



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 4488/87

(22) Indleveringsdag: 27 aug 1987

(41) Alm. tilgængelig: 28 feb 1988

(44) Fremlagt: 29 jun 1992

(86) International ansøgning nr.: -

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

(30) Prioritet: 27 aug 1986 FI 863484

(51) Int.Cl.5

C 12 N 9/24
///C 12 N 9/24,
C 12 R 1:145)
(C 12 N 9/24,
C 12 P 19:16)

(71) Ansøger: OY *Alko AB; Salmisaarenranta 7; Tammasaarenlaituri 3; SF-00180 Helsinki, FI

(72) Opfinder: Hannes *Melasniemi; FI, Matti *Korhola; FI

(74) Fuldmægtig: Lehmann & Ree A/S

(54) Hidtil ukendt alfa-amylase-pullulanaseenzym og fremgangsmåde til fremstilling af samme

(56) Fremdragne publikationer

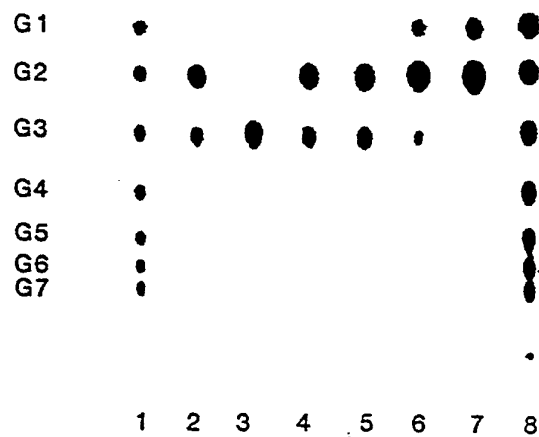
EP off. g. skrift nr. 188049

(57) Sammendrag:

4488-87

Hidtil ukendt α -amylase-pullulanaseenzym produceres af Clostridium thermohydrosulfuricum-bakterier. Det opløselige enzym fremstilledes ved at dyrke Clostridium thermohydrosulfuricum-stammer. Maltose og maltotriose kan fremstilles ud fra stivelse ved anvendelse af enzymet.

4488-87



1) standards: glucose-maltoheptaosidi;
 2) amylose + 1X I, 24 h; 3) pullulanase + 1X I, 24 h;
 4) corn starch + 1X I, 24 h; 5) corn starch - 1X II, 24 h;
 6) corn starch + 10X II, 24 h;
 7) corn starch + 10X II, 48 h; 8) standards:
 glucose - maltoheptaosidi.
 I and II are two homogenous fractions obtained in
 enzyme purification.

FIG. 6

Opfindelsen angår et hidtil ukendt α -amylase-pullulanaseenzym og en fremgangsmåde til fremstilling heraf.

5 Glucoseenhederne i stivelse er hovedsagelig bundet til hinanden ved hjælp af α -1,4-glucosidbindinger og danner lange kæder. Ydermere har stivelse α -1,6-glucosidbindinger, og der findes en sådan binding ved hvert forgreningssted på kæderne.

10 α -Amylaser spalter 1,4-bindinger i stivelse tilfældigt langs kæderne, hvorimod β -amylaser spalter de samme bindinger ved de ikke-reducerende ender af kæderne. Hvad angår pullulanaser, er de "afgrenings"-enzymmer, som spalter 1,6-bindinger ved forgreningsstederne.

15 Maltosesirupper fremstilles ved hydrolysering af stivelse ved hjælp af plante- β -amylaser eller ved at tillade en sukkerdannende skimmel-svampe- α -amylase yderligere hydrolysering af en stivelse, som er blevet gjort flydende ved anvendelse af bakteriel α -amylase. Ved begge procedurer opnås der en maltosesirup, som indeholder ca. 60% maltose. Maltoseudbytter, som er højere end disse, opnås under
20 anvendelse af β -amylase sammen med pullulanase. Maltosesirupper anvendes hovedsagelig inden for slik- og bageriindustrier på grund af deres typiske, milde, søde smag, lave viskositet, lave hygroskopicitet og høje termiske stabilitet.

25 Det er fordelagtigt for stivelseshydrolyseprocessen, hvis det anvendte enzym er aktivt og stabilt ved høje temperaturer. β -Amylaser, skimmel-svampe- α -amylaser og kommercielt opnåelige pullulanaser fra Klebsielle pneumoniae og Bacillus sp. kan imidlertid ikke anvendes ved tempereturer over 60°C. Det vil således være fordelagtigt at have et maltogent enzym med højere termostabilitet til
30 fremstilling af maltosesirup.

Hvis der anvendes flere enzymer ved hydrolyse af stivelse er det almindeligvis nødvendigt at foretage kompromiser med hensyn til
35 aktivitetskravene til enzymerne eller alternativt at anvende enzymerne efter hinanden og at justere processen derimellem. Under hensyntagen til enkelthed og økonomi ville det være bedre, hvis et enkelt enzym var tilstrækkeligt ved fremgangsmåden. Af denne grund bør det ideelle enzym, som anvendes ved fremstilling af

maltosesirup, have flydendegørende, sukkerdannende og stivelsesafgreningsaktivitet.

5 Hyun og Zeikus (1985, J. Bacteriol. 49, 1168) undersøgte nedbrydningen af stivelse med Clostridium thermohydrosulfuricum-stamme E39 (ATCC 33223) isoleret fra den varme Octopus-kilde i Yellowstone National Park i USA. Denne stamme producerede cellebundet pullulanase og glukoamylase, men ikke α -amylase. De præparater, som blev opnået fra stamme E39, hydrolyserede stivelse under dannelse af
10 glucose, uden at der blev observeret maltose, maltotriose eller maltotetraose som mellemprodukter.

Det enzym, som er beskrevet i nærværende beskrivelse, er forskellig fra de hidtil beskrevne amylaser, idet dette enzym er en amylase af
15 en helt ny type, α -amylase-pullulanase, hvori to adskilte enzymaktiviteter, α -amylaseaktivitet og pullulanaseaktivitet, er til stede i samme proteinmolekyle. α -Amylase-pullulanaseenzymet, som er beskrevet i den foreliggende beskrivelse, nedbryder stivelse til maltose og maltotriose.

