(19) **Bundesrepublik Deutschland**
**Deutsches Patent- und Markenamt**

(10) **DE 695 33 118 T2** 2005.07.07

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 670 368 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 33 118.3**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 301 286.1**
(96) Europäischer Anmeldetag: **28.02.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **06.09.1995**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **09.06.2004**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **07.07.2005**

(51) Int Cl.[7]: **C12N 9/28**
**C12P 21/00, C12N 1/20, C12P 19/14**

(30) Unionspriorität:
**5437194 01.03.1994 JP**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**DE, FR, GB**

(73) Patentinhaber:
**Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo, Okayama, JP**

(74) Vertreter:
**Keil & Schaafhausen Patentanwälte, 60322 Frankfurt**

(72) Erfinder:
**Nakano, Masayuki, Tsukubo-gun, Okayama, JP;**
**Chaen, Hiroto, Okayama-shi, Okayama, JP;**
**Sugimoto, Toshiyuki, Okayama-shi, Okayama, JP;**
**Miyake, Toshio, Okayama-shi, Okayama, JP**

(54) Bezeichnung: **Maltohexaose- und Maltoheptaose- bildende Amylase und ihre Herstellung und Verwendung**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine neue Maltohexaose und Maltoheptaose bildende Amylase und deren Herstellung und Verwendungen, insbesondere auf eine Maltohexaose und Maltoheptaose bildende Amylase (nachfolgend als "AMYLASE" bezeichnet), welche hauptsächlich Maltohexaose und Maltoheptaose aus Stärke bildet, und deren Herstellung sowie Mikroorganismen, welche solch eine Amylase herstellen, Saccharidzusammensetzungen enthaltend damit hergestellte Maltohexaose und/oder Maltoheptaose oder solche enthaltend durch Hydrieren von Maltohexaose und Maltoheptaose erhältliches Maltohexaitol und/oder Maltoheptaitol und Zusammensetzungen enthaltend diese Saccharide.

**[0002]** Verfahren zum spezifischen Herstellen von Maltooligosacchariden, wie Maltose und Maltotetraose, durch Erlauben spezifischer Amylasen, auf Stärke einzuwirken, wurden in einem industriellen Maßstab eingesetzt und in Prozessen von Zusammensetzungen, wie Lebensmitteln und Pharmazeutika, weit verwendet. Die Nachfrage nach Sacchariden enthaltend eine relativ hohe Menge an Maltooligosacchariden, wie Maltohexaose und Maltoheptaose, sind gestiegen, weil unter Maltooligosacchariden solche mit einem relativ geringen Molekulargewicht beträchtlich gering an Süße, leicht verdaulich und absorbierbar sind.

**[0003]** Von Mikroorganismen abgeleitete Enzyme oder Amylasen, welche beim Einwirken auf Stärke eine relativ große Menge an Maltohexaose produzieren, sind bekannt, aber es ist keine Amylase bekannt, welche Maltooligosaccharide höher als Maltoheptaose bildet.

**[0004]** Amylasen, welche aus Stärke hauptsächlich Maltohexaose produzieren, können basierend auf deren Wirkungen grob in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die eine ist eine Maltohexaose bildende Amylase vom exo-Typ, welche stärkehaltige Verbindungen so hydrolysiert, um sukzessive Maltohexaoseeinheiten von den nicht-reduzierenden Kettenenden zu entfernen, namentlich Maltohexaohydrolase (EC 3.2.1.98), und die andere ist eine Maltohexaose bildende Amylase vom endo-Typ, namentlich α-Amylase vom endo-Typ (EC 3.2.1.1), welche auf interne Ketten stärkehaltiger Saccharide wirkt, um Maltohexaose in einer relativ großen Menge zu produzieren.

**[0005]** Kainuma et al. berichteten in FEBS Letters, Bd. 26, S. 281–285 (1972) von einem Mikroorganismus der Art Aerobacter aerogenes, welcher eine Maltohexaose bildende Amylase vom exo-Typ intrazellulär bildet, welche durch ihre relativ niedrige optimale Temperatur und thermische Stabilität charakterisiert ist, aber diese ist für eine industrielle Verwendung unzureichend in der Hitzetoleranz.

