

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 163936 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 0872/86

(51) Int.Cl.5

C 12 N 9/28

(22) Indleveringsdag: 25 feb 1986

(41) Alm. tilgængelig: 27 aug 1986

(44) Fremlagt: 21 apr 1992

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 26 feb 1985 US 705556 20 maj 1985 US 735971

(71) Ansøger: *Miles, Inc.; 1127 Myrtle Street; Elkhart; Indiana 46515, US

(72) Opfinder: Jack William *Brewer; US, Chong Yol *Kim; US

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Co. A/S

(54) Fremgangsmåde til udvinding af alfa-amylase

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer: Chemical Abstracts, vol 84, nr. 87950r.
Kirk Othmer, "Encyclopedia of Chemical
Technology" vol 7 (1979) s. 244-247

(57) Sammendrag:

0872-86

Ved en fremgangsmåde til udvinding af et enzym fra en opløsning deraf, der er opnået ud fra en enzymproducerende mikroorganisme, går man frem på den måde, at man

- (a) koncentrerer den enzymholdige opløsning til overmætning, idet det overmættede koncentrat har en pH-værdi i et område nær ved enzymets isoelektriske punkt,
- (b) fremkalder krystallisation og
- (c) udvinder et enzymkrystal-slutprodukt.

Enzymerne kan opnås fra enhver enzymproducerende mikroorganisme, f.eks. bakterier, fungi og gærsvampe, og fremgangsmåden er særlig effektiv til udvinding af varmestabil α -amylase på krystallinsk form.

UN 103330 D

Opfindelsen angår en særlig fremgangsmåde til udvinding af α -amylase i form af rene krystaller, nærmere betegnet en fremgangsmåde til udvinding af α -amylase udskilt under reguleret fermentering af en bakterie af arten *Bacillus licheniformis* i et egnet vandigt dyrkningsmedium til dannelse af en α -amylase-opløsning indeholdende biomasse og lavmolekylære urenheder fra dyrkningen af bakterien.

Enzymer virker som biokatalysatorer, idet de regulerer mange af de kemiske reaktioner, der naturligt forekommer i levende organismer. Når enzymerne er isolerede, har de også mange industrielle anvendelser samt medicinske anvendelser. Eksempelvis anvendes enzymer i garvnings-, næringsmiddel- og detergent-industrien.

Der er blevet udført megen forskning vedrørende metoder til fældning af enzymer. Eksempelvis beskrives det af Chiang, Alter og Sternberg, "Purification and Characterization of a Thermostable Alpha-Amylase from *Bacillus licheniformis*", *Starke*, Vol 31, nr. 3, side 86-92 (1979), at der kan udføres ammoniumsulfat-fældning af TAKA-THERM[®], et varemærke for Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Indiana, for carbohydrase-enzymmer. I det nævnte litteratursted er den anvendte TAKA-THERM[®] alpha-amylase isoleret fra *Bacillus licheniformis* BLM 1777. Fældningen efterfølges af rensning ved hjælp af cellulosechromatografi. Dernæst kombineres der fraktioner og koncentrerer ved ultrafiltrering. Enzymkoncentratet dialyseres dernæst, hvorpå der tilsættes ammoniumsulfat, indtil der fremkommer uklarhed (begyndelse af fældning).

Dixon et al., "Enzymes", Academic Press, 3. udgave, side 1-40 (1979), diskuterer ammoniumsulfat-krystallisation af enzymer og en variation af denne metode, der omfatter ekstraktion af en ringe mængde af det fældede enzym med kold, fortyndet ammoniumsulfatopløsning.

I Yokoyama et al., "Production and Crystallization of Acid Carboxypeptidase of *Penicillium janthinel-*

lum and Mode of Action on Peptides and Proteins, and Anti-Inflammatory Activities of the Enzyme", Amino Acid Nucleic Acid, bind 35, side 64-75 (1977) diskuteres der kombination af søjlechromatografi med ammoniumsulfat-fældning til udvinding af sur carboxypeptidase.