20 Fra beskrivelsen til EP patentansøgning nr. 188.049 kendes et pullulanaselignende enzym, som besidder α -amylaseaktivitet, til hydrolyse af stivelse til maltose og maltotriose. Enzymet produceres ud fra en stamme af slægten *Bacillus subtilis*.

25 Enzymet ifølge nærværende opfindelse er bl.a. forskelligt fra det kendte pullanaselignende enzym ved at besidde et højere temperatur-optimum og bedre termostabilitet. Dette er fordelagtigt ved hydrolyse af stivelse, idet processen forenkles og der opnås et mere
30 økonomisk resultat ved at anvende et enzym, der har flydendegørende, sukkerdannende og stivelsesafgreningsaktivitet samt høj termostabilitet.

Opfindelsen angår således et α -amylase-pullulanaseenzym, der er
35 ejendommeligt ved, at dets relative molekylvægt, som bestemt ved polyacrylamidgelgradientelektroforese, er 185.000 ± 40.000 i nærværelse af natriumdodecylsulfat, at ét og samme proteinmolekyle har både α -amylaseaktivitet og pullulanaseaktivitet, og under hvis indvirkning stivelse nedbrydes til maltose og maltotriose, at

temperaturoptimum for begge enzymaktiviteter ligger på mellem ca. 80 og 90°C, fortrinsvis på ca. 85°C, at pH-optimum ved 85°C er 5-6, fortrinsvis ca. 5,6, og ved 60°C 4,5-5,5, fortrinsvis ca. 5,2, at enzymet eller DNA-sekvensen, som koder for dette, hidrører fra en
 5 stamme af slægten Clostridium, og at enzymet kan fremstilles ved dyrkning af en stamme af Clostridium thermohydrosulfuricum.

Opfindelsen angår desuden en fremgangsmåde til fremstilling af enzymet, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at en stamme af
 10 Clostridium thermohydrosulfuricum dyrkes på et substrat indeholdende stivelse eller et stivelsehydrolysat ved en temperatur på 42-78°C, fortrinsvis 55-75°C og ved et pH på 6-8, fortrinsvis ca. pH 7, og at det dannede enzym indvindes.

15 Dannelsen af α -amylase-pullulanasen ifølge den foreliggende opfindelse er blevet observeret i forbindelse med Clostridium thermohydrosulfuricum -stamme E 101-69 (DSM 3783) og E 100-69 (DSM 567), som blev isoleret i østrigske roesukkerfabrikker i 1969 (Hollaus & Klaushofer, 1973, Int. Sugar J., 75, 237-241 og 271-275). Stamme E
 20 100-69 er en neotypestamme af bakterien Clostridium thermohydrosulfuricum. C. thermohydrosulfuricum-stamme E 101-69 blev deponeret i overensstemmelse med Budapest Traktaten den 3. juni 1986 hos "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen" under ovennævnte deponeringsnr. DSM 3783. Stamme E 100-69 var tidligere blevet deponeret af dens
 25 opdager hos samme deponeringsmyndighed. C. thermohydrosulfuricum-stammer kan skelnes fra andre thermofile Clostridium-stammer på grundlag af deres ca. 10°C højere maksimale væksttemperatur og deres hexagonalt arrangerede celleoverfladeproteiner. Desuden kan C. thermohydrosulfuricum-stammerne DSM 3783 og DSM 567 skelnes fra
 30 andre C. thermohydrosulfuricum-stammer på grundlag af DNA-homologi og fermenteringsforsøg med stivelse, amygdalin, raffinose og lactose. Stammerne DSM 3783 og DSM 567 kan skelnes fra hinanden på grundlag af DNA-homologi (Matteuzzi, Hollaus & Biauati, 1978, Int. J. Syst. Bacteriol., 28, 528-531; Hollaus & Klaushofer, 1973, Int. Sugar J., 75, 237-241 og 71-275).
 35

Adskillige stammer af gæren Saccharomyces cerevisiae er i stand til at anvende maltose og maltotriose som deres carbonkilde ved fremstilling af ethanol (Stewart & Russel, 1983, i Yeast Genetics,

Fundamental and Applied Aspects, side 461, eds. J. Spencer, D. Spencer og A. Smith, Springer-Verlag, New York). Idet α -amylase-pullulanase specifikt nedbryder stivelse til en blanding af disse sukkerarter, kan ethanol fremstilles ud fra stivelse ved hjælp af gær under anvendelse af α -amylase-pullulanase som mæskeenzym.

Eksempler

På de tilhørende tegninger, som angår eksemplerne, er der på figurerne afbildet egenskaberne for α -amylase-pullulanasen ifølge den foreliggende opfindelse som følger:

Figur 1 viser temperaturens indflydelse på aktiviteten af α -amylase-pullulanase.

Figur 2 viser pH's indflydelse på aktiviteten af α -amylase-pullulanase ved 85°C (A) og 60°C (B).

Figur 3 viser inaktiveringen af α -amylase-pullulanase ved forskellige temperaturer i en puffer uden substrat og calcium.

Figur 4 viser stabiliseringen af α -amylase-pullulanase med calcium ved høje temperaturer.

Figur 5 viser stivelseshydrolyse med oprenset α -amylase-pullulanase ved forskellige temperaturer.

Figur 6 viser tyndtlagskromatografi af de endelige produkter, som dannes af α -amylase-pullulanase.