**[0006]** J. F. Kennedy et al. berichteten in Starch. Bd. 31, S. 235–241 (1979) von einem eine Maltohexaose bildende Amylase vom endo-Typ bildenden Mikroorganismus der Art Bacillus subtilis und Takasaki verkündete in Agricultural und Biological Chemistry, Bd. 46, S. 1539–1547 (1982) einen solch eine Amylase bildenden Mikroorganismus von Bacillus circulans G-6. Taniguchi berichtete in Denpun Kagaku (Starch Science), Bd. 29, S. 107–116 (1982), dass ein Mikroorganismus der Art Bacillus circulans F-2 solch eine Amylase bildet, und Hayashi et al. verkündeten in Agricultural and Biological Chemistry, Bd. 52, S. 443–448 (1988), dass ein Mikroorganismus der Art Bacillus sp. H-167 solch eine Amylase bildet. Es war bekannt, dass unter diesen aus solchen Mikroorganismen produzierten Amylasen solche von Bacillus circulans G-6, Bacillus circulans F-2 und Bacillus sp. H-167 Maltohexaose aus Stärke mit einer maximalen Ausbeute von ungefähr 25–30 Gew.-% (die Formulierung "Gew.-%" wird nachfolgend als "%" bezeichnet, sofern nicht anders spezifiziert), auf trockener Feststoffbasis (d. s. b.), bilden, aber, dass diese nicht Maltoheptaose bilden und diese ferner Maltohexaose zu Maltotetraose hydrolysieren, wenn deren enzymatischen Reaktionen fortschreiten.

**[0007]** Nunmehr Bezug nehmend auf aus Mikroorganismen der Art Bacillus subtilis abgeleitete Amylasen, bilden diese lediglich ungefähr 25% Maltohexaose aus Stärke und hydrolysieren Maltohexaose nicht. Solche Amylasen sind für eine Produktion von Sacchariden mit hohem Maltohexaosegehalt im industriellen Maßstab nicht geeignet, weil diese, während eine relativ große Menge an niedermolekularen Oligosacchariden unter Stärke-Verzuckerungs-Bedingungen bildend, Maltohexaose nicht in einer befriedigend hohen Ausbeute bilden und, weil diese nicht leicht in großen Mengen aus Mikroorganismen erhalten werden können.

**[0008]** In Agricultural and Biological Chemistry, Bd. 42, S. 259–267 (1978) wurde berichtet, dass eine aus Malz hergestellte, aufgereinigte α-Amylase beim Einwirken auf Stärke während des frühen Stadiums der enzymatischen Reaktion hauptsächlich Maltohexaose und Maltoheptaose bildet. Es wurde ebenfalls berichtet, dass die gebildete Maltohexaose und Maltoheptaose, während die enzymatische Reaktion fortschreitet, fast vollständig in niedermolekulare Oligosaccharide, wie Maltose und Maltotetraose, zersetzt werden, und diese daher kaum verzuckerte, hauptsächlich Maltohexaose und Maltoheptaose enthaltende Produkte aus Stärke

produziert.

**[0009]** Die vorliegenden Erfinder verfolgten eine neue Amylase, welche hauptsächlich Maltohexaose und Maltoheptaose aus Stärke bildet, und suchten nach Mikroorganismen, welche solche Amylasen bilden, und haben das Ziel erreicht. Als ein Ergebnis fanden diese, dass ein neuer Mikroorganismus der Gattung Alcaligenes oder Alcaligenes latus D2271, isoliert aus einem Erdboden nahe Komagatake in Yamanashi, Japan, eine neue Amylase bildet, die eine relativ große Menge an Maltohexaose und Maltoheptaose aus Stärke (in der Beschreibung teilweise als "AMYLASE" bezeichnet) bildet, haben diese die Herstellung von Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose durch Erlauben der Amylase, auf stärkehaltige Verbindungen einzuwirken, etabliert sowie ebenfalls Zusammensetzungen, wie Lebensmittelprodukte, Kosmetika, Pharmazeutika und geformte Produkte, etabliert. So haben sie diese Erfindung erreicht.

**[0010]** Die vorliegende Erfindung wird nun lediglich exemplarisch in weiteren Einzelheiten unter Bezugnahme auf die begleitenden Zeichnungen beschrieben, in welchen:

**[0011]** Fig. 1 den Einfluss der Temperatur auf die Aktivität der vorliegenden AMYLASE zeigt.

**[0012]** Fig. 2 den Einfluss des pH's auf die Aktivität der vorliegenden AMYLASE zeigt.

**[0013]** Fig. 3 den Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der vorliegenden AMYLASE zeigt.

**[0014]** Fig. 4 den Einfluss des pH's auf die Stabilität der vorliegenden AMYLASE zeigt.

**[0015]** Die vorliegende Erfindung beabsichtigt, eine neue Amylase bereitzustellen, welche eine relativ große Menge an Maltohexaose und Maltoheptaose aus Stärke bildet, aber die gebildete Maltohexaose und Maltoheptaose nicht wesentlich zersetzt, und zielt auf Präparation von Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose durch Verwenden der Amylase sowie auf Verwendungen der Saccharidzusammensetzungen ab.

