

(19) DANMARK



DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENEN



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 145503 B

(21) Ansøgning nr. 124/74

(51) Int.Cl.³ C 12 N 9/92

(22) Indleveringsdag 10. jan. 1974

(24) Løbedag 10. jan. 1974

(41) Alm. tilgængelig 13. jul. 1974

(44) Fremlagt 29. nov. 1982

(86) International ansøgning nr. -

(86) International indleveringsdag -

(85) Videreførelsesdag -

(62) Stamansøgning nr. -

(30) Prioritet 12. jan. 1973, 1773/73, GB

(71) Ansøger NOVO TERAPEUTISK LABORATORIUM A/S, Bagsværd, DK.

(72) Opfinder Helle Outtrup, DK.

(74) Fuldmægtig Ingeniørfirmaet Budde, Schou & Co.

(54) Glucoseisomerase.

DK 145503 B

0

Opfindelsen angår en glucoseisomerase, der er ejendommelig ved, at den er identisk med den glucoseisomerase, der dannes ved dyrkning af stammen *Bacillus coagulans* NRRL B 5650 under aerobe betingelser og under anvendelse af et dyrkningsmedium omfattende en nitrogenkilde, en carbonkilde og små mængder uorganiske salte, ved en pH-værdi mellem 5 og 9 og en temperatur mellem 40°C og 65°C.

10 Sirupper indeholdende en blanding af glucose og fructose anvendes i vid udstrækning i industrien på grund af deres søde smag og deres ringe tendens til krystallisation. Sådanne sirupper fremstilles fortrinsvis ud fra glucosesirupper under anvendelse af et enzym til katalyse af isomeriseringen af glucose til fructose. Det er vigtigt for økonomien ved denne proces, at enzymomkostningerne er lave, og at der kun dannes biprodukter i 15 negligerbar grad, idet der her tænkes på biprodukter, som må fjernes, inden siruppen kan anvendes.

Enzymer, der er i stand til at isomerisere glucose til fructose, kan fås fra et stort antal forskellige mikroorganismearter, og enzymernes egenskaber varierer fra 20 art til art. Enzymegenskaber, der er særligt vigtige for anvendelsen ved isomeriseringsprocessen, er stabilitet ved høje temperaturer og aktivitet ved lave pH-værdier.

25 Ved en enzymatisk isomerisering af glucose til fructose er følgende betingelser af betydning:

pH-værdi: En pH-værdi, der er så lav som muligt, er ønskelig til undgåelse af den alkali-katalyserede biprodukt-dannelse, dvs. under pH=7. En pH-værdi på 5-7 repræsenterer et passende område. 30

Temperatur: Enzymet bør være stabilt ved en temperatur på fra ca. 55°C til ca. 75°C, hvilket er den sædvanlige reaktionstemperatur.

35 Opløselighed: I mange tilfælde er det ønskeligt at anvende mikroorganismecellerne, som indeholder enzymet intracellulært, til isomeriseringen. Det er derfor meget betydningsfuldt, at så lidt som muligt af enzymet trænger ud i reaktionsblandingen under isomeriseringen eller under håndteringen

0 af cellerne efter isomeriseringen. Det er endvidere af betydning ved fremstillingen af enzympræparatet, at cellerne let kan tørres på en sådan måde, at enzymet ikke trænger ud af cellerne.

5 Ved andre metoder er et opløseligt enzym ønskeligt. Dette kan anvendes enten direkte, eller det kan gøres uopløseligt ved kobling til en uopløselig bærer. Ved denne proces er det betydningsfuldt, at enzymet let kan ekstraheres fra cellerne.

10 Da prismargenen mellem glucose og isomeriseret glucose er meget lille, er det endvidere yderst vigtigt, at produktionsudbyttet af enzymet er højt, således at prisen på enzympræparatet kan blive tilstrækkeligt lav.

15 Det har nu vist sig, at glucoseisomerasen ifølge opfindelsen, som på reproducerbar måde kan fremstilles ved dyrkning af stammen *Bacillus coagulans* NRRL B 5650, har en yderst god varmestabilitet og et meget lavt pH-optimum.

