



F1000093655B

**(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGNINGSSKRIFT**

93655

C (45) Patentti myöntöty
Patent method 10 00 1000

(51) Kv.1k.6 - Int.cl.6

C 12N 9/00, 9/28, 9/56, C 12C 11/00

S U O M I - F I N L A N D**(FI)****Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	863540
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	02.09.86
(24) Alkupaivä - Löpdag	02.09.86
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	05.03.87
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.01.95
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
04.09.85 US 775031 P	05.08.86 US 890620 P

(71) Hakija - Sökande

1. Solvay Enzymes, Inc., 1003, Industrial Parkway, Elkhart, Ind. 46516, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Brewer, Jack William, 804 Strong Avenue, Elkhart, Ind. 46514, USA, (US)
2. Brothers, Charles Everett, 25481 Jefferson Center Street, Cassopolis, Mich. 49031, USA, (US)
3. Farver, Terry Fred, 53719 Kershner Lane, Elkhart, Ind. 46514, USA, (US)
4. Kim, Chong Yol, 2623 California Road, Elkhart, Ind. 46514, USA, (US)
5. Lee, Eunkyu Kyu, 16730 Trenton Court, Granger, Ind. 46530, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä solun ulkopuolisten entsyymien talteenottamiseksi täysfermentoidusta oluesta
Förfarande för att tillvarata extracellulära enzymer från helfermenterat öl**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

DE A 2639129 (C 07G 7/028), DE A 2512735 (C 07G 7/00),
Patent Abstracts of Japan, vol. 6, nro 10, (C-109) /988/, JP A 57-39796,
Chemical Abstracts, vol. 99, 1983, 18765g, Chemical Abstracts, vol 101, 1984, 189731g,
Starch/Stärke, vol. 31, nro 3, 1979, p. 86-92

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee menetelmää, jossa neste/
neste-faasitekniikkaa käyttäen otetaan
talteen solunulkoisia entsyymejä fermen-
tointiliemestään. Tässä menetelmässä
polymeeria ja suolaa lisätään suoraan
täysin käyneeseen fermentointiliemeen,
jolloin muodostuu runsaasti entsyymiä
sisältävä polymeeripitoinen faasi sekä
biomassan sisältävä, niukasti entsyymiä
sisältävä suolafaasi. Menetelmä on eri-
koisen käyttökelpoinen amylaasin ja/
tai proteaasin talteenottamiseksi nes-
temäisessä muodossa.

Uppfinningen avser ett förfarande, vilket
inbegriper användande av vätske/vätske-
fasteknik vid utvinningen av extracellu-
lära enzymer från deras jäsningspad.
Enligt förfarandet tillsätts en polymer
och ett salt direkt i det helt utjästa
jäsningspadet, varigenom bildas en
enzymrik polymerhaltig fas och en bio-
massahaltig, på enzymer fattig saltfas.
Förfarandet är speciellt användbart för
utvinning av amylas och/eller proteas i
vätskeform.

Menetelmä solun ulkopuolisten entsyymien talteenottamiseksi täysfermentoidusta oluesta

5 Tämä keksintö koskee solunulkoisten entsyymien talteenottamista täysfermentoidusta oluesta lisäämällä täysolueeseen polymeerin ja epäorgaanisen suolan seos.

Teollisten entsyymien tuottaminen viljelemällä mikro-organismejä, kuten bakteereja, sieniä ja hiivaa, vettä sisältävässä ravintoaineessa, on hyvin tunnettua. Riippuen
10 kyseessä olevan mikro-organismin luonteesta tuotetut entsyymit (tuotettu entsyymi) voivat olla solunulkoisia, solunsisäisiä tainiiden seoksia. Kun tuotetut entsyymit (tuotettu entsyymi) ovat solunulkoisia, ne saadaan yleensä ensin erottamalla entsyymiä sisältävä supernatantti mikro-
15 organismisoluista ja ottamalla talteen entsyymi(t) supernatantista hyvin tunnetuilla menetelmillä, kuten saostamalla, ultrasuodatuksella ja haihdutuksella. Kun tuotetut entsyymit (tuotettu entsyymi) ovat solunsisäisiä, ne täytyy ensin vapauttaa soluistaan. Tämä voidaan saada aikaan
20 kemiallisesti ja/tai mekaanisesti. Sen jälkeen, kun entsyymit on saatu liuokseen, ne voidaan ottaa talteen yllä mainituilla hyvin tunnetuilla menetelmillä.

On tunnettua, että solunulkoisilla entsyymeillä on koostumuksia ja ominaisuuksia, jotka ovat erilaisia solunsisäisiin entsyymeihin verrattuina. Solunulkoisilla entsyymeillä yleensä on esimerkiksi huomattavasti alemmat
25 molekyyli-massat kuin solunsisäisillä entsyymeillä. Soluista vapautettuja solunsisäisiä entsyymejä sisältävä liuos sisältää myös merkittäviä määriä muuta solunsisäistä materiaalia, joka ei ole läsnä täysfermentoidussa oluessa,
30 joka sisältää solunulkoisia entsyymejä. Näiden eroavaisuuksien vuoksi voidaan joutua käyttämään erilaisia käsittelyjä niitä talteenotettaessa ja puhdistettaessa myös silloin, kun ne molemmat ovat vesiliuoksessa. Solunsisäisille entsyymeille sopiva talteenottamismenettely ei siten
35

ilmeisesti ole käyttökelpoinen solunulkoisille entsyymeille.

Entsyymituotannon ja -talteenoton tehokkuuden ja tarkoituksenmukaisuuden parantamiseksi on tunnettua, että entsyymejä voidaan tuottaa mikro-organismifermentoinnilla kaksifaasi-ravintoaineessa, joka sisältää polyetyleeniglykolin ja dekstraanin seoksen. Käymisen loputtua solunulkoisen entsyymi konsentroituu ylempään polyetyleeniglykolifaasiin, kun taas solut ja muut käymistuotteet konsentroituvat alempaan dekstraanifaasiin. Tätä on kuvattu julkaisussa *Enzyme and Microb. Technol.* Vol. 7, 333 - 338 (1985). Alfa-amylaasin partitiokerroin esimerkiksi siinä systeemissä on suurimmillaan 4.