**[0016]** Die Ergebnisse eines Identifikationstests des neuen Mikroorganismus Alcaligenes latus D2271 gemäß der Erfindung werden nachfolgend gezeigt. Der Test wurde gemäß dem in Biseibutsu-no-Bunrui-to-Dotei (Klassifizierung und Identifikation von Mikroorganismen), herausgegeben von Takeharu Hasegawa, veröffentlicht durch Gakkai Publishing Center, Tokio, Japan (1985) beschriebenen Verfahren durchgeführt.

A. Morphologie

(1) Charakteristika der gebildeten Zellen, wenn bei 27°C in Agar mit Kartoffeldextrose inkubiert:
Vorliegen in einer Bacillus-Form mit einer Größe von 0,7–1,3 × 1,3–2,4 μm und normalerweise in einer Einzelform vorliegend, aber ungewöhnlicherweise in einer gekoppelten oder verknüpften Form vorliegend;
Beweglichkeit, Asporogenität und Flagellum aufweisend;
Nicht säurebeständig;
Gram-Färbung: negativ;
Poly-β-hydroxybutyrat ansammelnd;
(2) Charakteristika der gebildeten Zellen, wenn bei 37°C in Agar mit Hefeextrakt und Malzextrakt inkubiert:
In einer Größe von ungefähr 0,5–1,0 × 1,3–2,4 μm nach 24 Stunden Inkubation und in einer Größe von ungefähr 0,5–1,0 × 1,0–2,5 μm nach 72 Stunden Inkubation vorliegend;
In einer Einzelform vorliegend;

B. Kultivierungseigenschaft

(1) Charakteristika der Kolonie, die sich bildet, wenn bei 37°C auf einer Agar-Platte mit Kartoffeldextrose inkubiert
Form: kreisförmige Kolonie mit einem Durchmesser von ungefähr 1 mm nach 24 Stunden Inkubation und ungefähr 3–4 mm nach 96 Stunden Inkubation;
Rand: vollständig;
Projektion: nabelförmig;
Glanz: matt;
Oberfläche: faltenartig; und
Farbe: opak, weiß oder ocker;
(2) Charakteristika der Kolonie, die sich bildet, wenn bei 37°C auf einer Agar-Platte mit Hefeextract und

Malzextrakt inkubiert
Form: kreisförmige Kolonie mit einem Durchmesser von ungefähr 3–5 mm nach 96 Stunden Inkubation;
Rand: vollständig;
Projektion: Halblinsentyp;
Glanz: glitzernd;
Oberfläche: glatt; und
Farbe: weiß oder cremig;
(3) Charakteristika der gebildeten Kolonie, wenn bei 37°C in schrägem Agar mit Kartoffeldextrose inkubiert;
Wachstum: zufriedenstellend;
Gestalt: fadenartig;
(4) Charakteristika der gebildeten Kolonie, wenn bei 37°C in einer Gelatine-Platte mit verflüssigtem Hefeextrakt und Malzextrakt stabkultiviert;

C. Physiologische Eigenschaften

(1) Nitratreduktion: positiv in Succinat-Medium;
(2) Denitrifizierungsreaktion: negativ;
(3) Methyl-Rot-Test: negativ;
(4) VP-Test: negativ;
(5) Indolbildung: negativ;
(6) Schwefelwasserstoffbildung: negativ;
(7) Stärkehydrolyse: positiv;
(8) Verwertung von Zitronensäure: negativ;
(9) Verwertung anorganischer Stickstoffquelle: Verwertung von Ammoniumsalzen und -nitraten;
(10) Pigmentbildung: negativ;
(11) Urease: positiv;
(12) Oxidase: positiv;
(13) Katalase: positiv;
(14) Wachstumsbedingungen: wachsend bei einem pH in dem Bereich von 5–8 und einer Temperatur von 10–41°C;
(15) Sauerstoffanforderungen: aerob;
(16) Verwertung von Kohlenstoffquelle und Säurebildung

| Kohlenstoffquelle | Verwertung | Säurebildung |
|---|---|---|
| D-Glucose | + | - |
| D-Galaktose | + | - |
| D-Mannose | + | - |
| D-Fructose | + | - |
| L-Arabinose | + | - |
| D-Xylose | + | - |
| L-Rhamnose | + | - |
| Maltose | + | - |
| Sucrose | + | - |
| Laktose | + | - |
| Trehalose | + | - |
| Raffinose | + | - |
| Mannit | - | - |
| Dextrin | + | - |
| Dulcit | - | - |

(17) Decarboxylasetest auf Aminosäure: negativ gegenüber L-Lysin, L-Arginin und L-Ornithin;
(18) DNase: negativ;
(19) Bildung von 3-Ketolaktose: negativ; und
(20) Mol-% Guanin (G) plus Cytosin (C) von DNA: 67%.