20 Den omhandlede mikroorganisme er en aerob, sporedannende, stavformet bakterie. Den må klassificeres som hørende til en termofil *Bacillus*-art, og den kan mere specifikt identificeres som en atypisk *Bacillus coagulans*, som adskiller sig fra de typiske *Bacillus coagulans*-stammer ved en evne til at vokse ved 65°C og en evne til at vokse på uorganiske nitrogenkilder.

25 En biokemisk forskel, der er af betydning for den foreliggende opfindelse, er, at glucoseisomerase-enzymet fra den atypiske *Bacillus coagulans* NRRL B 5650 rent faktisk adskiller sig fra glucoseisomerasen fra (typisk) *Bacillus coagulans*, navnlig med hensyn til termisk stabilitet og virkningen af pH og temperatur på aktiviteten. Glucoseisomerasen ifølge den foreliggende opfindelse er mere termostabil, og dens aktivitet ved 30 pH=5-7 er lige så god, om ikke bedre. Alt i alt er det givet, at der er tale om et andet enzym.

0

Glucoseisomerasen ifølge opfindelsen udviser således overraskende, betydningsfulde fordele i sammenligning med det kendte enzymprodukt, der er mest beslægtet med enzymet ifølge opfindelsen, nemlig det enzymprodukt, der er beskrevet i dansk patentansøgning nr. 6265/71, idet den mest iøjenfaldende forskel er det foreliggende enzyms termofile karakter. Fordelene ved enzymet ifølge opfindelsen fremgår tydeligt af de i det følgende refererede sammenligningsforsøg:

10

Den termofile, atypiske *Bacillus coagulans* NRRL B 5650 er sammenlignet med den typiske *Bacillus coagulans* NRRL B 5350 (jfr. nr. 6265/71).

15

1. NRRL B 5650 har optimal vækst ved 55-60°C, og den maksimale væksttemperatur er 65°C.

NRRL B 5650 vokser udmærket på mineralske substrater uden organisk nitrogen.

20

2. NRRL B 5350 (en typisk *B. coagulans*) har optimal vækst ved 45-50°C, og den maksimale væksttemperatur er 55°C.

NRRL B 5350 vokser meget dårligt på mineralske substrater, hvis der ikke er organiske nitrogenkilder til stede.

25

3. De to nævnte bakteriestammer blev dyrket i rystekolber, som angivet i ansøgningens eksempel 2, den termofile, atypiske NRRL B 5650 ved 50°C og den typiske NRRL B 5350 ved 40°C. Efter 24 timers inkubering blev bakterierne centrifugeret fra substratet, og de frysetørrede celler indeholdende glucoseisomerase-enzymet blev anvendt til de sammenligningsforsøg, hvis resultater fremgår af de følgende tabeller:

30

Tabel I

35

Henstandsforsøg til sammenligning af glucoseisomerasernes stabilitet ved 70°C og ved 80°C. Bakterierne blev suspenderet i 0,9% NaCl, således at enzymaktiviteten i de 2 suspensioner var af samme størrelsesorden.

0

5

10

Henstand		Restaktivitet af glucoseisomerase fra:	
		NRRL B 5350	NRRL B 5650 (iflg. opfindelsen)
ved:	timer:	(typisk B.coagulans)	(termofil, atypisk B.coagulans)
70°C	6	65%	90%
	24	60%	85%
80°C	6	17%	75%
	24	0%	50%

15

Tabel II

Sammenligning af glucoseisomerases termostabilitet ved to forskellige pH-værdier (0,1 M phosphatpuffer).

20

25

30

35

Henstand			Restaktivitet af glucoseisomerase fra:	
			NRRL B 5350	NRRL B 5650 (iflg. opfindelsen)
ved:	pH	timer:	(typisk)	(termofil, atypisk)
70°C	6,5	4	80%	80%
		24	65%	75%
	7,0	4	70%	100%
		24	70%	100%
	6,5	4	20%	75%
		24	0%	60%
80°C	7,0	4	20%	80%
		24	0%	20%

Det ses, at omend den typiske B.coagulans producerer en ret stabil glucoseisomerase, er den termofile variants enzym langt mere termostabil.

