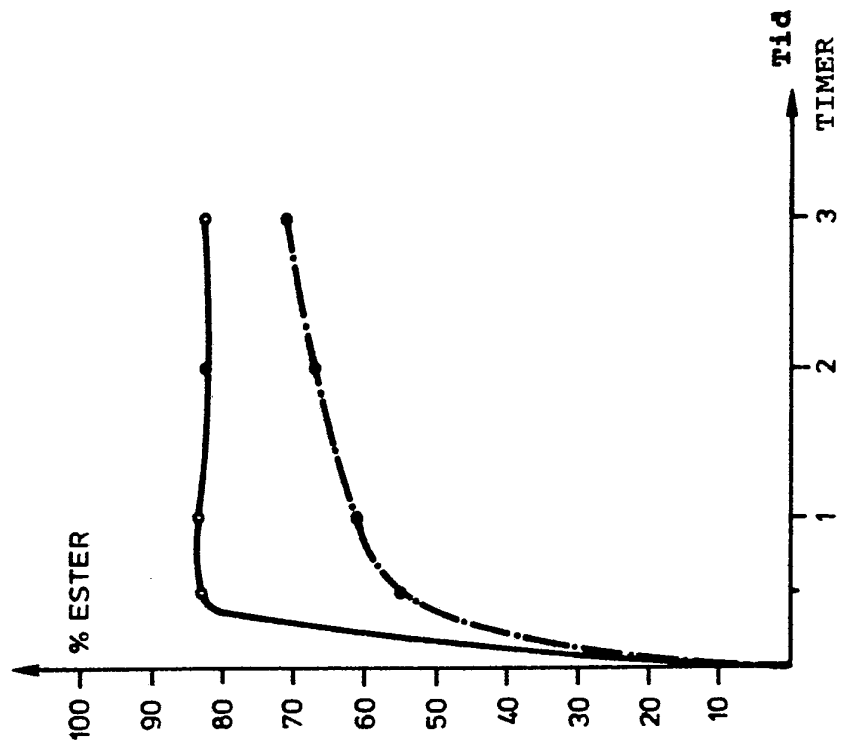


Fig. 7

— CAND. ANT. LIPASE
 -.- LIPOZYME