**[0017]** Die bakteriologischen Eigenschaften wurden mit denen von bekannten Mikroorganismen unter Bezugnahme auf Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Bd. 1 (1984) verglichen. Als ein Ergebnis wurde gezeigt, dass der Mikroorganismus als ein Mikroorganismus der Art Alcaligenes latus identifiziert wurde.

**[0018]** Basierend auf diesen Ergebnissen nannten die vorliegenden Erfinder diesen Mikroorganismus "Alcaligenes latus D2271" und hinterlegten ihn am 23. Februar 1994 im Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ibaraki, Japan.

**[0019]** Die Hinterlegung des Mikroorganismus wurde noch am selben Tag akzeptiert und wurde durch das Institut unter der Zugangsnummer FERM BP-4578 aufrecht erhalten.

**[0020]** Zusätzlich zu dem vorgenannten Mikroorganismus können andere Stämme der Art Alcaligenes latus und deren Mutanten in der Erfindung geeigneterweise eingesetzt werden, solange diese die vorliegende AMYLASE produzieren.

**[0021]** Jedes Nährkulturmedium kann in der Erfindung eingesetzt werden, solange diese Mikroorganismen darin wachsen und die vorliegende AMYLASE produzieren können und daher können synthetische und natürliche Nährkulturmedien als ein Nährkulturmedium eingesetzt werden. Jede kohlenstoffhaltige Verbindung kann in der Erfindung als eine Kohlenstoffquelle eingesetzt werden, solange diese durch die Mikroorganismen verwertet wird: Beispiele solcher Kohlenstoffquellen sind Saccharide, wie Maltose, Dextrin und Stärke; und natürliche Verbindungen von Saccharid enthaltenden Substanzen, wie Theriac und Hefeextrakt. Die Konzentration dieser in den Nährkulturmedien eingesetzten Kohlenstoffquellen werden abhängig von dem Typ an eingesetzten Kohlenstoffquellen passend gewählt. Bspw. betragen die Konzentrationen an in den Medien eingesetzter Stärke normalerweise 20% oder weniger, insbesondere 5% oder weniger, d. s. b., und zwar im Hinblick auf das Wachstum der Mikroorganismen. Die in der Erfindung einsetzbaren Stickstoffquellen sind bspw. anorganische Stickstoffverbindungen, wie Ammoniumsalze und -nitrate; und organische, Stickstoff enthaltende Verbindungen, wie Harnstoff, Maiseinweichflüssigkeit, Kasein, Pepton, Hefeextrakt und Rinderextrakt. Die in der Erfindung einsetzbaren anorganischen Bestandteile sind bspw. Calciumsalze, Magnesiumsalze, Kaliumsalze, Natriumsalze, Phosphate und andere Salze von Mangan, Zink, Eisen, Kupfer, Molybdän und Kobalt.

**[0022]** Die in der Erfindung eingesetzten Mikroorganismen werden unter aeroben Bedingen bei einer Temperatur normalerweise in dem Bereich von 10–40°C, vorzugsweise in dem Bereich von 25–37°C, und bei einem pH in dem Bereich von 5–8, vorzugsweise in dem Bereich von 6–7,5, kultiviert. Die in der Erfindung eingesetzte Kultivierungszeit wird auf eine Zeit eingestellt, die länger ist als jene, die für die Wachstumsanregung der Mikroorganismen erforderlich ist, vorzugsweise 10–100 Stunden. Die Konzentration an in den Nährkulturmedien gelöstem Sauerstoff (DO) ist nicht spezifisch beschränkt, diese wird aber üblicherweise auf einen Wert in dem Bereich von 0,5–20 ppm eingestellt. Die DO-Konzentration kann durch Kontrollieren der Belüftung, Rühren und Belüftung mit Sauerstoff und/oder durch Erhöhen des Innendrucks des Fermenters innerhalb dieses Bereiches gehalten werden. Die Kultivierung wird chargenweise oder in kontinuierlicher Weise durchgeführt.

**[0023]** Nach Beendigung der Kultivierung der Mikroorganismen wird die vorliegende AMYLASE aus den resultierenden Kulturen gesammelt, wenn die Aktivität der vorliegenden AMYLASE, welche intakt oder als Rohenzym eingesetzt werden kann, in den resultierenden Nährkulturmedien vorliegt. Herkömmliche Flüssig-Fest-Trennverfahren können in der vorliegenden Erfindung als eine Methode zum Abtrennen von Mikroorganismen aus Nährkulturmedien eingesetzt werden. Bspw. können geeigneterweise Verfahren zum direkten Zentrifugieren der Kulturen, Filtrieren der Kulturen mit Anschwemmfiltern und Abtrennen der Mikroorganismen durch Membranfiltration unter Verwendung von einfachen Filtern oder Folgefasern angewandt werden. Kulturen frei an Mikroorganismen können als ein Rohenzym eingesetzt werden und vorzugsweise können diese auf herkömmliche Weise vor der Verwendung konzentriert werden: Bspw. können Aussalzen unter Verwendung von Ammoniumsulfat, Sedimentation unter Verwendung von Aceton und Alkohol sowie Konzentration unter Verwendung von Membranen, wie einfachen Filtern und Folgefasern, eingesetzt werden.