Tabel III

5 Sammenligning af de to glucoseisomerasers aktivitet ved en række forskellige pH-værdier og høj temperatur (80°C)

Reaktionstid 30 min:		% aktivitet af maksimum	
Temperatur	pH (phosphatpuffer)	NRRL B 5350	NRRL B 5650 (iflg. opfindelsen)
80°C	5,5	0	45
	6,0	0	65
	6,5	0	95
	7,0	0	100

20 Til fremstilling af glucoseisomerasen ifølge opfindelsen dyrkes *Bacillus coagulans* NRRL B 5650 eller en anden atypisk *Bacillus coagulans*, der danner en glucoseisomerase, der er identisk med den af *Bacillus coagulans* NRRL B 5650 dannede glucoseisomerase, aerobt på medier indeholdende sædvanlige salte og carbon- og nitrogenkilder ved en pH-værdi mellem 5 og 9.

25 Inkuberingstemperaturen for gæringen ligger mellem 40 og 65°C, sædvanligvis omkring 50°C. Aerobe betingelser opretholdes under dyrkningen ved gennemblæsning af luft gennem mediet, f.eks. med en hastighed på ca. 1 rumfangluft pr. rumfang væske pr. minut.

30 Enzymet dannes intracellulært, og rensningsproceduren består sædvanligvis i indhøstning af cellerne ved centrifugering eller filtrering og om ønsket tørring af cellecremen ved frysetørring, spraytørring eller ved en anden proces, som ikke ødelægger enzymaktiviteten. Inden tørringen kan cellerne behandles med opløsninger af cobaltsalte, således at enzympræparatet 35 vil indeholde en mængde Co^{++} , der er nødvendig til aktivering af enzymet.

0

De indhøstede celler kan endvidere varmebehandles ved en temperatur mellem ca. 70 og ca. 80°C i et tidsrum, der er tilstrækkeligt til destruktion af de lytiske enzymsystemer inden i cellerne.

5

Under dyrkningen kan mængden af glucoseisomerase, der er til stede i cellerne, måles med mellemrum ved bestemmelse af den mængde fructose, som dannes ud fra glucose under standardbetingelser. Når der ikke er nogen yderligere stigning i aktivitet, indhøstes cellerne.

10

Såfremt der ønskes et opløseligt enzymprodukt, vil det være muligt at gennemføre fermenteringen således, at det meste af enzymet trænger ud af cellerne til gæringsvæsken. Dette kan f.eks. gøres ved at have gæringstemperaturen til 60°C under hele gæringsperioden eller blot under den senere del deraf.

15

Et enzympræparat kan fremstilles ud fra denne gæringsvæske ved anvendelse af de sædvanlige metoder til fremstilling af extracellulære enzymer, dvs. rensning af væsken ved centrifugering eller filtrering og koncentrering af den enzymholdige opløsning ved inddampning eller ved omvendt osmose, hvorved der fås et flydende enzymprodukt, eller ved udfældning af enzymet fra gæringsvæsken eller den koncentrerede gæringsvæske ved hjælp af salte eller vandopløselige opløsningsmidler og til slut tørring af bundfaldet.

25

Et opløseligt enzym kan også fremstilles ud fra de isolerede celler ved at lade disse autolysere, ved tilsætning af lytiske enzymer, f.eks. lysozym, eller ved tilsætning af overfladeaktive midler. Endvidere kan man benytte sig af mekanisk sønderrivning af cellerne, f.eks. ved hjælp af ultrasoniske metoder eller ved anvendelse af mekaniske homogeniseringsanordninger. Enzympræparater kan fremstilles ud fra celler behandlet på denne måde ved hjælp af de ovenfor omtalte metoder.

30

35

Normalt vil mikroorganismen producere et antal sporer under gæringen. Hvis der ønskes et sporefrit præ-

0

parat, bør der til dyrkningen anvendes en asporogen mutant. Metoder til isolering af asporogene mutanter er velkendte for fagmanden, og det er let at isolere denne type mutanter.

5

Om ønsket kan enzympræparatet ifølge opfindelsen indlejres i en matrix eller insolubiliseres ved hjælp af enhver kendt metode, ved hvilken enzymaktiviteten ikke går tabt.