Yllä mainitun menettelyn muunnelma on kuvattu yhdysvaltalaisessa patenttijulkaisussa nro 4 508 825, jossa solunulkoista entsyymiä sisältävä supernatantti erotetaan soluista, soluja sisältämätön supernatantti sekoitetaan polyetyleeniglykolin ja kationisen epihalogeenihydriini/polyamiini-kopolymerin tai dekstraani-polymerin kanssa kahden faasin muodostamiseksi. Tätä tekniikkaa voidaan käyttää solunulkoisen proteaasin ja amylaasin erottamiseksi, jolloin proteaasi konsentroituu polyetyleeniglykolifaasiin ja amylaasi konsentroituu kationisen kopolymerin tai dekstraanin faasiin.

Kahden faasin entsyymitalteenottamismenetelmiä on käytetty myös solunsisäisillä entsyymeillä. Yhdysvaltalainen patentti nro 4 144 130 kuvaa (1) korkean molekyylimassan omaavan, substituoimattoman tai substituoitun polyalkoholin, polyeetterin, polyesterin, polyvinyylipyrrolidonin tai polysakkaridin ja epäorgaanisen suolan seoksen käyttöä, tai (2) vähintään kahden yllä mainitun, korkean molekyylimassan omaavan polymerin seoksen käyttöä solunsisäisten entsyymien talteenottamiseksi vesiliuoksesta, johon ne on vapautettu soluista. Käytettäessä esimerkiksi polyetyleeniglykolin ja epäorgaanisen suolan seosta toi-

vottu solunsisäinen entsyymi menee ylempään polyetyleeniglykolikerrokseen, kun taas solujäännökset ja muut käymistuotteet menevät alempaan, suolaa sisältävään kerrokseen. Partitiokerroin erilaisilla talteenotetuilla entsyymeillä
5 glykolikerroksessa oli noin 0,3 käsiteltäessä täysfermentoitua olutta. Partitiokerroin kasvoi ainoastaan arvoon 3, kun pakastettuja soluja sekoitettiin veteen ja hajotettiin niiden entsyymien vapauttamiseksi.

Polyetyleeniglykolin lisääminen epäorgaanisten suolojen avustamiseksi saostettaessa entsyymejä soluja sisältämättömistä liuoksista sisältyy yhdysvaltalaiseen patenttiin nro 4 016 039.

Aiemmin ei ole ehdotettu, että polyetyleeniglykolia ja epäorgaanisia suoloja voitaisiin käyttää kaksifaasimenetelmässä solunulkoisten entsyymien talteenottamiseksi
15 täysfermentoidusta oluesta partitiokertoimien ollessa vähintään 50.

Esillä olevan keksinnön mukaisesti esitetään menetelmä solunulkoisten entsyymien talteenottamiseksi täysfermentoidusta oluesta. Menetelmälle on tunnusomaista, että täysfermentoitu olut, joka sisältää mikroorganismisoluja ja solunulkoista entsyymiä, saatetaan kosketukseen seoksen kanssa, joka sisältää kalsiumklorididihydraattia, mononatrium- tai monokaliumfosfaattia ja mahdollisesti
25 kalsiumhydroksidia, minkä jälkeen siihen lisätään (a) polymeeri, joka on polyetyleeniglykoli, polyetyleeniglykolin amiinijohdannainen, polyetyleeniglykolin karboksylaattijohdannainen, polypropyleeniglykoli, polypropyleeniglykolin amiinijohdannainen, polypropyleeniglykolin karboksylaattijohdannainen, poly(etyleeniglykoli)esteri, polyety-
30 leeni-imiini, trimetyyliamino-polyetyleeniglykoli, polyvinyylialkoholi, polyvinyylipyrrolidoni tai niiden seos, ja (b) epäorgaaninen suola, joka valitaan yhdisteryhmästä, jossa kationit ovat natrium, kalium, magnesium ja ammonium
35 ja anionit ovat sulfaatit, karbonaatit, sitraatit, klori-

dit, fosfaatit ja niiden seokset, täysfermentoitu olut-
polymeeri-suolaseoksen annetaan erottua runsaasti entsyym-
miä sisältäväksi polymeerifaasiksi ja vähän entsyymia si-
sältäväksi suolafaasiksi ja otetaan talteen runsaasti ent-
syymia sisältävä tuote.

Solunulkoisia entsyymejä sisältävät täysfermentoi-
dut oluet, jotka ovat käyttökelpoisia raaka-aineiksi esil-
lä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä, ovat alalla
hyvin tunnettuja. Esimerkiksi *Bacillus licheniformis*,
10 *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* ja *Mucor*
miehei ovat tunnettuja solunulkoisten entsyymien, kuten
esimerkiksi proteaasin, amylaasin ja mikrobijuoksuttimen,
tuottamiseksi kasvatettaessa sopivassa ravintoaineessa.
Tuloksena saatavaa solujäännöksen, solunulkoisten, liu-
15 koisten entsyymien ja muiden käymistuotteiden seosta voi-
daan käyttää esillä olevan keksinnön mukaisessa menetel-
mässä ilman, että lisäksi erotetaan solujäännös liukoisis-
ta entsyymeistä. Tässä yhteydessä käytettynä termi "solu-
jäännös" tarkoittaa sekä kokonaisia soluja että solufrag-
20 mentteja.

Täysfermentoitu olut sekoitetaan sitten polymeerin
ja epäorgaanisen suolan kanssa kaksifaasisysteemin muodos-
tamiseksi. Haluttu solunulkoinen entsyymi kerääntyy poly-
meerifaasiin, kun taas solujäännös kerääntyy suolafaasiin.