Bestemmelse af enzymaktiviteter

α -Amylase- og pullulanaseaktiviteterne blev bestemt ved at måle omfanget af reducerende sukkerarter, som blev frigjort ved hjælp af disse fra ren amylose (type III: fra kartoffel, Sigma Chemical Co. Ltd., St. Louis, MO 63178, USA) og fra pullulan (Sigma). 25 μ l Enzym blev sat til 1 ml 0,5% substrat i en 100 mM natriumacetatpuffer justeret til pH 5,6 indeholdende 2 mM CaCl_2 , 0,1 mM Na_2 -EDTA og 50mM NaCl. De reducerende sukkerarter blev bestemt ved hjælp af Nelson-

Somogyi-fremgangsmåden (Nelson, 1944, J. Biol. Chem., 153, 375, Somogyi, 1952, J. Biol. Chem., 195, 19) efter at rørene var blevet inkuberet i 15 min ved 85°C. I ovennævnte analyse svarede den reducerende sukker, som blev frigjort af en α -amylase- eller pullulanaseenzymenhed, til et nanomol vandfri glucose. Amylosen blev bragt i opløsning med 1 M NaOH, som var neutraliseret med HCl, der blev tilsat puffer, og til slut blev opløsningen filtreret under anvendelse af et 1,2 μ m RAWP membranfilter (Millipore Corp., Ashby Road, Bedford, MA 01730, USA).

Protein blev bestemt ved fremgangsmåden ifølge Lowry (Lowry et al., 1952, J. Biol. Chem., 193, 256) med ægalbumin (fraktion V, Sigma) som standard.

Sammensætning af det anvendte medium

	Bestanddel	g, l ⁻¹
20	Opløselig stivelse (ifølge Zulkowsky), (E. Merck, Darmstadt, Vesttyskland)	20,0
	Gærekstrakt (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA)	5,0
25	Trypton (Difco)	10,0
	Kødekstrakt (Lab-Lemco), (Oxoid ltd., Basingstoke, Hampshire, England)	5,0
30	KH ₂ PO ₄	6,8
	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	11,4
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,02
35	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,01
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,01

pH 6,8

Karakterisering af råenzym

- 5 Stamme E 101-69 blev dyrket i en 2-liter kolbe uden omrøring i 30 timer under anaerobe forhold ved 68°C på ovennævnte medium, hvortil der var blevet sat resazurin 1 mg/l og thioglycolsyre 200 µl/l. Cellerne blev fjernet ved centrifugering, hvorefter råpræparatet af α-amylase-pullulanase blev præcipiteret fra dyrkningsmediesuper-
- 10 natanten, hvis α-amylaseaktivitet var 520 U/ml og pullulanaseaktivitet var 1550 U/ml, ved at gøre den 70% mættet med hensyn til ammoniumsulfat. Nogle af de væsentligste egenskaber ved enzymet blev karakteriseret under anvendelse af dette råpræparat med en α-amylaseaktivitet på 12.000 U/ml og en pullulanaseaktivitet på 37.000
- 15 U/ml.

- Begge aktiviteter af enzymet havde deres temperaturoptimum ved 85°C (figur 1), når α-amylase- og pullulanase-aktiviteterne af det fortyndede råenzym (1.200 U/ml α-amylase og 3.700 U/ml pullulanase)
- 20 blev bestemt ved ovennævnte fremgangsmåde (side 3), men ved anvendelse af forskellige temperaturer.

- pH-optimum for begge aktiviteter var 5,6, når bestemmelserne blev udført ved 85°C (figur 2A), og 5,2, når bestemmelserne blev udført
- 25 ved 60°C (figur 2B). I figuren er der anført en værdi på 100 for de højeste aktiviteter ved begge temperaturer. 25 µl Fortyndet råenzym (30 U α-amylase og 90 U pullulanase) blev sat til 1 ml af en 100 mM natriumcitratpuffer justeret til forskellige pH-værdier og indeholdende 0,5% amylose eller pullulan, 50 mM NaCl og 10 mM CaCl₂. Rørene
- 30 blev derefter inkuberet i 15 minutter ved 85°C eller 60°C, og de reducerende sukkerarter, som var blevet frigjort, blev bestemt.

- Begge aktiviteterne var stabile ved 60°, men de blev inaktiveret på samme måde ved højere temperaturer, når de blev inkuberet i en 100
- 35 mM natriumacetatbuffer, pH 5,6, ved forskellige temperaturer, hvorunder den endelige koncentration af α-amylase var 800 U/ml og pullulanase 2.400 U/ml. De resterende α-amylase- og pullulanaseaktiviteter blev bestemt ved ovennævnte fremgangsmåde under anvendelse af 50 µl prøver, som blev udtaget på de tidspunkter, der er anført

på figuren.

Calciumioner stabiliserede begge aktiviteter på samme måde ved høje temperaturer (figur 4). Der blev tilsat råenzym til opnåelse af en
5 endelig koncentration på 800 U/ml α -amylase og 2.400 U/ml pullulanase i en 100 millimolær natriumacetatpuffer, pH 5,6, indeholdende forskellige calciummængder. Disse blev inkuberet i 2 timer ved temperaturer på 85°C, 90°C og 95°C. De resterende α -amylase- og pullulanase-aktiviteter blev bestemt ved ovennævnte fremgangsmåde
10 (side 3) under anvendelse af 50 μ l prøver.

Oprensning af enzymet

Det opløselige α -amylase-pullulanaseenzym blev oprenset fra dyrkningsboullionen af stamme E 101-69 som følger. Stammen blev dyrket
15 anaerobt i 40 timer ved 68°C i en 22-liters kolbe uden omrøring i det medium, som er beskrevet på side 4. Efter at cellerne var blevet fjernet ved centrifugering, blev der sat 15 g hvedestivelse/l (BDH Chemicals Ltd., Broom Road, Poole BH12 4NN, England) og 200 mg/l
20 natriumacid til den kolde supernatant, som blev omrørt under afkøling i 90 timer til absorption af enzymet i stivelsen. Derefter fik stivelsen lov til at bundfælde i 24 timer, supernatanten blev fjernet, og stivelseskagen, som var bundfældet, blev vasket ved at opslæmme den i 2 l iskoldt vand og centrifugering. Det adsorberede
25 enzym blev skilt fra stivelsen ved ekstraktion af det i et varmt bad ved at blande det med to 0,5 l portioner 60°C vand og centrifugering.