10

Det her omhandlede enzym har egenskaber, der er meget favorable for glucose-isomerisering under de favorable kommercielle betingelser svarende til pH=5-7. Det kan anvendes ved fra 55 til 85°C uden væsentligt tab af aktivitet ned til pH-værdier på ca. 5,0. Det er yderst varmostabilt, idet det bibeholder meget af aktiviteten ved 85°C over hele pH-området fra 5 til 7. I modsætning her-
15 til mister den kendte Bacillus coagulans-glucoseisomerase sin aktivitet ved temperaturer over 70°C og udviser praktisk taget ingen aktivitet ved 85°C, jfr. de foranstående sammenligningsforsøg. Enzymets overlegne egenskaber gør det særdeles økonomisk fordelagtigt at dyrke mikroorganismen på uorganisk nitrogen.

20

Til nærmere belysning af opfindelsen skal der henvises til de følgende udførelseseksempler.

25

Eksempel 1

Isolering af en glucose-isomeriserende organisme fra naturen.

30

En 10%'s suspension af havejord i sterilt vand udsprede på plader, der indeholder et agarmedium med følgende sammensætning i gram pr. liter destilleret vand:

35

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3
K_2HPO_4	1
$\text{MgSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5

8

0

KCl	0,5	
FeSO ₄	0,01	
Agar	20	
Xylose	5	(autoklaveres særskilt

5

og tilsættes aseptisk lige inden udhældningen af pladerne).

Pladerne inkuberes ved 60-65°C i 2 dage, og de udviklede kolonier overføres til et medium med følgende sammensætning i gram pr. liter destilleret vand:

10

Pepton	10	
Trypton	5	
Gærekstrakt	3	
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	18	
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,2	
KH ₂ PO ₄	7	
Agar	20	
Xylose	10-20	(autoklaveres

15

særskilt og tilsættes aseptisk lige inden udhældningen af pladerne).

20

Såfremt kulturen viser sig at være uren, genbringes den på det første medium og overføres igen til det rige medium. Denne procedure gentages, indtil der opnås en ren kultur.

25

Kulturerne på det rige medium inkuberes i 1-2 dage ved 60°C og afprøves derpå for evne til at isomerisere glucose til fructose på følgende måde:

Cellerne suspenderes i 0,9 %'s NaCl. 1 ml af celled suspensionen inkuberes ved 70°C med 1 ml af den følgende opløsning:

30

Glucose	80 gram pr. liter
TRIS	0,1 mol pr. liter
Chloroform	2 ml
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	5 gram pr. liter
CoCl ₂ , 6 H ₂ O	0,5 gram pr. liter
pH-værdien indstilles på 6,5 under anvendelse af HCl.	

35

0

Efter 4 timers inkubering overføres der 1 dråbe af reaktionsblandingen til et ark chromatografipapir (Whatman No.1) ved hjælp af en Pasteur-pipette. Dråberne anbringes således, at der bliver plads til 50-100 dråber pr. ark papir. Efter tørring fugtes papiret i følgende opløsning:

	Naphthalendiol-1,3	250 mg
	Ethanol	250 ml
10	Konc. HCl	20 ml

Efter tørring i mindst 30 minutter ved stuetemperatur opvarmes papiret til 60°C i 1-20 minutter. Hvis reaktionsblandingen indeholder mindst 0,5% fructose, bliver der en brun plet synlig efter denne behandling.

En kultur, der giver positiv reaktion for fructose ved anvendelse af denne metode, er blevet isoleret. Kulturen er deponeret i Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois, USA (NRRL) under numrene NRRL B-5650.

Denne stamme har følgende egenskaber:

Morfologi:

Svarer til morfologien af arter i Bacillus subtilis-gruppen.

25 Biokemiske reaktioner:

Temperatur for vækst: 40-65°C, optimum 55-60°C.

Væksten inhiberes af høje koncentrationer af protein (over 3%) og carbonhydrater (1%). Syre dannes ud fra glucose, xylose, fructose, ribose og glycerol (ingen gasdannelse). Arabinose forgæres ikke.