**[0024]** Kulturen frei an Mikroorganismen und Konzentrate hiervon können durch herkömmliche Verfahren immobilisiert werden. Beispiele solcher herkömmlicher Verfahren sind Konjugationsverfahren unter Verwendung von Ionenaustauschern, kovalente Bindungs- und Absorptionsverfahren unter Verwendung von Harzen und

Membranen sowie Einschlussverfahren unter Verwendung von Substanzen mit hohem Molekulargewicht.

**[0025]** Rohenzyme können ohne weitere Behandlung eingesetzt werden oder können auf gewöhnliche Weise gereinigt werden. Bspw. kann ein, eine einzige Bande bei Elektrophorese ergebendes Enzym durch Dialysieren von Rohenzympräparationen, welche durch Aussalzen von Kulturen, um Mikroorganismen mit Ammoniumsulfat zu entfernen, sowie Konzentrieren der resultierenden Lösungen präpariert wurde, hergestellt werden. Das Konzentrat wurde dialysiert und sukzessive mit Anionenaustauschsäulenchromatographie unter Verwendung von "DEA TOYOPEARL®", einem von Tosoh Corporation, Tokio, Japan kommerziell vertriebenen Anionenaustauschharz; hydrophober Säulenchromatographie unter Verwendung von "BUTYL TOYOPEARL®", einem von Tosoh Corporation, wie zuvor beschrieben, kommerziell vertriebenen hydrophoben Harz; und Säulenchromatographie unter Verwendung von "PHENYL SUPERROSE® HR5/5", kommerziell vertrieben von Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Schweden, aufgereinigt.

**[0026]** Die so erhaltene vorliegende AMYLASE hat die folgenden physikalisch-chemischen Eigenschaften:

(1) Wirkung
Bei Einwirken auf Stärke hauptsächlich Maltohexaose und Maltoheptaose bildend, aber nicht wesentlich niedrigermolekulare Oligosaccharide als Maltohexaose hydrolysierend und im Wesentlichen nicht auf Maltoheptaose einwirkend;
(2) Molekulargewicht
43.000 ± 3.000 Daltons auf Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE);
(3) Isoelektrischer Punkt (pI)
7,6 ± 0,5 bei Isoelektrophorese verwendend ein Ampholyt;
(4) optimaler pH
ungefähr 5,0 in der Gegenwart von Calciumionen;
(5) optimale Temperatur
ungefähr 70°C in der Gegenwart von Calciumionen;
(6) pH-Stabilität
stabil bei einem pH in dem Bereich von ungefähr 4,5–10,5 in der Gegenwart von Calciumionen;
(7) Thermische Stabilität
stabil bis zu einer Temperatur von ungefähr 60°C in der Gegenwart von Calciumionen;
(8) Förderung der Aktivität und Stabilisierung
ihre Aktivität wird durch Calciumionen gefördert und stabilisiert;
(9) Inhibition
wird durch Kupferionen, Bleiionen, Zinkionen, Quecksilberionen und EDTA inhibiert.

**[0027]** Die Aktivität der vorliegenden AMYLASE wird folgendermaßen analysiert: 0,2 ml einer Enzymlösung werden 5 ml einer 0,3%-igen (w/v) löslichen Stärke in 20 mM Phosphatpuffer (pH 5,5) enthaltend 1 mM $CaCl_2$ zugefügt und die Mischungslösung wird bei 40°C für 10 Minuten inkubiert, gefolgt vom Sammeln von 0,5 ml der resultierenden Lösung und Zufügen der Lösung zu 15 ml einer 0,02 N Sulfatlösung, um die Enzymreaktion auszusetzen. Die Resultierende wird mit 0,2 ml 0,1 N Jodlösung vermischt, gerührt, dieser erlaubt, bei 25°C für 15 min stehen zu bleiben, und ihre Absorption bei einer Wellenlänge von 660 nm bestimmt. Eine Einheit Aktivität der vorliegenden AMYLASE wird definiert als die Menge an Enzym, welche die Jodfärbung von 15 mg löslicher Stärke verringert, wenn bei 40°C für 10 Minuten reagiert.