25 Edullinen polymeeri on polyetyleeniglykoli. Mikä
tahansa polyetyleeniglykolin muoto, joka on liukoinen vet-
tä sisältävässä täysfermentoidussa oluessa, on sopiva.
Erityisen hyödyllisellä polyetyleeniglykolilla molekyyli-
massa on noin 3 350. Se on kiinteä huoneen lämpötilassa,
30 ja sitä voidaan helposti käsitellä kaupallisessa tuotanto-
mittakaavassa.

Edullisia epäorgaanisia suoloja ovat natriumkloridi
ja natriumsulfaatti.

35 Polymeeriä ja epäorgaanista suolaa lisätään täys-
fermentoituun olueeseen sellaiset määrät, jotta muodostuu

kokonaisseos, joka sisältää 64 - 90 % täysfermentoitua olutta, 1 - 15 % polymeeriä ja 8 - 35 % epäorgaanista suolaa, mainittujen prosenttiosuuksien ollessa painoprosentteja perustuen seoksen kokonaispainoon. Edullista on, että
5 kokonaisseos sisältää 73 - 79 % täysfermentoitua olutta, 3 - 4 % polymeeriä ja 15 - 24 % epäorgaanista suolaa.

Sen jälkeen kun polymeeri ja suola on lisätty, muodostuu kaksi faasia. Polymeerifaasi on yleensä suolafaasin yläpuolella. Kaksi faasia voi muodostua selkeyttämällä,
10 jolloin seoksen annetaan seistä hiljaa noin viisi tuntia. Entsyymiä sisältävä polymeerifaasi voidaan sitten erottaa millä tahansa standardi-neste/neste-erotustekniikalla, kuten sifonoimalla ja dekanttoimalla, entsyymien talteenottamiseksi. Edullista on kuitenkin käyttää sentrifugointia
15 faasien erottamiseksi. Käyttökelpoinen erotin on jatkuva-toiminen, kiinteämaljainen sentrifugi. Jotta saavutettaisiin toivottu entsyymikonsentraatio lopullisessa, erotetussa polymeerifaasissa, on edullista, että runsaasti entsyymiä sisältävän polymeerifaasin tilavuussuhde vähän entsyymiä sisältävään suolafaasiin nähden on 0,12 - 0,15.
20

Jotta kaikkein tehokkaimmin otettaisiin talteen solunulkoinen entsyymi, tulisi sentrifugia käyttää siten, ettei yhtään polymeerifaasia sekoitu suolafaasiin, joka heitetään pois. Tuloksena saatavassa, kerätyssä polymeerifaasissa voi olla sekoittuneena jonkun verran suolafaasia.
25 Seos erotetaan sentrifugoimalla toisen kerran, jolloin sentrifugia käytetään siten, ettei yhtään polymeerifaasia sekoitu suolafaasiin ja siten, että ainoastaan vähäinen määrä suolafaasia on sekoittunut polymeerifaasiin.

Siten kerättyä, runsaasti entsyymiä sisältävää polymeerifaasia voidaan suoraan käyttää entsyymilähteenä.
30 Esimerkiksi emäksinen proteaasi, joka on otettu talteen polyetyleeniglykolifaasiin, on sopiva entsyymipesuainekoostumuksissa. Glykoli on hyödyllinen entsyymien stabilisoinnissa. Jos on toivottua, entsyymi voidaan erottaa
35

polymeeristä tunnetuilla tekniikoilla, kuten saostamalla, ultrasuodatuksella tai haihduttamalla, lähes kokonaan polymeeriä sisältämättömän entsyymituotteen valmistamiseksi.

5 Täysfermentoitu olut esikäsitellään edullisesti seoksella, jossa on 1,5 - 5,0 % kalsiumklorididihydraattia, 0,1 - 1,2 % mononatrium- tai monokaliumfosfaattia ja 0 - 0,6 % kalsiumhydroksidia, mainittujen prosenttien ollessa laskettu paino/tilavuus-perusteella lisäaineen painosta ja fermentoidun oluen tilavuudesta. Tämä esikäsitte-
10 lyvaihe helpottaa solujäännöksen flokkuloimista ja parantaa entsyymien erottumista solujäännöksestä lisäämällä seuraavassa vaiheessa polymeeri ja epäorgaaninen suola. Edullisesti otettaessa talteen proteaasia esikäsitteilyvaiheessa tulisi käyttää 1,5 - 5,0 % kalsiumklorididihydraattia ja 0,2 - 1,2 % mononatrium- tai monokaliumfosfaattia.
15 Otettaessa talteen amylaasia, esikäsitteilyvaiheessa tulisi käyttää 1,5 - 5,0 % kalsiumklorididihydraattia 0,1 - 1,0 % mononatrium- tai monokaliumfosfaattia ja 0,1 - 0,6 % kalsiumhydroksidia.

20 Partitiokerroin on sinänsä tunnettu erottumisen tehokkuuden mittana. Se ilmaistaan entsyymiaktiivisuuskonsentraationa ylä- tai polymeerifaasissa jaettuna entsyymiaktiivisuuskonsentraatiolla pohja- tai epäorgaaninen suola-faasissa. Entsyymiaktiivisuus kussakin faasissa voidaan
25 mitata tunnetuilla menetelmillä. Esillä olevan keksinnön mukaisessa menetelmässä voidaan saavuttaa partitiokerroin ainakin 50, joka on merkittävä edistys verrattuna aikaisempiin menetelmiin.