Ekstrakterne blev gjort 20 millimolær under anvendelse af stærk
30 natriumacetat justeret til pH 5,6 og blev derpå sat på en 2,6 x 15 cm DEAE cellulosesøjle (DE 52, Whatman Ltd., Springfield Mill, Maidstone, Kent, England), der var ækvilibreret under anvendelse af samme puffer. Søjlen blev vasket med ækvilibreringspufferen og derpå først elueret med 100 mM og derefter med 200 mM natriumchlorid i
35 samme puffer. De eluater, som blev opnået under anvendelse af det stærkere salt, blev forenet og koncentreret til 21 ml ved anvendelse af et ultrafiltreringskammer (Amicon Corp., Danvers, Massachusetts, USA) forsynet med en PM 10 membran.

Prøven blev dialyseret mod en 10 mM kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, og blev derpå sat på en 2,6 x 13 cm hydroxyapatitsøjle (Bio Gel HT, Bio Rad, 1414 Harbour Way South, Richmond, California 94804, USA), der var ækvilibreret under anvendelse af samme puffer. Søjlen blev først
5 vasket med ækvilibreringspufferen og derpå elueret under anvendelse af en 10-400 mM kaliumphosphatgradient, pH 7,0. Enzymet blev elueret som en top, der blev fulgt af en skulder med en tydeligt lavere specifik aktivitet. De fraktioner, som blev elueret i toppen, blev forenet og koncentreret, som nævnt ovenfor, til et volumen på 1 ml.

10

De koncentrerede prøver blev i 200 µl-portioner ført gennem kombi-
nerede Superose® 12 og 6 gelfiltreringssøjler (Pharmacia Fine
Chemicals, Uppsala, Sverige) i en 50 mM ammoniumacetatpuffer, pH
6,5, ved en hastighed på 6 ml/time. Enzymet blev elueret som to
15 nærliggende toppe, og materialet (I og II), som var indeholdt i disse, blev frysetørret. Den specifikke α -amylaseaktivitet af præparat I var på dette trin 39 kU/mg og den specifikke pullula-
naseaktivitet var 101 kU/mg, hvor de respektive specifikke aktivi-
teter af præparat II var 36 kU/mg og 90 kU/mg.

20

Begge præparater blev derefter gelfiltreret under anvendelse af en
Superose® 6 søjle under denaturerende forhold i nærværelse af 6 M
guanidinhydrochlorid og β -mercaptoethanol. Det er blevet observeret,
at under disse forhold mister proteiner almindeligvis hele deres
25 ikke-kovalente struktur og dissocierer til deres underenheder (Tanford, 1968, Advan. Protein Chem., 23, 121). Før gelfiltreringen blev prøverne opløst i en prøvepuffer med følgende sammensætning:
7,3 M guanidinhydrochlorid, 0,1 M natriumacetat, 0,02 M EDTA, 0,5 M
 β -mercaptoethanol og et pH på 8,1. Prøverne blev inkuberet ved 50°C
30 i 4 timer, pH blev justeret til 5,0, og prøverne blev derpå ført igenmem i 200µl portioner ved en strømningshastighed på 1 ml/time, hvor pufferen bestod af 6 M guanidinhydrochlorid, 100 mM natriu-
acetat, 20 mM β -mercaptoethanol og med et pH på 5,0. De fraktioner,
hvor i enzymet blev elueret, blev forenet og omhyggeligt dialyseret
35 mod en 20 mM ammoniumhydrogencarbonatpuffer, pH 7,9. De således opnåede renaturerede enzympræparater (I og II), som var homogene ifølge både SDS-polyacrylamidgelgradientelektroforese (jvf. brochuren, "Calibration kits for molecular weight determination using electrophoresis", Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sverige, 1982)

og gelfiltrering udført i guanidinhydrochlorid, blev anvendt til yderligere karakterisering af enzymet.

Carbohydrat bundet til enzymet

5 Det oprensede α -amylase-pullulanase indeholdt carbohydrate. Efter hydrolyse frigjorde enzymet sukkerarter med samme mobilitet som mannose, glucose, galactose og ramnose ved tyndtlagskromatografi på en Silicagel 60 plade (nr. 5553, E. Merck) mættet med 0,2 M NaH_2PO_4 ,
10 med en blanding af n-butanol, acetone og vand (4:5:1, volumen/volumen) som elueringsmiddel. Mængden af neutrale hexoser blev bedømt til 10% af den totale mængde af protein og neutrale hexoser, når de neutrale hexoser blev bestemt ved Antron-fremgangsmåden (Spiro, 1965, Methods in Enzymology, vol. 8, side 3) med mannose som standard.
15

Molekylvægt af enzymet

20 SDS-polyacrylamidgelgradienlelektroforese med PAA 4/30 geler (Pharmacia Fine Chemicals) viste, at α -amylase-pullulanase bestod af underenheder af kun en type med en eksceptionel høj molekylvægt. Den relative molekylvægt, som blev observeret for enzymunderenheden, var 190.000 ± 30.000 ved anvendelse af præparat I og 180.000 ± 30.000 ved anvendelse af præparat II. Under naturlige funktionsforhold med samme geler var den relative molekylvægt, som blev
25 opnået for det renaturerede α -amylase-pullulanaseenzym 370.000 ± 85.000 ved anvendelse af præparat I og 330.000 ± 85.000 ved anvendelse af præparat II. De bånd, som blev opnået fra enzymet ved gelgradienlelektroforese, var meget diffuse. På den anden side blev
30 der ved guanidinhydrochloridgelfiltrering opnået en skarp, symmetrisk top på et punkt, der svarer til en relativ molekylvægt på 275.000 ± 50.000 . Denne fremgangsmåde skelnede ikke mellem præparaterne I og II i en prøve, som indeholdt begge.