Uwajima et al., "Production, Purification and Crystallization of Creatinine Deiminase of *Corynebacterium lilium*", Studies on Creatinine Metabolism by Microorganisms, Part II, Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Company, Ltd., Machida-shi, Tokyo, Agric. Biol. Chem., 41(2) (1977), side 339-344, beskriver en fremgangsmåde til opnåelse af krystalliseret creatinin-deiminase, bestående af ammoniumsulfat-fraktionering, protamin-behandling og cellulosechromatografi.

Uwajima et al., "Production, Purification and Crystallization of III Alpha-Hydroxysteroid Dehydrogenase of *Pseudomonas Putida*", Tokyo Research Laboratory, Kyowa Hakko Kogyo Company, Ltd., Machida-shi, Tokyo, Agric. Biol. Chem., bind 42, nr. 8, side 1577-1583 (1978) beskriver en metode til opnåelse af dehydrogenase omfattende fraktionering med ammoniumsulfat og søjlechromatografi på DEAE-cellulose, Sephadex G-100 og hydroxylapatit.

McCary beskriver i US patentskrift nr. 3.642.582 en fremgangsmåde til opnåelse af α -amylase, og denne fremgangsmåde omfatter først fjernelse af polyvalente anioner fra α -amylase-præparater, hvorefter præparaterne bringes i kontakt med fibrøst aluminiumoxid.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at den i det væsentlige består af følgende trin:

- (a) udsættelse af det vandige dyrkningsmedium for væske/fast stof-adskillelseteknik til adskillelse af biomassen fra væskefasen,
- (b) udsættelse af væskefasen for ultrafiltrering ved en temperatur fra 5 til 15°C, indtil dens rumfang udgør ca. 10 til ca. 50% af begyndelses-

rumfanget, til fjernelse af lavmolekylære urenheder, og, uden yderligere rensning,

- (c) inddampning af væskefasen under vakuum ved en temperatur mellem 25 og 39°C under opretholdelse af en pH-værdi mellem 6,8 og 8,1, indtil koncentratets rumfang udgør fra ca. 10 til ca. 20% af, hvad det var efter ultrafiltreringen. til fældning af α -amylasen i form af rene krystaller.

10 Formålet med den foreliggende opfindelse er at tilvejebringe en enkel fremgangsmåde til udvinding af α -amylase på krystallinsk form. Fremgangsmåden udgør en forenkling i forhold til kendte metoder til opnåelse af enzykrystaller derved, at den enzymholdige opløsning forud
15 for induktionen af krystallisation ikke nødvendigvis skal være ren, dvs. fri for i det væsentligt alle opløselige faste stoffer. Endvidere indføres der ifølge den kendte teknik salte eller organiske opløsningsmidler til induktion af krystallisation af enzymer, og dette kan om ønsket gøres,
20 men er ikke nødvendigt i forbindelse med fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse. Når salte og/eller organiske opløsningsmidler anvendes ved fremgangsmåderne ifølge den kendte teknik til induktion af fældning af et enzykompleks, anvendes fældningen ofte ikke som slutprodukt, men blot som et trin i en samlet proces, der resulterer i et flydende slutprodukt. Overmætnings-metoden ifølge
25 den foreliggende opfindelse eliminerer således mange problemer, der er forbundet med de typiske flydende produkter indeholdende industrielle enzymer, f.eks. produktstabilitet, mikrobiel forurening, lav aktivitet, stort rumfang og høje
30 transportomkostninger.

Ved fremgangsmåden ifølge opfindelsen anvendes en ultrafiltrering til nedsættelse af indhold af de opløselige faste stoffer således, at der ved inddampning kan nås en
35 tilstand over overmætning. Den kendte teknik angiver ikke og indeholder ingen antydning om muligheden for at udvinde

rent, krystallinsk α -amylaseenzym ud fra et urent præparat ved anvendelse af den omhandlede teknik. Det er kendt, at urenheder i en enzymopløsning kan interferere med dannelsen af enzymkrystaller eller kan udfældes sammen med enzymet.