**[0028]** Wenn die vorliegende AMYLASE eingesetzt wird, um Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose zu produzieren, wird dieser zufriedenstellend erlaubt, auf stärkehaltige Verbindungen als Substrat, wie Stärke, Amylopektin, Amylose und Stärkehydrolysaten mit einem industriellen Gesichtspunkt einzuwirken. Im Falle der Herstellung von Lebensmitteln und Getränken enthaltend stärkehaltige Verbindungen kann der vorliegenden AMYLASE ggf. erlaubt werden, auf solche Lebensmittel und Getränke einzuwirken, um darin Maltohexaose und/oder Maltoheptaose zu bilden, um Retrogradation der stärkehaltigen Verbindungen zu vermeiden und die Lagerzeit hiervon zu erhöhen.

**[0029]** Die vorliegende AMYLASE wird zu einer Lösung, welche ungefähr 5–45% stärkehaltige Verbindungen und vorzugsweise des weiteren ungefähr 0,5–50 mM Calciumsalze, wie Calciumchlorid, enthält, in einer Menge von 0,5–20 Einheiten/g stärkehaltiger Verbindungen, d. s. b., zugefügt, gefolgt von der enzymatischen Reaktion bei einem pH von 3–8 und einer Temperatur von 40–90°C für 1–100 Stunden.

**[0030]** Um den höchstmöglichen Gehalt an Maltohexaose und Maltoheptaose in den Reaktionsmischungen zu erhalten, ist es wünschenswert, der vorliegenden AMYLASE zu erlauben, auf Stärkehydrolysate, welche sorgfältig mit Säuren oder α-Amylase präpariert wurden, um die Verflüssigung so gering wie möglich zu halten,

d. h. bei einer DE von weniger als 10, vorzugsweise einer DE von weniger als 5, einzuwirken.

**[0031]** In der vorliegenden enzymatischen Reaktion werden die Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaose und Maltoheptaose und deren Inhalt leicht variiert und unter Verwendung der vorliegenden AMYLASE und anderer sich auf stärkehaltige Verbindungen beziehender Enzym(e), wie Cyclomaltodextringlucanotransferase (EG 2.4.1.19), α-Amylase (EC 3.2.1.1), β-Amylase (EC 3.2.1.2), Glucoamylase (EC 3.2.1.3), α-Glucosidase (EC 3.2.1.20), Pullulanase (EC 3.2.1.41), Isoamylase (EC 3.2.1.68) und Maltotetraose bildende Amylase (EC 3.2.1.60), erhöht.

**[0032]** Eine Erhöhung der Ausbeute an Maltohexaose und Maltoheptaose ist durch Unterwerfen der stärkehaltigen Verbindungen der Wirkung der vorliegenden AMYLASE zusammen mit Pullunase und Isoamylase leicht durchführbar. Maltohexaose und Maltoheptaose können willkürlich durch Verwenden der resultierenden Saccharidzusammensetzungen als ein Material, welches insgesamt ungefähr 30–50%, d. s. b., an Maltohexaose und Maltoheptaose enthält, und durch Abtrennen der Verunreinigungen an Sacchariden und Dextrin willkürlich erhalten werden.

**[0033]** Als ein Beispiel für die in der vorliegenden Erfindung einsetzbaren Trennverfahren kann ein Verfahren unter Verwendung einer semipermeablen Membran wie in der japanischen Patentoffenlegungsschrift Nr. 4,647/73 offenbart, ein Verfahren unter Verwendung eines Fällungsmittels wie in der japanischen Patentoffenlegungsschrift Nr. 102,854/74 offenbart und ein Verfahren unter Verwendung eines stark sauren Kationenaustauscherharzes wie in der japanischen Patentoffenlegungsschrift Nr. 148,794/84 offenbart willkürlich eingesetzt werden. Diese Verfahren ermöglichen die Präparation von Sacchariden mit hohem Maltohexaosegehalt und von Sacchariden mit hohem Maltoheptaosegehalt mit einer Reinheit von 90% oder höher, d. s. b.. Insbesondere Verfahren unter Verwendung von stark sauren Kationenaustauscherharzen können vorteilhaft in einem industriellen Maßstab eingesetzt werden, um begleitende Saccharide zu entfernen und Lösungen mit hohem Gehalt an Maltohexaose und/oder Maltoheptaose zu erhalten. In diesem Fall kann jedes Festbett-, Wanderbett- und Halb-Wanderverfahren eingesetzt werden.

**[0034]** Reaktionsmischungen nach enzymatischer Reaktion oder Lösungen erhalten durch Entfernen begleitender Saccharide aus den Reaktionsmischungen werden in gewöhnlicher Weise Filtration und Zentrifugation unterworfen, um unlösliche Substanzen zu trennen, und die resultierenden Lösungen werden mit Aktivkohle entfärbt, mit Anionenaustauschern in H- und OH-Form entsalzt sowie zu sirupartigen Produkten konzentriert. Falls erforderlich können die sirupartigen Produkte leicht durch Sprühtrocknungsverfahren etc. zu pulverförmigen Produkten getrocknet werden.