Hydrolyse af stivelse ved forskellige temperaturer

35 Tilstedeværelse af substrat stabiliserede α -amylase-pullulanase således, at det var muligt at anvende enzymet til hydrolyse af stivelse ved 80°C såvel som ved 60°C (figur 5). Oprensat α -amylase-

pullulanase med 480 U ml^{-1} α -amylase og 1.100 U ml^{-1} pullulanase blev fyldt i rør, i en 100 mM natriumacetatpuffer, som indeholdt $0,5\%$ majsstivelse (Sigma), 2 mM CaCl_2 , $0,1 \text{ mM}$ $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 50 mM NaCl og med et pH på $5,6$. Rørene blev inkuberet ved temperaturer på 60°C , 70°C og 80°C og deres indhold af reducerende sukkerarter blev bestemt ud fra prøver, som blev udtaget ved de på figuren anviste tidspunkter. Hydrolyseprocentdelen blev beregnet ved at sammenligne mængden af reducerende sukkerarter, som var til stede i prøverne, med mængden af reducerende sukkerarter, som var til stede i et substrat, der var hydrolyseret til glucose ved anvendelse af fortyndet syre ($0,5 \text{ N HCl}$, 100°C , 3 timer).

Slutprodukter, som dannes ved hjælp af enzymet

De slutprodukter, som dannes ved hjælp af α -amylase-pullulanase, blev bestemt som følger. Der blev fremstillet $0,5\%$ opløsninger ud fra amylose (type III: fra kartoffel), pullulan og majsstivelse (alle fra Sigma) i en puffer (100 mM natriumacetat, 2 mM CaCl_2 , $0,1 \text{ mM}$ $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, 50 mM NaCl , pH $5,6$), der blev sat oprenset α -amylase-pullulanasepræparat I eller II til opløsningerne, og de blev inkuberet ved 80°C . Enzymet blev anvendt i 2 koncentrationer, 480 U ml^{-1} α -amylase og 1.100 U ml^{-1} pullulanase (= 1 X) og 10 gange stærkere (= 10 X). Prøver, der blev udtaget fra hydrolysaterne efter 24 timer og 48 timer, blev afpipeteret på silicagel 60 -plader (nr. 5553 , E. Merck) og elueret med en blanding af 2 -propanol, acetone og vand ($2:2:1$, volumen/volumen).

Oprensset α -amylase-pullulanase (1 X) nedbrød pullulan til maltotriose, hvorimod både kartoffelamylose og majsstivelse blev nedbrudt til maltose og maltotriose (figur 6). Når den højere enzymkoncentration blev anvendt (10 X), blev det observeret, at maltotriose blev nedbrudt yderligere (figur 6). I dette tilfælde blev der produceret 77% maltose, 15% glucose og 4% maltotriose af majsstivelse ved en 48 timers hydrolyse. Maltosen og maltotriosen blev kvantificeret ved væskechromatografi i en søjle, der var pakket med Nucleosil 5 C_{18} omvendt-fasemateriale (Macherey-Nagel, D-5160 Düren, Vesttyskland), med vand som elueringsmiddel, og glucosen blev kvantificeret enzymatisk (UV-forsøgsskit nr. 716.251 , Boehringer-Mannheim, Mannheim, Vesttyskland). Procentdelene af hydrolyseprodukterne blev beregnet

ved at sammenligne deres mængder med den substratmængde, der blev hydrolyseret til glucose ved anvendelse af fortyndet syre (0,5 N HCl, 100°C, 3 timer).

5 Sammenligning af enzympræparater fra stammerne E 101-69 og E 100-69

10 Stammerne E 101-69 og E 100-69 blev dyrket anaerobt uden rystning ved 68°C i 24 timer på ovennævnte medium, hvortil der var blevet sat 1 mg resazurin pr. l og 200 µl thioglycolsyre pr. l. Cellerne blev fjernet ved centrifugering, og fra supernatanten blev der med stammen E 101-69 frembragt delvis oprenset α -amylase-pullulanase-præparater med en specifik α -amylaseaktivitet på 21 kU mg⁻¹ og en specifik pullulanaseaktivitet på 63 kU mg⁻¹ og respektive specifikke aktiviter på 20 kU mg⁻¹ og 56 kU mg⁻¹ med stammen E 100-69. Efter at have ført disse præparater gennem SDS-polyacrylamidgeler viste begge kun nogle få meget svage bånd ud over et stærkt diffust bånd, som bevægede sig med samme mobilitet som α -amylase-pullulanase fra stamme E 101-69, som tidligere var blevet oprenset i homogen form.