- 5 Man har således ment, at det til effektiv krystallisation af et enzym fra en opløsning var nødvendigt at fjerne alle urenheder fra opløsningen, f.eks. ved søjlechromatografi. Den foreliggende opfindelse viser, at den rå fermenteringsvæske kan behandles ved væske/fast stof-separationsteknik, 10 f.eks. centrifugering, til fjernelse af biomassen, hvorpå væsken ultrafiltreres til understøtning af evnen til fordamning for at bringe opløsningen op over dens overmætningspunkt således, at enzymet kan fældes ved formindskelse af mediets volumen ved inddampning.

- 15 På tegningen vises der en grafisk afbildning af en udførelsesform for opfindelsen, hvor enzymet er α -amylase (TAKA-THERM®). På tegningen er Brix-værdien og procentværdien for krystallisation sammenlignet med et multiplum af koncentrationen.

- 20 Ifølge den foreliggende opfindelse går man ud fra en α -amylaseholdig opløsning, og enhver af de forskellige kendte væske/fast stof-separationsmetoder til fjernelse af biomassen, cellefragmenter, uopløselige faste stoffer og lignende, kan anvendes.

- 25 Centrifugering kan f.eks. anvendes til fjernelse af biomassen, hvorved der tilvejebringes en opløsning, der er et cellefrit filtrat indeholdende enzymet.

- Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse omfatter desuden anvendelsen af overmætnings-teknik ved 30 koncentrering af den enzymholdige opløsning. Om ønsket kan den enzymholdige opløsning først fortyndes med vand, og fortyndingen kan efterfølges af anvendelsen af overmætnings-metoder ved koncentrering af opløsningen. En overmættet opløsning er en sådan, der indeholder en 35 større mængde opløst stof, end det normalt er muligt for den mættede opløsning ved den pågældende tempera-

tur, og sådanne overmættede opløsninger er instabile. Et pludseligt chok, støvpartikler eller skrabning på den indre overflade af beholderen indeholdende opløsningen kan virke som et centrum, hvor krystallisationen kan begynde. Der må således drages omsorg for at opretholde den overmættede tilstand, indtil det er ønskeligt, at krystallisationen skal begynde, jvf. Pierce, Sawyer og Haenisch, "Quantitative Analysis", 4. udgave, side 349 (januar 1961).

10 Overmætningen opnås ved hjælp af en kombination af ultrafiltrering (UF) og inddampning. UF udføres ved fra 5 til 15°C, indtil rumfanget er fra ca. 10 til ca. 50% af rumfanget af den oprindelige, enzymholdige opløsning.

Inddampningen udføres under vakuum ved en temperatur 15 mellem 25 og 39°C, indtil koncentratet er overmættet. Ved den foretrukne fremgangsmåde gennemføres fordampningen under et vakuum ved 32°C og ved et trykdifferentiale på fra ca. 500 til ca. 760 mm Hg. Fordampningen under vakuum fortsættes, indtil rumfanget af koncentratet er ca. 10 til 20 ca. 20% af rumfanget efter ultrafiltrering.

Koncentreringen tilvejebringer en overmættet tilstand i opløsningen, i hvilken Brix-værdi-aflæsningen bør ligge på fra ca. 8 til ca. 60% ved 22°C. Brix-værdien angiver mængden af opløselige faste stoffer i opløsning i relation til sucrose som standard. I en udførelsesform 25 ligger Brix-værdien mellem ca. 30 og ca. 40% ved 22°C.

Ved en foretrukken udførelsesform påbegyndes koncentreringen ved UF til ca. 25 til ca. 50% af rumfanget af den oprindelige, enzymholdige opløsning, og der fortsættes 30 dernæst ved inddampning.