30

Ingen vækst i 3%'s NaCl.

Vækst ved pH=5,7: positiv,

Vækst på glucose-næringsagar bedre end vækst på næringsagar. God vækst på sojabønneagar.

35

Hydrolyse af casein og stivelse positiv ved afprøvning ved 40°C, men svag eller negativ ved prøvning efter vækst ved 50°C.

0

Negativ hydrolyse af gelatine.
Anaerob vækst i glucosemedium negativ (svag).

Eksempel 2.

5

Fremstilling af glucoseisomerase i rystekolber.

I afskærmede 500 ml Erlenmeyerkolber fremstilles der 100 ml af et medium med følgende sammensætning (i gram pr. liter ledningsvand):

10	Majsstøbevæske	80
	Gærekstrakt	5
	K_2HPO_4	1
	$(NH_4)_2SO_4$	5
	Xylose	4
	$MgSO_4, 7 H_2O$	0,2
15	$MnSO_4, H_2O$	0,05

20

Xylose, $MgSO_4$ og $MnSO_4$ autoklaveres særskilt og sættes aseptisk til efter afkøling til stuetemperatur. pH-værdien indstilles aseptisk på 7,0 under anvendelse af steriliseret 4 N NaOH.

25

Kolberne podes med 1 ml af en suspension af celler i sterilt destilleret vand fremstillet ved afskrabning af vækst fra portioner af det rige medium, der er omtalt i eksempel 1.

30

De podede kolber inkuberes på et roterende rystebord (220 o/min.) ved 50°C. Efter 40 timers inkubering centrifugeres indholdet af kolberne, og de i fældningen opnåede celler anvendes til isomerisering af glucose på følgende måde:

35

I en reaktionsbeholder udstyret med organer til opretholdelse af en konstant temperatur, nitrogenatmosfære, pH-regulering og omrøring anbringes der 0,5 liter af en 40%'s (vægt/vægt) opløsning af dextrose, H_2O i destilleret vand, hvortil der er sat 0,5 g $MgSO_4, 7H_2O$ og 0,05 g $CoSO_4, H_2O$.

0

Glucoseisomerase-holdige celler fra 1 liter medium sættes til opløsningen, og isomeriseringsprocessen forløber under følgende betingelser: temperatur 80°C; pH=6,2; tid 10 timer.

5

Den dannede mængde fructose bestemmes polarimetrisk, og isomeriseringsgraden bestemmes som % fructose dannet i forhold til oprindelig % dextrose. Der fås følgende resultater:

10

<u>Stamme NRRL nr.</u>	<u>% omdannelse</u>
B 5650	44

Eksempel 3.

15

Termofil Bacillus NRRL nr B 5650 dyrkes natten over i næringsvæske ved 48°C. 1 ml af denne kultur overføres til en 500 ml afskærmet Erlenmeyerkolbe indeholdende 100 ml af følgende medium (i gram pr. liter destilleret vand):

20

Na ₂ HPO ₄ , 2 H ₂ O	9	
KH ₂ PO ₄	7	
MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,5	
KCl	0,5	
FeSO ₄	0,01	
Antifoam	0,1	
(NH ₄) ₂ SO ₄	3	
Xylose	5	(autoklaveres

25

særskilt og tilsættes aseptisk inden podning).

Kolben inkuberes på et roterende rystebord ved 48°C i 1-2 dage.

30

Den glucose-isomeriserende aktivitet afprøves som beskrevet i eksempel 2. Resultatet er 32%'s omdannelse.

35

0

P a t e n t k r a v

Glucoseisomerase, k e n d e t e g n e t ved,
at den er identisk med den glucoseisomerase, der dannes
ved dyrkning af stammen Bacillus coagulans NRRL B 5650
5 under aerobe betingelser og under anvendelse af et
dyrkningsmedium omfattende en nitrogenkilde, en carbon-
kilde og små mængder uorganiske salte, ved en pH-værdi
mellem 5 og 9 og en temperatur mellem 40°C og 65°C.

Fremdragne publikationer:

DK ansøgning nr. 6265/71.
Chem.Abstr., bind 72, 1970, 20616 v.