20

25

30

35

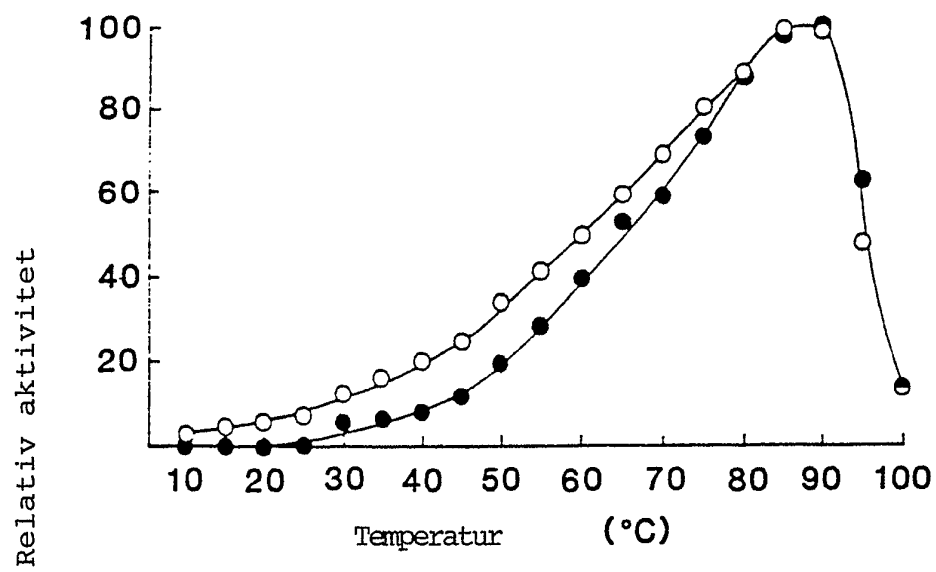
P a t e n t k r a v

1. α -Amylase-pullulanaseenzym, k e n d e t e g n e t ved, at dets relative molekylvægt, som bestemt ved polyacrylamidgelgradient-
5 elektroforese, er 185.000 ± 40.000 i nærværelse af natriumdodecylsulfat, at ét og samme proteinmolekyle har både α -amylaseaktivitet og pullulanaseaktivitet, og under hvis indvirkning stivelse nedbrydes til maltose og maltotriose, at temperaturoptimum for begge
10 enzymaktiviteter ligger på mellem ca. 80 og 90°C, fortrinsvis på ca. 85°C, at pH-optimum ved 85°C er 5-6, fortrinsvis ca. 5,6, og ved 60°C 4,5-5,5, fortrinsvis ca. 5,2, at enzymet eller DNA-sekvensen, som koder for dette, hidrører fra en stamme af slægten Clostridium, og at enzymet kan fremstilles ved dyrkning af en stamme af Clostridium thermohydrosulfuricum.
- 15 2. Fremgangsmåde til fremstilling af et α -amylase-pullulanaseenzym ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at en stamme af Clostridium thermohydrosulfuricum dyrkes på et substrat indeholdende stivelse eller et stivelsehydrolysat ved en temperatur på 42-78°C,
20 fortrinsvis 55-75°C og ved et pH på 6-8, fortrinsvis ca. pH 7, og at det dannede enzym indvindes.

25

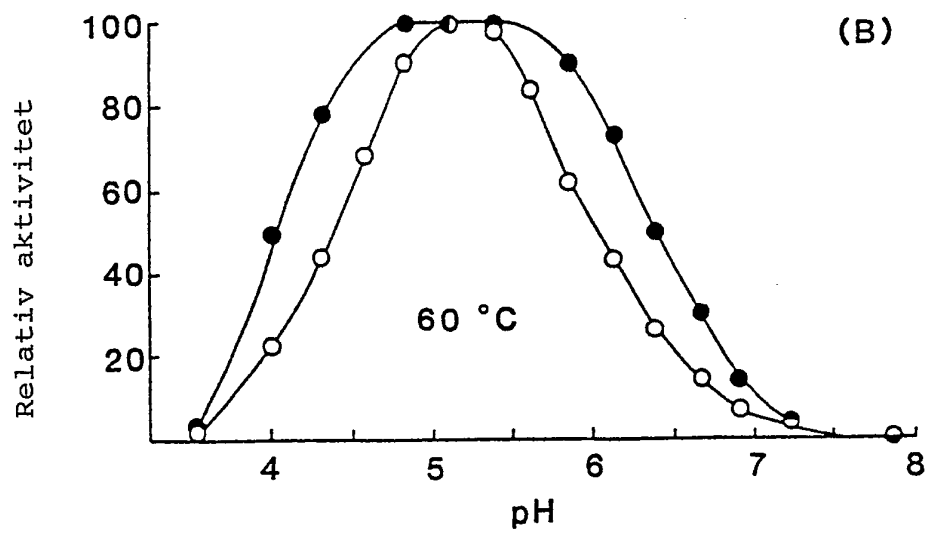
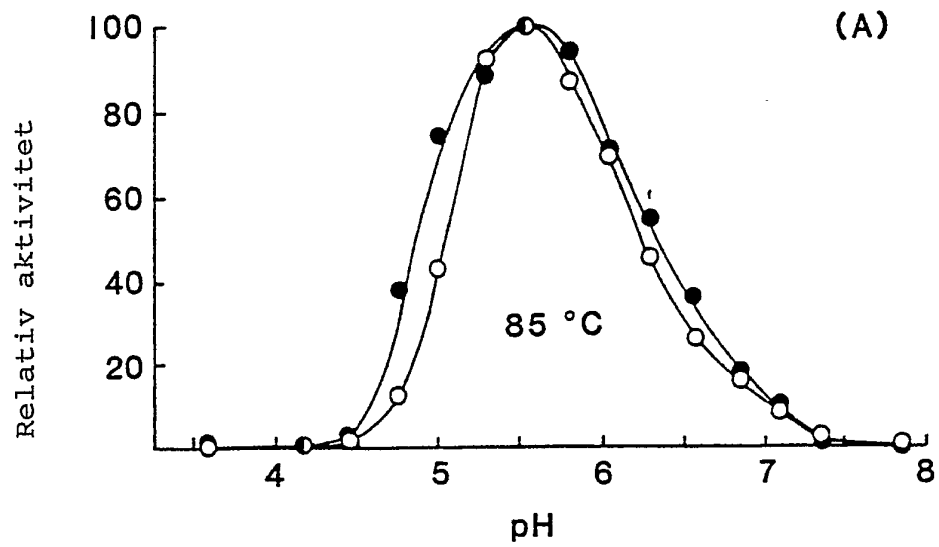
30