pH-værdien skal befinde sig mellem 6,8 og 8,1, dvs. ved et niveau nær enzymets isoelektriske punkt. Forud for koncentreringen til overmætning kan pH-værdien af den oprindelige, α -amylaseholdige opløsning allerede ligge i det 35 ønskede område nær ved enzymets isoelektriske punkt. Yderligere pH-indstilling kan således være unødvendig. Såfremt

på den anden side pH-værdien ikke allerede befinder sig i det ønskede område nær ved enzymets isoelektriske punkt, må pH-værdien på et eller andet tidspunkt under eller efter koncentrationen indstilles på et punkt inden for det ønskede
5 område. Selv om pH-værdien allerede kan være i det ønskede område, kan den imidlertid også indstilles enten nærmere eller endog fjernere fra det isoelektriske punkt, så længe der er tale om et punkt inden for det ønskede område. Det isoelektriske punkt for α -amylase er ca. 7,2, og der anvendes typisk ammoniak eller kaliumhydroxid til pH-indstilling.
10

Efter koncentrationen fremkaldes der krystallisation. Til tider er bevægelsen under UF og inddampningen tilstrækkelig til at forårsage, at krystallisationen begynder spontant, når koncentrationen afsluttes. Sædvanligvis
15 opnås fremkaldelsen af krystallisation imidlertid ved hjælp af f.eks. podning, lydpåvirkning, omrøring eller skrabning af beholderens indre overflade. Typisk omrøres koncentratet med et omrørerorgan af propeltypen i et tidsrum, der er tilstrækkeligt til at bevirke krystallisation af enzymet
20 ved den herskende temperatur. Omrøring som her anvendt skal omfatte alle metoder til at give opløsningen bevægelse og omfatter, men er ikke begrænset til langsom omrøring, agitation (hurtig omrøring) og omrystning, samt den strømmende bevægelse af opløsningen under UF og inddampning.

25 Almindeligvis udføres omrøringen med et blad af propeltypen, der roterer med fra 50 til 400 omdrejninger pr. minut i 24 til 120 timer og ved en temperatur fra 5 til 60°C. Fortrinsvis udføres omrøringen ved en temperatur over stuetemperatur. En typisk temperatur ligger fra
30 23 til 32°C. En temperatur omkring 25°C og et tidsrum omkring 72 timer er mest ønskeligt for α -amylase. Krystallerne udfældes og kan dernæst udvindes ved hjælp af enhver kendt væske-faststof-adskillelsesmetode, f.eks. centrifugering med dekantering eller filtrering.

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen illustreres nærmere i de følgende eksempler.

Varmestabil α -amylase kan fås på følgende måde: Et næringsmedium, der er egnet til fermentering af α -amylase, kan fremstilles ved tilsætning af følgende bestanddele til en 1000 liter gæringsbeholder:

	Calciumchlorid-dihydrat	0,2-1,0	kg
	Mono- og dikaliumphosphat	15-24	kg
	Ammoniumsulfat	2-7	kg
10	Natriumcitrat	0-5	kg
	En sukkerart	100-200	kg
	Bomuldsfrømel	25-40	kg
	Sojamedier	30-50	kg
	Antiskummiddel	8-13	liter
15	Vand til	1000	liter

Mediet podes med levedygtige celler af *Bacillus licheniformis* og får lov at fermentere i 70 til 90 timer ved 40 til 45°C, idet pH-værdien holdes omkring neutralpunktet. Efter denne fermentering flokkuleres mediet med SEPARAN® AP-30® til hjælp ved biomassefjernelse. SEPARAN® AP-30® er et flokkuleringsmiddel, hvis hovedbestanddel er anionisk polyacrylamid, og dette produkt leveres af Dow Chemical Company. Biomassen fjernes ved centrifugering, og centratet renses ved gennemløb gennem Dicalite® FW-6 (en diatoméjord, der leveres af Eagle Pitcher Company), for-overtrukket på et vakuumtromlefilterapparat, hvorved der fås 1000 liter af et cellefrit filtrat med en aktivitet på 50.000 MWU pr. ml som bestemt ved "Manual Liquefying Alpha-Amylase Assay", der er en modifikation af den metode, der er beskrevet af Wohlgemuth i Biochem., 29,1 (1908).

0

Eksempel 1

Koncentrering ved ultrafiltrering af TAKA-THERM[®] -
- α -amylase-cellefrit filtrat med en aktivitet på 50.000
MWU pr. ml udføres i et Romicon HF-4-filterapparat med en
5 adskillelsesmembran med en molekylvægt på 10.000 ved 10°C
til opnåelse af et koncentrat med et rumfang på 300 liter
og en aktivitet på 150.000 MWU pr. ml.