**[0035]** Die resultierenden Saccharidzusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose enthalten normalerweise Maltohexaose und/oder Maltoheptaose in einer Menge von 30% oder mehr und vorzugsweise 40% oder mehr, d. s. b.. Obwohl die Eigenschaften der pulverförmigen Produkte abhängig von dem Gehalt an Maltohexaose und/oder Maltoheptaose variieren, weisen die Produkte im Wesentlichen eine Nicht-Hygroskopizität, Nicht-Vertestigung und freie Fließfähigkeit auf und aufgrund dessen können die Material- und Laborkosten für Verpacken, Transport und Lagerung um eine hohe Marge gekürzt werden.

**[0036]** Die so erhaltenen pulverförmigen Produkte weisen im Wesentlichen eine Nicht-Hygroskopizität und eine relativ hohe thermische Toleranz und Stabilität auf und aufgrund dessen können diese willkürlich als ein Füllstoff, Bindemittel, Adjuvans und pulverartige Basis in einem pulverartig vermischten Süßmittel, Saftfertigmischung, Suppenfertigmischung, Granulat und Tablette, welche bisher sehr schwer herzustellen waren, willkürlich eingesetzt werden. Die pulverförmigen Produkte können ebenfalls in einer Puddingfertigmischung, Fertigmischung für heißen Kuchen, Konditormaterial, Brotmaterial und Getreidematerial eingesetzt werden durch Ersetzen eines Teils oder des Ganzes der Produkten in Pulverform, wie Weizen, Getreidekörner und Stärke. Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaitol und/oder Maltoheptaitol mit einer befriedigend hohen chemischen Stabilität können willkürlich durch Hydrieren von Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose hergestellt werden.

**[0037]** Beispielsweise wird eine Saccharidzusammensetzung enthaltend Maltohexaose und Maltoheptaose zu einer Lösung mit einer Konzentration von ungefähr 40–60%, d. s. b., präpariert und die Lösung wird Autoklavieren unterworfen, mit Raney-Nickel als einem Katalysator in einer Menge von ungefähr 8–10%, d. s. b., vermischt und bis zu einer Temperatur von 90–140°C unter Rühren erhitzt, gefolgt vom Erhöhen des Wasserstoffdruckes auf bis zu 20–150 kg/cm$^2$, um die Hydrierung zu beenden. Daran anschließend wird das Raney-Nickel entfernt und gleichermaßen wie in der Präparation der Saccharidzusammensetzungen enthaltend

Maltohexaose und/oder Maltoheptaose entfärbt; entsalzt, aufgereinigt und zu sirupartigen Produkten konzentriert. Falls erforderlich können die sirupartigen Produkte zu pulverförmigen Produkten sprühgetrocknet werden.

**[0038]** Die resultierenden Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaitol und Maltoheptaitol enthaften üblicherweise Maltohexaitol und Maltoheptaitol in einer Menge von nicht weniger als 30%, d. s. b.. Maltohexaitol und/oder Maltoheptaitol mit einer hohen Reinheit können gleichermaßen wie bei der Herstellung von Maltohexaose und Maltoheptaose leicht durch Fraktionierung umfassend Entfernen begleitender Saccharide aus Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaitol und/oder Maltoheptaitol als ein Material erhalten werden.

**[0039]** Die vorgenannten Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose oder solche enthaltend Maltohexaitol und/oder Maltoheptaitol können willkürlich eingesetzt werden als ein Niedrig-Süßmittel, Füllstoff, viskositätskontrollierendes Agens, feuchtigkeitszurückhaltendes Agens, glanzverleihendes Agens, aromabewahrendes Agens, kristallisationsverhinderndes Agens, klebrigkeitsverhinderndes Agens für Bonbons und stärkeretrogradationsverhinderndes Agens. Die Saccharidzusammensetzungen können willkürlich in Lebensmitteln, Getränken, Futter, Kosmetika, Pharmazeutika und geformten Produkten als ein energiesupplementierendes Agens eingesetzt werden und können ebenfalls in einer Vielzahl von Zusammensetzungen, wie Haushaltsartikeln, Materialien für Land- und Forstwirtschaft, chemischen Reagentien und Materialien für die chemische Industrie eingesetzt werden.

**[0040]** Obwohl die Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose oder solche enthaltend Maltohexaitol und/oder Maltoheptaitol eine relativ geringe Süßheit aufweisen, können diese intakt als Würzmittel zum Süßen eingesetzt werden. Falls erforderlich können diese zusammen mit angemessenen Mengen eines oder mehrerer anderer Süßmittel, bspw. pulverisiertem Sirup, Glucose, Maltose, Sucrose, isomerisiertem Zucker, Honig, Ahornzucker, Sorbitol, Maltitol, Lactitol, Dihydrocharcon, Steviosid, α-Glucosylsteviosid, Rebaudiosid, Glycyrrhizin, L-Aspartyl-L-phenylalaninmethylester, Saccharin, Glycin und Alanin; und/oder einem Füllstoff, wie Dextrin, Stärke oder Laktose, eingesetzt werden.