35



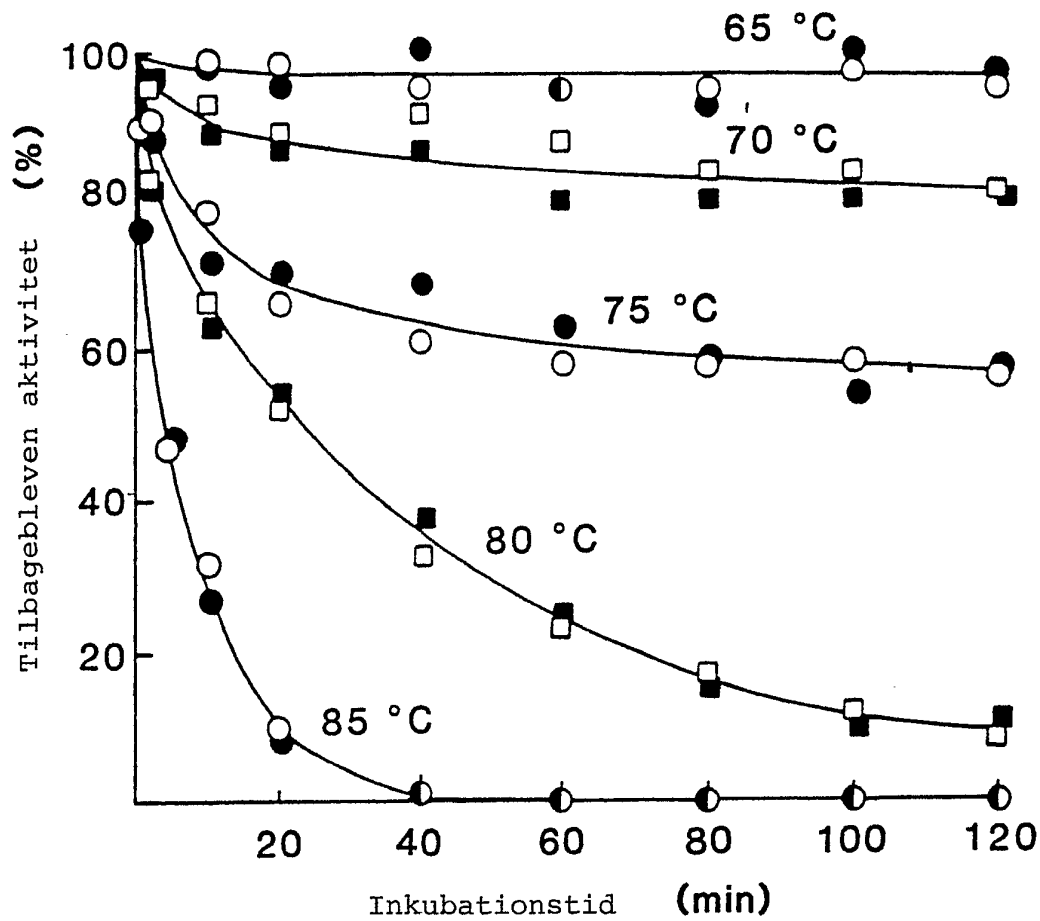
● Aktivitet af α -amylase
○ Aktivitet af pullulanase