30 Keksintöä kuvataan yksityiskohtaisemmin seuraavissa esimerkeissä.

Esimerkki 1

Emäksisen proteaasin tuottamiseen sopiva ravintoaine valmistettiin lisäämällä seuraavat aineet 22 712 litran (6 000 gallonan) fermentoriin:

	vehnägluteiini	681	kg	(1500 naulaa)
	natriumsitraatti	74,9	kg	(165 naulaa)
	kalsiumklorididihydraatti	74,9	kg	(165 naulaa)
	maissitärkkelys	2270	kg	(5000 naulaa)
5	soijajauho	1135	kg	(2500 naulaa)
	lämmönkestävä alfa-amylaasi	2,27	kg	(5 naulaa)
	mononatriumfosfaatti	181,6	kg	(400 naulaa)
	dinatriumfosfaatti	181,6	kg	(400 naulaa)
	vaahdonestoaine	62,5	l	(16,5 gal)
10	vesi (mainittuun tilavuuteen asti)	22712	l	(6000 gal)

Ravintoaineeseen siirrostettiin sitten eläviä *Bacillus licheniformis* -soluja ja annettiin fermentoitua 36 tunnin ajan 36 °C:ssa. Tuloksena saatuun täysfermentoituu-
15 olueeseen lisättiin 811 l (214 gal) 70-%:ista (paino/tilavuus) kalsiumklorididihydraatin vesiliuosta ja 136 kg (300 naulaa) mononatriumfosfaattia. Tämä johtaa seokseen, joka sisältää 2,5 % (paino/tilavuus) kalsiumklorididihydraattia ja 0,6 % (paino/tilavuus) mononatriumfosfaattia
20 perustuen kunkin lisäaineen painoon ja fermentoidun oluen tilavuuteen. Seoksen pH pidettiin välillä 6,8 - 7,6 natriumhydroksidin lisäyksen avulla, samalla kun lisäaineita sekoitettiin mukaan. Sen jälkeen kun sekoittuminen oli
25 täydellinen, pH säädettiin välille 7,4 - 7,6 lisäämällä natriumhydroksidia flokkuloitumisen täydellistämiseksi. Sitten pH säädettiin välille 6,4 - 6,6 lisäämällä 50-%:ista etikkahapon vesiliuosta. Tuloksena saatuun seokseen
30 lisättiin 5 260 kg (11 600 naulaa) natriumkloridia lämpötilassa 25 - 27 °C, ja seosta sekoitettiin tunnin ajan kaiken natriumkloridin liuottamiseksi. Sitten lisättiin
35 1 400 kg (3 100 naulaa) polyetyleeniglykolia, jonka molekyylimassa on 3 350, ja 1 930 kg (4 250 naulaa) natriumsulfaattia, ja täysoluen lämpötila kohotettiin välille 30 - 32 °C. Täysoluen pH säädettiin välille 6,0 - 6,2 lisäämällä etikkahappoliuosta, ja koko seosta sekoitettiin kah-

den tunnin ajan. Koko seos sisälsi 15 paino-% natriumkloridia, 4 paino-% polyetyleeniglykolia, 5,5 paino-% natriumsulfaattia ja 75,5 paino-% täysfermentoitua olutta. Prosenttiosuudet laskettiin lisäaineen painosta fermentoidun oluen ja lisäaineiden kokonaismassaa kohden. Sekoittamisen jälkeen, koko seos jakautui ylempään polyetyleeniglykolifaasiin ja alemmaan natriumkloridi-natriumsulfaatti-solujäännös-faasiin. Faasisuhde ylemmän faasin tilavuuden ja alemman faasin tilavuuden välillä oli 0,15.

10 Proteaasiaktiivisuuden konsentraatio ylemmässä faasissa jaettuna proteaasiaktiivisuuden konsentraatilla alemmassa faasissa johti partitiokertoimeen 60 - 80. Jatkuvatoimista kiinteämaljaista sentrifugia käytettiin sitten kahden faasin erottamiseen. Sentrifugi säädettiin ensimmäistä erottamista varten, jossa erottamisessa ei tapahtunut polyetyleeniglykolifaasin sekoittumista suolafaasiin, joka heitettiin pois. Glykolifaasi sisälsi 90 - 92 % fermentaatio-
15 oluen koko entsyymiaktiivisuudesta. Tämä glykolifaasi sisälsi myös noin 5 - 20 % sekoittunutta suolafaasia. Edellä kuvatulla tavalla kerätty glykolifaasi erotettiin toisen kerran käyttäen samanlaista laitetta, jossa käyttöparametrit asetettiin siten, että sallittiin vähemmän kuin kaksi tilavuusprosenttia suolafaasin sekoittumista glykolifaasiin. Suolafaasi heitettiin sitten pois, eikä se sisältänyt yhtään glykolifaasia. Yllä kuvatulla tavalla kerätty glykolifaasi sijoitettiin sitten jäähdytettyyn tankkiin
20 10 °C:ssa natriumsulfaattijäännösten poistamiseksi. Pieni määrä natriumsulfaattikiteitä lisättiin indusoimaan natriumsulfaattikiteiden kasvua. Kahden tunnin kevyen sekoituksen jälkeen 10 °C:ssa, natriumsulfaattia sisältämätön glykolifaasi juoksutettiin pois. Se sekoitettiin sitten aktiivihilleen ja suodatusapuaineeseen ja suodatettiin sitten käyttäen suodatuspainoa. Tuloksena saatua emäksistä, runsaasti proteaasia sisältävää glykoliliuosta voidaan
30 käyttää suoraan nestemäisissä entsyymipesuainekoostumuksissa.