Koncentreringen fortsættes under inddampning un-
der vakuum i en flash-inddamper (Buffalo enkelttrinsfor-
10 ceret cirkulationsvakuuminddamper), med trykdifferentialet
indstillet på 500 til 760 mm Hg ved 32°C, indtil rumfan-
get af koncentratet er nedbragt til 50 liter med en akti-
vitets på 900.000 MWU pr. ml.

Der fås herved et overmættet koncentrat. Koncen-
15 trætets pH-værdi indstilles på 7,6 under anvendelse af
20% 's kaliumhydroxidopløsning, og der omrøres derpå ved
300 omdrejninger pr. minut med et omrørerorgan af pro-
peltypen i 72 timer ved 25°C, hvorved der dannes enzym-
krystaller. De fremkomne enzymkrystaller udvindes ved
20 centrifugering, og overskuddet af væske dekanteres fra.
Enzymudbyttet i krystallerne er 92% af det inddampede
koncentrats totale aktivitet. De tørre krystaller ifølge
dette eksempel har en aktivitet på 8.000.000 MWU pr.
gram tørt materiale og 12.000.000 MWU pr. gram protein.

25

Eksempel 2

Et TAKA-THERM[®]-filtrat på 1000 liter fås fra en
fermentering svarende til den, der anvendes i eksempel 1
til fremstilling af α -amylase-krystaller ved fermentering
30 af Bacillus licheniformis. Filtratet på 1000 liter koncen-
treres til forskellige værdier fra 2 til 20 gange koncen-
trering ved UF ved 10°C under anvendelse af et Romicon-fil-
terapparat med en adskillelsesmembran med en molekylvægt
på 10.000. De ultrafiltrerede koncentreter koncentreter
35 yderligere ved inddampning på en roterende flash-inddamper
(Brinkman-Buchi Rotovapor-R) ved en temperatur på 32°C,

0

således at alle koncentraterne har en gennemsnitlig indledende koncentrataktivitet på ca. 650.000 MWU pr. ml, dvs. i området fra 565.000 til 738.000 MWU pr. ml. Dette resulterer i et overmættet koncentrat. Koncentraternes pH-værdier indstilles på 7,6 med 20%'s kaliumhydroxidopløsning efter vægt pr. rumfangsenhed. Koncentraterne omrøres ved 300 omdrejninger pr. minut med en motordrevet blander i 72 timer ved stuetemperatur (22°C). Krystallerne og den ovenstående væske adskilles ved centrifugering og dekantering. Aktiviteterne i krystallerne og i den ovenstående væske bestemmes ved hjælp af Modified Wohlgemuth-bestemmelsesmetoden (MWU), og de er angivet sammen med den indledende koncentrataktivitet i den følgende tabel.

15 De prøver med et rumfang på hver 20 ml, der indsamles, og som er angivet i tabellens søjle nr. 2, er medtaget, eftersom de anvendes som basis ved bestemmelse af den procentvise udvinding, dvs. disse indledende værdier betegnes som 100%. Rumfangene i søjle nr. 4 er de tilbageblivende rumfang af den ovenstående væske, efter 20 at enzymkrystallerne er fjernet. Enzymaktiviteten i søjle nr. 5 er således aktiviteten i MWU pr. ml, der er tilbage i den ovenstående væske, efter at krystallerne er fjernet, og ud fra disse værdier beregnes den procentvise enzymaktivitetudvinding i den ovenstående væske i søjle nr. 6. 25 Rumfangene i søjle nr. 7 er de totale rumfang, der anvendes efter opløsning af enzymkrystallerne i H₂O, hvorved man således får enzymaktiviteten af krystallerne i MWU pr. ml i søjle nr. 8. Dernæst beregnes den procentvise udvinding 30 af krystallerne i søjle nr. 9 efter den sædvanlige metode under anvendelse af den formel, der angivet under tabellen.