FIG. 1



● Aktivitet af α -amylase
○ Aktivitet af pullulanase

FIG. 2



●, ■ Aktivitet af α -amylase
○, □ Aktivitet af pullulanase

FIG. 3

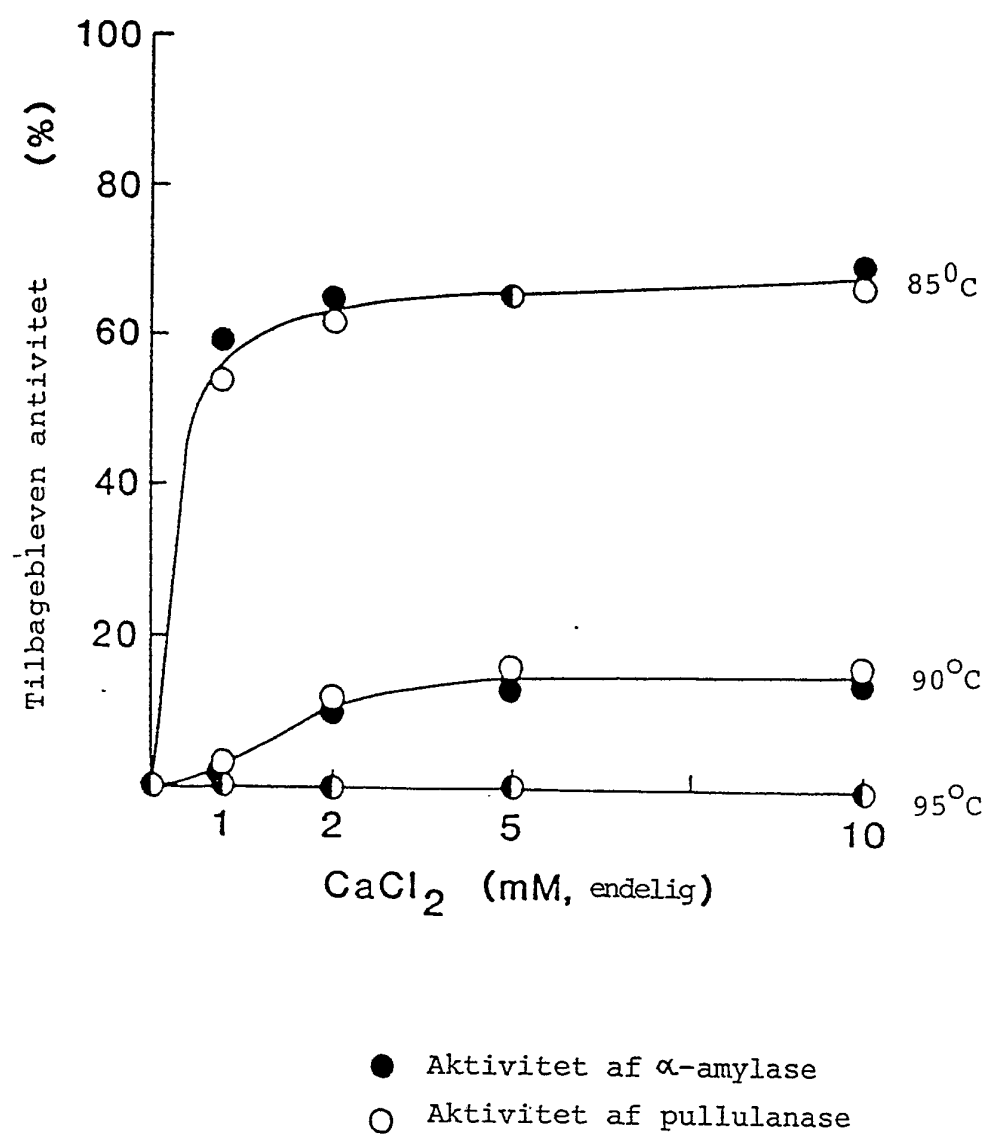


FIG. 4

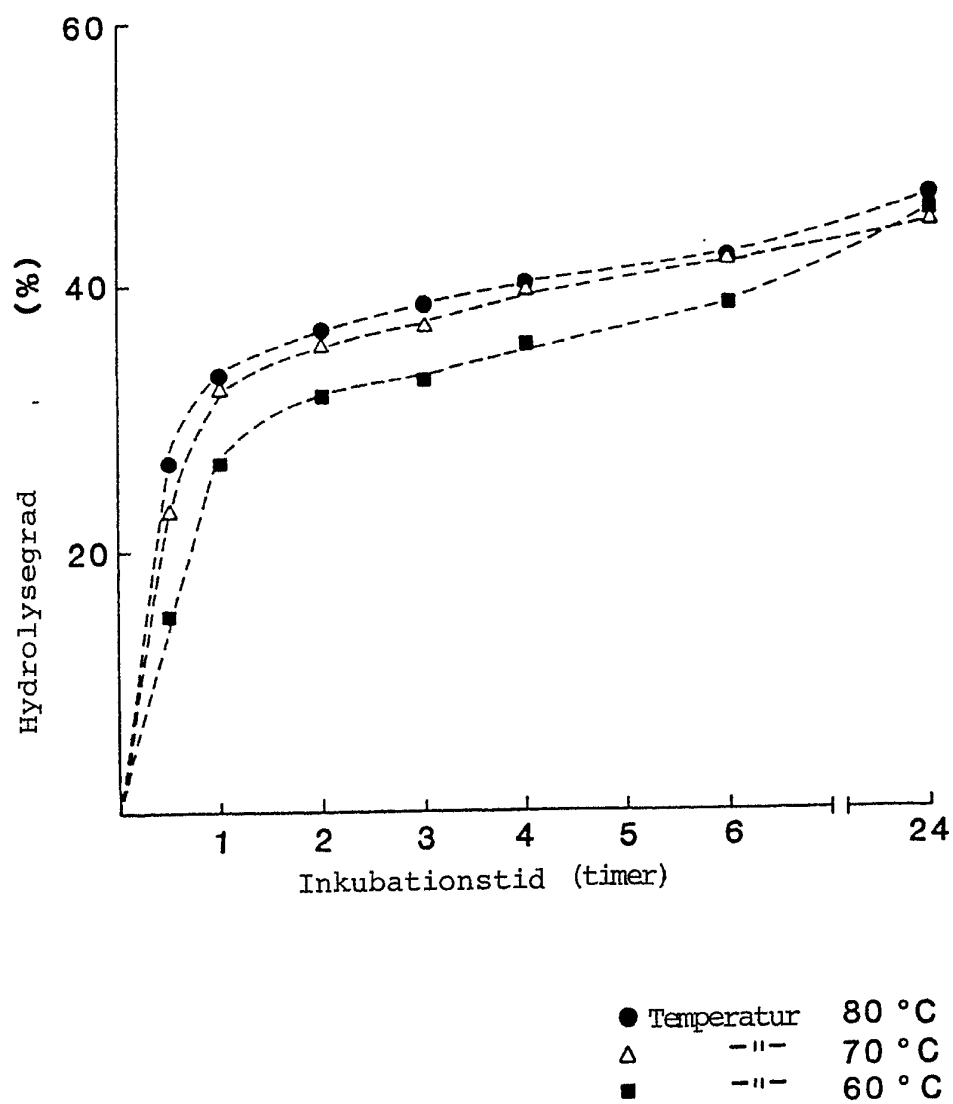
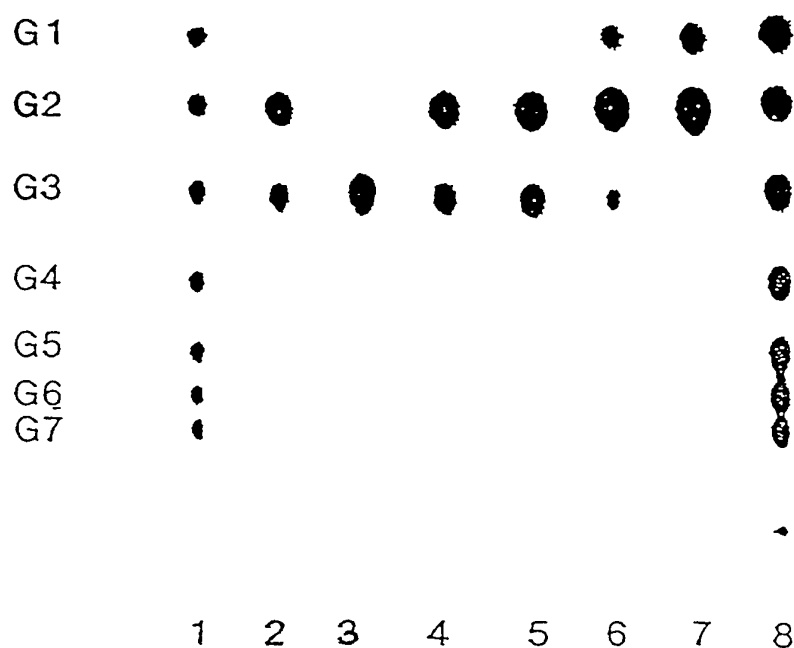


FIG. 5



- 1) Standarder: glucose-maltoheptaosidi;
- 2) Amylose + 1X I, 24 timer;
- 3) pullulan + 1X I, 24 timer;
- 4) Majsstivelse + 1X I, 24 timer;
- 5) Majsstivelse + 1X II, 24 timer;
- 6) Majsstivelse + 10X II, 24 timer;
- 7) Majsstivelse + 10X II, 48 timer;
- 8) Standarder: glucose - maltoheptaosidi.

I og II er to homogene fraktioner, som opnås ved enzymoprensningen.

FIG. 6