35

Esimerkki 2

Esimerkin 1 menettely toistettiin vaiheesta, jossa lisätään kalsiumklorididihydraatti ja mononatriumfosfaatti. Tuloksena saatu täysfermentoitu olut-lisäaine-seos

5 sekoitettiin sitten 970 kg:aan (2 130 naulaan) polyetyleeniglykolia, jonka molekyylimassa on 3 350, ja 4 850 kg:aan (10 660 naulaan) natriumsulfaattia, ja täysoluen lämpötila nostettiin välille 30 - 32 °C. Koko seosta, joka sisälsi 3 paino-% polyetyleeniglykolia, 15 paino-% natriumsulfaattia ja 82 paino-% täysfermentoitua olutta, sekoitettiin sitten tunnin ajan. Sekoittamisen jälkeen kokonaisseos jakautui ylemmäksi polyetyleeniglykolifaasiksi ja alemmaksi natriumsulfaatti-solujäännös-faasiksi. Ylemmän faasin tilavuuden suhde alemman faasin tilavuuteen oli

10 0,12. Proteaasiaktiivisuuskonsentraatio ylemmässä faasissa jaettuna proteaasiaktiivisuuskonsentraatiolla alemmassa faasissa johti partiotiokertoimeen 60 - 80. Emäksinen proteaasi glykolifaasissa oli amorfisen, kiinteän aineen muodossa. Kaksi faasia erotettiin sitten sentrifugilla, kuten

20 on kuvattu esimerkissä 1, jotta saataisiin aikaan glykolifaasi, joka sisältää amorfista, kiinteää proteaasia ja vähemmän kuin kaksi tilavuusprosenttia sekoittunutta suolafaasia. Kiinteät aineet otettiin sitten talteen sentrifugin avulla, ja niitä voidaan käyttää raeproteaasina raemaisissa entsyymipesuainetuotteissa.

25

Esimerkki 3

Lämmönkestävän alfa-amylaasin valmistamiseen sopiva ravintoaine valmistettiin lisäämällä seuraavat aineet 22 712 litran (6 000 gallonan) fermentoriin:

30	kalsiumklorididihydraatti	10,2 kg	(22,5 naulaa)
	mononatriumfosfaatti	136,2 kg	(300 naulaa)
	dinatriumfosfaatti	317,8 kg	(700 naulaa)
	ammoniumsulfaatti	113,5 kg	(250 naulaa)
	natriumsitraatti	45,4 kg	(100 naulaa)
35	maissin liotusnestettä	454 kg	(1000 naulaa)

	laktoosi	3178 kg	(7000 naulaa)
	puuvillansiemenjauho	681 kg	(1500 naulaa)
	soijajauho	908 kg	(2000 naulaa)
	vaahdonestoaine	625 l	(165 gal)
5	vesi (mainituun tilavuuteen asti)	2712 l	(6000 gal)

Ravintoaineeseen siirrostettiin sitten eläviä *Bacillus licheniformis* -soluja ja annettiin fermentoitua 108 - 110 tunnin ajan 42 °C:ssa, samalla kun pH pidettiin välillä 7,05 - 7,15 lisäämällä ajoittain natriumhydroksidia. Tuloksena saatuun täysfermentoituun olueeseen lisättiin 1 300 l (434 gal) 70-%:ista (paino/tilavuus) kalsiumklorididihydraatin vesiliuosta, 908 l (240 gal) 10-%:ista (paino/tilavuus) kalsiumhydroksidin vesiliuosta ja 27 kg (60 naulaa) monokaliumfosfaattia. Tämä johti seokseen, joka sisälsi 4 % (paino/tilavuus) kalsiumklorididihydraattia, 0,4 % (paino/tilavuus) kalsiumhydroksidia ja 0,12 % (paino/tilavuus) monokaliumfosfaattia perustuen kunkin 20 lisääineen painoon ja fermentoidun oluen tilavuuteen. Seoksen pH pidettiin välillä 7,6 - 8,4 lisääaineita sekoittaessa lisäämällä natriumhydroksidia. Sen jälkeen kun sekoittuminen oli täydellinen, pH säädettiin välille 8,4 - 8,6 lisäämällä natriumhydroksidia. Tuloksena saatuun seokseen lisättiin 1 180 kg (2 600 naulaa) polyetyleeniglykolia, jonka molekyylimassa on 3 350, ja 3 370 kg (7 420 naulaa) natriumkloridia lämpötilassa 25 - 27 °C, ja seoksen annettiin sekoittua vähintään tunnin ajan. Natriumsulfaattia lisättiin sitten 2 700 kg (5 940 naulaa), ja fermentoidun oluen seosta kuumennettiin 30 - 32 °C:seen, pH säädettiin välille 7,9 - 8,1 lisäämällä natriumhydroksidia ja kokonaisseosta sekoitettiin vähintään kahden tunnin ajan. Kokonaisseos sisälsi 3,5 paino-% polyetyleeniglykolia, 10 paino-% natriumkloridia, 8 paino-% natriumsulfaattia ja 78,5 paino-% täysfermentoitua olutta. Sekoittamisen 35 jälkeen kokonaisseos erottui ylemmäksi polyetyleeniglyko-

lifaasiksi ja alemmaksi natriumkloridi-natriumsulfaattisolujäännös-faasiksi. Ylemmän faasin tilavuuden faasisuhde alemman faasin tilavuuteen oli 0,12. Amylaasiaktiivisuuskonsentraatio ylemmässä faasissa jaettuna amylaasiaktiivisuuskonsentratilla alemmassa faasissa johti partitioker-toimeen 50 - 70. Jatkuvatoimista kiinteämaljaista sentrifugia käytettiin, kuten esimerkissä 1 kuvattiin, runsaasti amylaasia sisältävän glykolifaasin talteenottamiseksi, joka faasi sitten puhdistettiin, kuten on kuvattu esimerkissä 1, runsaasti amylaasia sisältävän glykolituotteen valmistamiseksi.