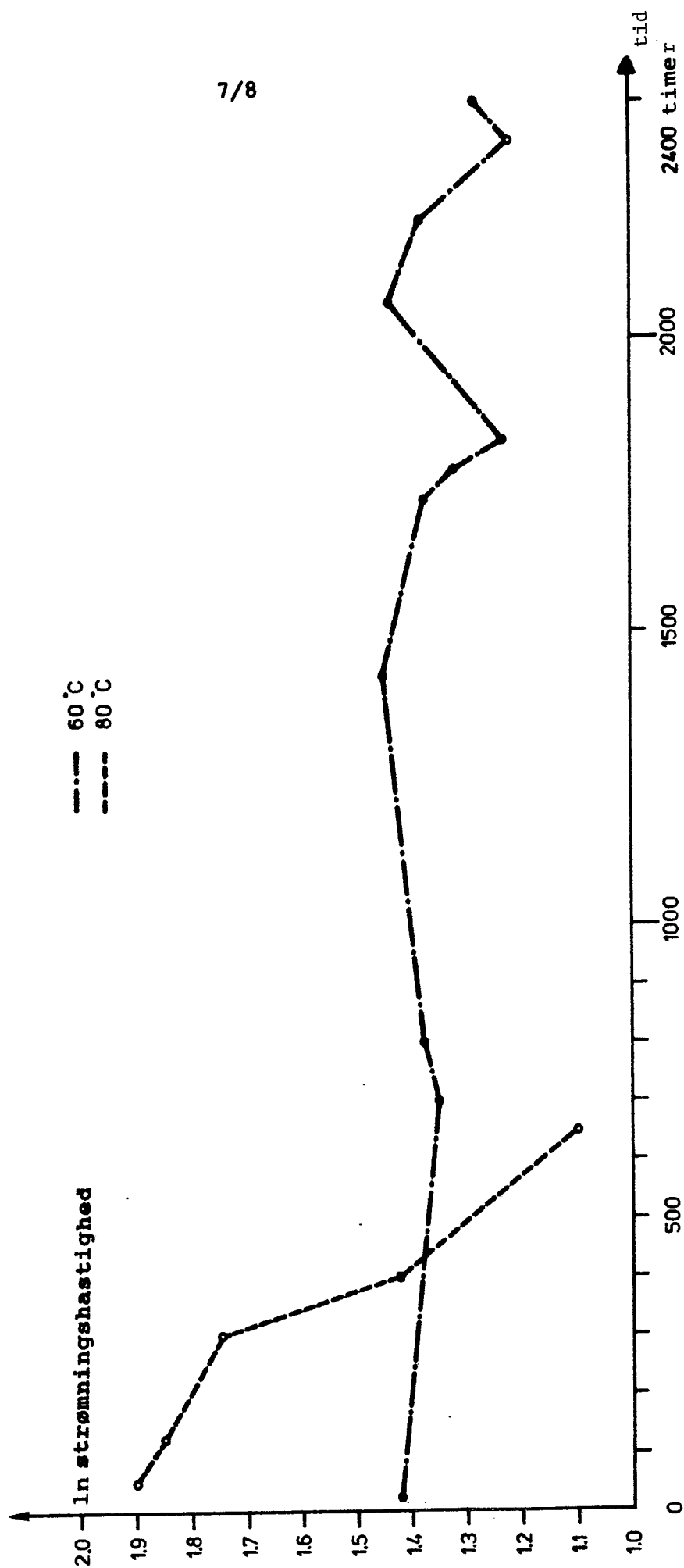


Fig. 9

8/8

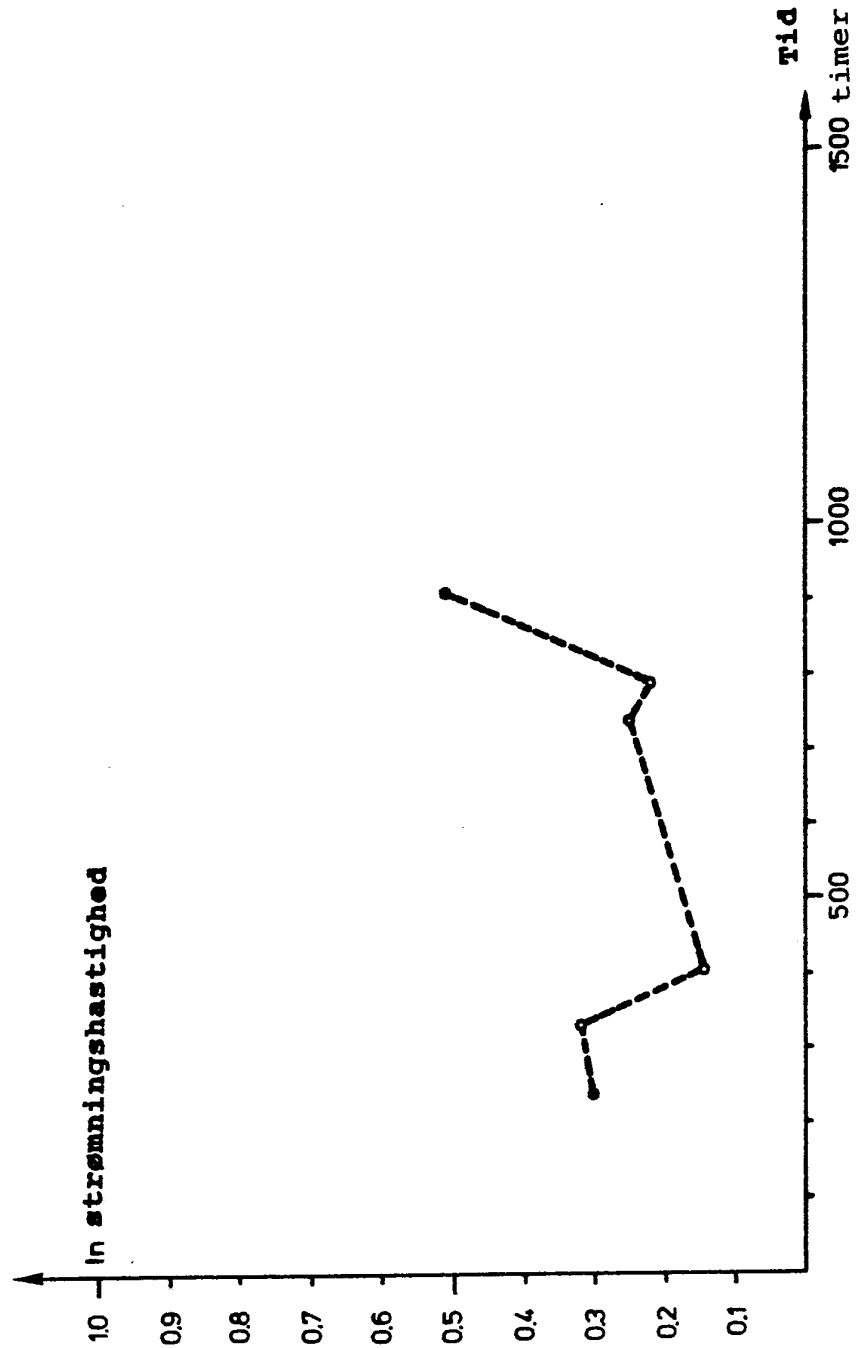


Fig.10