35

Tabel

<u>Begyndelseskoncentrat</u>			<u>Ovenstående væske</u>			<u>Krystal</u>		
<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>	<u>8</u>	<u>9</u>
Antal ganges konc. (efter UF)	Prøverumfang (ml) (efter inddampning)	Akti- vitet MWU/ml	Rumfang (ml)	Aktivitet MWU/ml	% Udvinding	Rumfang (ml) opløste kry- staller	Aktivitet MWU/ml	% Udvinding
2,0	20	565.000	15	356.000	47	70	85.000	53
2,5	20	696.000	15	245.000	26	81	128.000	74
3,3	20	658.000	16	184.000	22	78	131.000	78
5,0	20	696.000	17	138.000	16	210	55.500	84
6,7	20	738.000	16	125.000	14	243	52.300	86
10,0	20	658.000	17	148.000	19	193	55.100	81
20,0	20	738.000	19	615.000	78	66	50.000	22

% Udvinding = Rumfang x enzymaktivitet

Rumfang af koncentrat x enzymaktivitet af koncentrat

Også ved en gennemsnitlig begyndelseskoncentrat-aktivitet på 600.000 MWU pr. ml er resultaterne opsummeret grafisk på tegningen. Ud fra kurven kan det ses, at en gennemsnitlig aktivitet på 600.000 MWU pr. ml med en 6,7 gan-
 5 ges koncentrerings ved ultrafiltrering resulterer i, at fra ca. 85 til ca. 86% af enzymet er på krystalliseret form. Yderligere ultrafiltrering ud over 6,7 ganges koncentrerings forøger ikke krystaldannelsen, men krystallisationen nedsættes derimod drastisk, efterhånden som
 10 Brix-værdien ved 22°C formindskes. Ved en 2 ganges koncentrerings ved UF med 600.000 MWU pr. ml er ca. 52 til ca. 53% af enzymet på krystallinsk form.

Brix-værdien viser mængden af opløselige faste stoffer, der er til stede i opløsningen, i relation til
 15 sucrose som en standard. Kurven viser derfor, at der ved ultrafiltrering fjernes opløselige faste stoffer, som interfererer med krystallisationen. Såfremt tilstrækkeligt af de opløselige faste stoffer ikke fjernes, kan TAKA-THERM®-filtratet ikke indampes til en koncentration, der er høj
 20 nok til, at krystallisation kan forekomme. I stedet vil opløsningen blive så viskos, at yderligere indampning ikke kan udføres. Brix-værdierne på kurven viser det punkt, ved hvilket en tilstrækkelig mængde opløselige faste stoffer er fjernet, således at indampningen kan fort-
 25 sættes tilstrækkelig langt til opnåelse af overmætning til krystallisation som anvendt i dette eksempel.

30

35

P a t e n t k r a v .

- Fremgangsmåde til udvinding af α -amylase udskilt under reguleret fermentering af en bakterie af arten *Bacillus licheniformis* i et egnet vandigt dyrkningsmedium til
- 5 dannelse af en α -amylase-opløsning indeholdende biomasse og lavmolekylære urenheder fra dyrkningen af bakterien, k e n d e t e g n e t ved, at denne fremgangsmåde i det væsentlige består af følgende trin:
- 10 (a) udsættelse af det vandige dyrkningsmedium for væske/fast stof-adskillelseteknik til adskillelse af biomassen fra væskefasen,
- 15 (b) udsættelse af væskefasen for ultrafiltrering ved en temperatur fra 5 til 15°C, indtil dens rumfang udgør ca. 10 til ca. 50% af begyndelsesrumfanget, til fjernelse af lavmolekylære urenheder, og, uden yderligere rensning,
- 20 (c) inddampning af væskefasen under vakuum ved en temperatur mellem 25 og 39°C under opretholdelse af en pH-værdi mellem 6,8 og 8,1, indtil koncentratets rumfang udgør fra ca. 10 til ca. 20% af, hvad det var efter ultrafiltreringen, til fældning af α -amylasen i form af rene krystaller.