Esimerkki 4

Alfa-amylaasin tuottamiseen sopiva ravintoaine valmistettiin lisäämällä seuraavat aineet 22 712 l (6 000 gallonan) fermentoriin;

15	kalsiumkarbonaatti	241,6 kg	(530 naulaa)
	kalajauho	340,5 kg	(750 naulaa)
	jauhettu soijajauho	1271 kg	(2800 naulaa)
	maissin liotusneste	681 kg	(1500 naulaa)
20	laktoosi	3178 kg	(7000 naulaa)
	diammoniumfosfaatti	59 kg	(130 naulaa)
	vaahdonestoaine	151,4 l	(40 naulaa)
	vesi (mainittuun tilavuuteen asti)	22712 l	(6000 gal)

25

Ravintoaineeseen siirrostettiin sitten eläviä *Bacillus amyloliquefaciens* -soluja ja annettiin fermentoitua 60 tunnin ajan 34 °C:ssa, samalla kun pH pidettiin välillä 7,05 - 7,15 lisäämällä ajoittain natriumhydroksidia. Tuloksena saatuun täysfermentoituun olueeseen lisättiin 973 l (257 gal) 70-%:ista (paino/tilavuus) kalsiumklorididihydraatin vesiliuosta, 681 l (180 gal) 10-%:ista (paino/tilavuus) kalsiumhydroksidin vesiliuosta ja 136 kg (300 naulaa) monokaliumfosfaattia. Tämä johtaa seokseen, joka sisältää 3 % (paino/tilavuus) kalsiumklorididihydraattia, 0,3 % (paino/tilavuus) kalsiumhydroksidia ja 0,6 % (paino/

35

tilavuus) monokaliumfosfaattia perustuen kunkin lisäaineen painoon ja fermentoidun oluen tilavuuteen. Seoksen pH pidettiin lisäaineita lisättäessä välillä 6,8 - 7,6 lisäämällä natriumhydroksidia. Sen jälkeen, kun sekoittuminen oli täydellinen, pH säädettiin välille 7,4 - 7,6 lisäämällä natriumhydroksidia. Tuloksena saatuun seokseen lisättiin 1 140 kg (2 510 naulaa) polyetyleeniglykolia, jonka molekyylimassa on 3 350, ja 3 600 kg (7 960 naulaa) natriumkloridia lämpötilassa 25 - 27 °C, ja seoksen annettiin sekoittua vähintään tunnin ajan. Sitten lisättiin natriumsulfaattia 4 870 kg (10 700 naulaa), ja fermentoidun oluen seosta kuumennettiin 30 - 32 °C:een. pH säädettiin välille 7,4 - 7,6 lisäämällä natriumhydroksidia ja kokonaisseosta sekoitettiin vähintään kahden tunnin ajan. Kokonaisseos sisälsi 3,15 paino-% polyetyleeniglykolia, 10 paino-% natriumkloridia, 13,5 paino-% natriumsulfaattia ja 73,35 paino-% täysfermentoitua olutta. Sekoittamisen jälkeen kokonaisseos erottui kahdeksi faasiksi, kuten on kuvattu esimerkiksi 3, siten että faasisuhde oli 0,12 ja partitiokeroin 50 - 70. Faasit käsiteltiin, kuten esimerkissä 3 on kuvattu, jolloin saatiin runsaasti amylaasia sisältävä glykoluote.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä solunulkoisen entsyymin talteenottamiseksi täysfermentoidusta oluesta, t u n n e t t u siitä, että täysfermentoitu olut, joka sisältää mikroorganis-
5 misoluja ja solunulkoista entsyymiä, saatetaan kosketukseen seoksen kanssa, joka sisältää kalsiumklorididihydraattia, mononatrium- tai monokaliumfosfaattia ja mahdollisesti kalsiumhydroksidia, minkä jälkeen siihen lisätään
10 (a) polymeeri, joka on polyetyleeniglykoli, polyetyleeniglykolin amiinijohdannainen, polyetyleeniglykolin karboksylaattijohdannainen, polypropyleeniglykoli, polypropyleeniglykolin amiinijohdannainen, polypropyleeniglykolin karboksylaattijohdannainen, poly(etyleeniglykoli)esteri, polyetyteeni-imiini, trimetyyliamino-polyetyleeniglykoli,
15 polyvinyylialkoholi, polyvinyylipyrrolidoni tai niiden seos, ja (b) epäorgaaninen suola, joka valitaan yhdisteryhmästä, jossa kationit ovat natrium, kalium, magnesium ja ammonium ja anionit ovat sulfaatit, karbonaatit, sitraatit, kloridit, fosfaatit ja niiden seokset, täysfermentoitu olut-polymeeri-suolaseoksen annetaan erottua runsaasti entsyymiä sisältäväksi polymeerifaasiksi ja vähän entsyymiä sisältäväksi suolafaasiksi ja otetaan talteen runsaasti entsyymiä sisältävä tuote.

25 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että täysfermentoidun oluen, polymeerin ja epäorgaanisen suolan seos sisältää 64 - 90 %, edullisesti 73 - 79 % täysfermentoitua olutta, 1 - 15 %, edullisesti 3 - 4 % polymeeriä ja 8 - 35 %, edullisesti 15
30 - 24 % epäorgaanista suolaa, jolloin prosenttiosuudet perustuvat paino-osuuksiin seoksen kokonaispainosta.

35 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että polymeeri on polyetyleeniglykoli ja epäorgaaninen suola on natriumkloridin ja natriumsulfaatin seos tai natriumsulfaatti yksistään.

4. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ennen kuin polymeeri ja epäorgaaninen suola lisätään, täysfermentoitu olut saatetaan kosketukseen seoksen kanssa, jossa on 1,5 - 5,0 % kalsiumklorididihydraattia, 0,1 - 1,2 % mononatrium- tai monokaliumfosfaattia ja 0 - 0,6 % kalsiumhydroksidia, jolloin prosenttiosuudet on laskettu paino/tilavuus-perusteella lisäaineiden painosta fermentoidun oluen tilavuuteen nähden.

5. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että täysfermentoitu olut saatetaan kosketukseen seoksen kanssa, jossa on 1,5 - 5,0 % kalsiumklorididihydraattia ja 0,2 - 1,2 % mononatriumfosfaattia tai monokaliumfosfaattia.

6. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että täysfermentoitu olut saatetaan kosketukseen seoksen kanssa, jossa on 1,5 - 5,0 % kalsiumklorididihydraattia, 0,1 - 0,6 % kalsiumhydroksidia ja 0,1 - 1,0 % mononatrium- tai monokaliumfosfaattia.

7. Jonkin patenttivaatimuksista 1 - 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että runsaasti entsyymiä sisältävän polymeerifaasin tilavuussuhde vähän entsyymiä sisältävän suolafaasin tilavuuteen on 0,12 - 0,15.

8. Menetelmä solunulkoisen alkalisen proteaasin talteenottamiseksi, jolloin fermentoidaan sopiva Bacillus licheniformis-kanta sopivassa ravintoaineessa täysfermentoidun oluen tuottamiseksi, joka täysfermentoitu olut sisältää Bacillus licheniformis-soluja ja solunulkoista, alkalista proteaasia, t u n n e t t u siitä, että täysfermentoituun olueeseen lisätään 2,5 % kalsiumklorididihydraattia ja 0,6 % mononatrium- tai monokaliumfosfaattia, jolloin prosenttiosuudet on laskettu paino/tilavuus-perusteella lisäaineen painosta fermentoidun oluen tilavuuteen nähden, edellä kuvattuun seokseen lisätään 3 % polyetylee-

niglykolia ja 15 % natriumsulfaattia, jolloin prosenttiosuudet perustuvat paino-osuuksiin fermentoidun oluen ja lisäaineiden kokonaisseoksen painosta, muodostetaan runsaasti alkalista proteaasia sisältävä polyetyleeniglykolifaasi ja vähän alkalista proteaasia sisältävä natriumsulfaattifaasi, ja erotetaan kaksi faasia runsaasti alkalista proteaasia sisältävän tuotteen talteenottamiseksi.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kalsiumklorididihydraatin ja mononatrium- tai monokaliumfosfaatin lisäyksen jälkeen seos saatetaan kosketukseen 15 % natriumkloridia, 4 % polyetyleeniglykolia ja 5,5 % natriumsulfaattia kanssa, jolloin prosenttiosuudet perustuvat paino-osuuksiin fermentoidun oluen ja lisäaineiden kokonaisseoksen painosta.

10. Menetelmä solunulkoisen lämmönkestävän alfa-amylaasin talteenottamiseksi, jolloin fermentoidaan sopiva Bacillus licheniformis-kanta sopivassa ravintoaineessa täysfermentoidun oluen tuottamiseksi, joka täysfermentoitu olut sisältää Bacillus licheniformis-soluja ja solunulkoista alfa-amylaasia, t u n n e t t u siitä, että täysfermentoituun olueeseen lisätään 0,4 % kalsiumhydroksidia, 0,12 % mononatrium- tai monokaliumfosfaattia ja 4 % kalsiumklorididihydraattia, jolloin prosenttiosuudet on laskettu paino/tilavuus-perusteella lisäaineen painosta fermentoidun oluen tilavuuteen nähden, edellä kuvattuun seokseen lisätään 3,5 % polyetyleeniglykolia, 10 % natriumkloridia ja 8 % natriumsulfaattia, jolloin prosenttiosuudet perustuvat paino-osuuksiin fermentoidun oluen ja lisäaineiden kokonaisseoksen painosta, muodostetaan runsaasti amylaasia sisältävä polyetyleeniglykolifaasi ja vähän amylaasia sisältävä natriumkloridi-natriumsulfaattifaasi ja erotetaan kaksi faasia runsaasti amylaasia sisältävän tuotteen talteenottamiseksi.

11. Menetelmä solunulkoisen alfa-amylaasin talteenottamiseksi, jolloin fermentoidaan sopiva Bacillus amylo-

liquefaciens-kanta sopivassa ravintoaineessa täysfermentoidun oluen tuottamiseksi, joka täysfermentoitu olut sisältää *Bacillus amyloliquefaciens*-soluja ja solunulkoista alfa-amylaasia, t u n n e t t u siitä, että täysfermentoituu olueeseen lisätään 3 % kalsiumklorididihydraattia, 0,3 % kalsiumhydroksidia ja 0,6 % mononatrium- tai monokaliumfosfaattia, jolloin prosenttiosuudet on laskettu paino/tilavuus-perusteella lisäaineen painosta fermentoidun oluen tilavuuteen nähden, edellä kuvattuun seokseen lisätään 3,15 % polyetyleeniglykolia, 10 % natriumkloridia ja 13,5 % natriumsulfaattia, jolloin prosenttiosuudet perustuvat paino-osuuksiin fermentoidun oluen ja lisäaineiden kokonaisuuteen painosta, muodostetaan runsaasti amylaasia sisältävä polyetyleeniglykolifaasi ja vähän amylaasia sisältävä natriumkloridi-natriumsulfaattifaasi ja erotetaan kaksi faasia runsaasti amylaasia sisältävän tuotteen talteenottamiseksi.

Patentkrav

1. Förfarande för att tillvarata ett extracellulärt enzym från helfermenterat öl, k ä n n e t e c k n a t
5 därav, att i helfermenterat öl, som innehåller mikroorga-
nismceller och ett extracellulärt enzym, bringas i kontakt
med en blandning, vilken innehåller kalciumkloriddihydrat,
mononatrium- eller monokaliumfosfat och eventuellt kal-
ciumhydroxid, varefter däri tillsätts (a) en polymer som
10 är polyetylenglykol, ett aminderivat av polyetylenglykol,
ett karboxylatderivat av polyetylenglykol, polypropylen-
glykol, ett aminderivat av polypropylenglykol, ett kar-
boxylatderivat av polypropylenglykol, en poly(etylengly-
kol)ester, polyetylenimin, trimetylamino-polyetylenglykol,
15 polyvinylalkohol, polyvinylpyrrolidon eller en blandning
av dessa, och (b) ett oorganiskt salt, som väljs ur en
föreningsgrupp där katjonerna är natrium, kalium, magne-
sium och ammonium och anjonerna är sulfater, karbonater,
citrater, klorider, fosfater och blandningar av dessa,
20 helfermenterat öl-polymer-saltblandningen får separera
till en polymerfas innehållande rikligt med enzym och en
saltfas innehållande lite enzym och en produkt innehållan-
de rikligt med enzym tas tillvara.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e -
25 t e c k n a t därav, att blandningen av helfermenterat
öl, polymer och oorganiskt salt innehåller 64 - 90 %, för-
delaktigt 73 - 79 % helfermenterat öl, 1 - 15 %, fördelak-
tigt 3 - 4 % polymer och 8 - 35 %, fördelaktigt 15 - 24 %
oorganiskt salt, varvid procentandelarna baserar sig på
30 viktandelar av blandningens totala vikt.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2,
k ä n n e t e c k n a t därav, att polymeren är polyety-
lenglykol och det oorganiska saltet är en blandning av
natriumklorid och natriumsulfat eller enbart natriumsul-
35 fat.

4. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3,
k ä n n e t e c k n a t därav, att innan polymer och oor-
ganiskt salt tillsätts, bringas det helfermenterade ölet i
kontakt med en blandning innehållande 1,5 - 5,0 % kalcium-
5 kloriddihydrat, 0,1 - 1,2 % mononatrium- eller monokalium-
fosfat och 0 - 0,6 % kalciumhydroxid, varvid procentande-
larna har räknats på vikt/volym-basis på vikten av till-
satsämnen i förhållande till volymen av fermenterat öl.

5. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3,
10 k ä n n e t e c k n a t därav, att det helfermenterade
ölet bringas i kontakt med en blandning innehållande 1,5 -
5,0 % kalciumkloriddihydrat och 0,2 - 1,2 % mononatrium-
eller monokaliumfosfat.

6. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 3,
15 k ä n n e t e c k n a t därav, att det helfermenterade
ölet bringas i kontakt med en blandning innehållande 1,5 -
5,0 % kalciumkloriddihydrat, 0,1 - 0,6 % kalciumhydroxid
och 0,1 - 1,0 % mononatrium- eller monokaliumfosfat.

7. Förfarande enligt något av patentkraven 1 - 6,
20 k ä n n e t e c k n a t därav, att volymförhållandet av
polymerfasen innehållande rikligt med enzym till volymen
av saltfasen innehållande lite enzym är 0,12 - 0,15.

8. Förfarande för att tillvarata en extracellulär
alkalisk proteas, varvid en lämplig *Bacillus licheniformis*-
25 mis-stam fermenteras i ett lämpligt näringsmedium för att
producera helfermenterat öl, som innehåller *Bacillus*
licheniformis-celler och en extracellulär alkalisk pro-
teas, k ä n n e t e c k n a t därav, att man i helfer-
menterat öl tillsätter 2,5 % kalciumkloriddihydrat och 0,6
30 % mononatrium- eller monokaliumfosfat, varvid procentande-
larna har räknats på vikt/volym-basis på vikten av till-
satsämne i förhållande till volymen av fermenterat öl, i
ovannämnda blandning tillsätter 3 % polyetylenglykol och
15 % natriumsulfat, varvid procentandelarna baserar sig på
35 viktandelar av vikten av totalblandningen av fermenterat

öl och tillsatsämnen, bildar en polyetylenglykolfas innehållande rikligt med alkaliskt proteas och en natriumsulfatfas innehållande lite alkaliskt proteas, och separerar de två faserna för tillvaratagande av en produkt innehållande rikligt med alkaliskt proteas.

9. Förfarande enligt patentkravet 8, k ä n n e t e c k n a t därav, att blandningen efter tillsats av kalciumkloriddihydrat och mononatrium- eller monokaliumfosfat bringas i kontakt med 15 % natriumklorid, 4 % polyetylenglykol och 5,5 % natriumsulfat, varvid procentandelarna baserar sig på viktandelar av vikten av totalblandningen av fermenterat öl och tillsatsämnen.

10. Förfarande för att tillvarata ett extracellulärt värmestabilt alfa-amylas, varvid en lämplig Bacillus licheniformis-stam fermenteras i ett lämpligt näringsmedium för att producera helfermenterat öl, som innehåller Bacillus licheniformis-celler och ett extracellulärt alfa-amylas, k ä n n e t e c k n a t därav, att man i helfermenterat öl tillsätter 0,4 % kalciumhydroxid, 0,12 % mononatrium- eller monokaliumfosfat och 4 % kalciumkloriddihydrat, varvid procentandelarna har räknats på vikt/volymp-basis på vikten av tillsatsämne i förhållande till volymen av fermenterat öl, i ovannämnda blandning tillsätter 3,5 % polyetylenglykol, 10 % natriumklorid och 8 % natriumsulfat, varvid procentandelarna baserar sig på viktandelar av vikten av totalblandningen av fermenterat öl och tillsatsämnen, bildar en polyetylenglykolfas innehållande rikligt med amylas och en natriumklorid-natriumsulfatfas innehållande lite amylas, och separerar de två faserna för tillvaratagande av en produkt innehållande rikligt med amylas.

11. Förfarande för att tillvarata ett extracellulärt alfa-amylas, varvid en lämplig Bacillus amyloliquefaciens-stam fermenteras i ett lämpligt näringsmedium för att producera helfermenterat öl, som innehåller Bacillus

amyloliquefaciens-celler och ett extracellulärt alfa-amylas, k ä n n e t e c k n a t därav, att man i helfermenterat öl tillsätter 3 % kalciumkloriddihydrat, 0,3 % kalciumhydroxid och 0,6 % mononatrium- eller monokaliumfosfat, varvid procentandelarna har räknats på vikt/volymbasis på vikten av tillsatsämne i förhållande till volymen av fermenterat öl, i ovannämnda blandning tillsätter 3,15 % polyetylenglykol, 10 % natriumklorid och 13,5 % natriumsulfat, varvid procentandelarna baserar sig på viktandelar av vikten av totalblandningen av fermenterat öl och tillsatsämnen, bildar en polyetylenglykolfas innehållande rikligt med amylas och en natriumklorid-natriumsulfatfas innehållande lite amylas, och separerar de två faserna för tillvaratagande av en produkt innehållande rikligt med amylas.