**[0041]** Die Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose oder solche enthaltend Maltohexaitol und/oder Maltoheptaitol weisen die folgenden Merkmale auf: (i) Diese weisen eine Süßheit auf, welche gut mit anderen Materialen mit sauren, säuerlichen, salzigen, bitteren, astringgenten und deliziösen Geschmack harmonisieren; und (ii) diese sind hoch säure- und hitzeresistent. Folglich können diese vorteilhaft in Lebensmittelprodukten im Allgemeinen als ein Süßmittel, geschmacksverbesserndes Agens oder qualitätsverbesserndes Agens eingesetzt werden.

**[0042]** Die Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose oder solche enthaltend Maltohexaitol und/oder Maltoheptaitol können in Würzmitteln, wie Sojasoße, pulverförmiger Sojasoße, "miso", "funmatsu-miso" (ein pulverförmiges miso), "moromi" (verfeinerter Sake), "hishio" (eine verfeinerte Sojasoße), "furikake" (eine gewürzte Fischspeise), Majonäse, Dressing, Essig, "sanbai-zu" (eine Soße aus Zucker, Sojasoße und Essig), "funmatsu-sushi-su" (pulverförmiger Essig für Sushi), "chuka-no-moto" (eine Fertigmischung für eine chinesische Speise), "tentsuyu" (eine Soße für frittierte japanische Speisen), "mentsuyu" (eine Soße für japanische Glasnudeln), Soße, Ketchup, "takuan-zuke-no-moto" (eine Vormischung für eingelegten Rettich), "hakusai-zuke-no-moto" (eine Vormischung für eingelegten frischen weißen Raps), "yakiniku-no-tare" (eine Soße für japanisches Grillfleisch), Currymehlschwitze, Fertigeintopfmischungen, Fertigsuppenmischungen, "dashi-no-moto" (eine Fertigmischung für Brühe), Nukleinsäure-Würzen, Würzmischungen, "mirin" (ein süßer Sake), "shin-mirin" (ein künstlicher Mirin), Tafelzucker und Zucker für Kaffee eingesetzt werden. Ebenfalls kann das Saccharid enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose oder das Saccharid enthaltend Maltohexaitol und/oder Maltoheptaitol frei eingesetzt werden zum Süßen von "wagashi" (japanischer Kuchen), wie "senbei" (ein Reiscracker), "arare-mochi" (ein Reiskuchenwürfel), "okoshi" (Kuchen aus Hirse und Reis), "mochi" (Reisbrei), "manju" (Brötchen mit Bohnenkonfitüre), "uiro" (ein süßes Reisgelee), "an" (eine Bohnenkonfitüre), "yokan" (ein süßes Gelee aus Bohnen), "mizu-yokan" (ein weiches Reis-Bohnen-Gelee), "kingyoku" (eine Art von Yokan), Gelee, Pao de Castella und "amedama" (ein japanischer Toffee); Konditorwaren, wie bspw. Brötchen, Kekse, Cracker, Plätzchen, Pastete, Pudding, Buttercreme, Puddingcreme, Creme-Backwerk, Waffel, Bisquitkuchen, Doughnut, Schokolade, Kaugummi, Karamell und Süßigkeiten; gefrorene Desserts, wie bspw. Eiscreme und Sorbet, Sirupe, wie bspw. "kajitsu-no-syrup-zuke" (eine eingelegte Frucht) und "korimitsu" (ein Zuckersirup für geschabtes Eis); Pasten, wie bspw. Mehlpaste, Erdnusspaste, Fruchtpaste und Aufstrich; verarbeitetem Obst und Gemüse, wie bspw. Konfitüre, Marmelade, "syrup-zuke" (eingelegtes Obst) und "toka" (Eingemachtes); Pickles und eingelegten Produkten wie bspw. "fukujin-zuke" (eingelegte rote Rettiche), "bettara-zuke" (eine Art eingelegter ganzer frischer Rettich), "senmai-zuke" (eine Art

eingelegter geschnittener frischer Rettich) und "rakkyo-zuke" (eingelegte Schalotten); Fleischprodukten, wie bspw. Schinken und Wurst; Fischmehlprodukten, wie bspw. Fischschinken, Fischwurst, "kamaboko" (eine gedünstete Fischpaste), "chikuwa" (eine Art Fischpaste) und "tenpura" (eine frittierte japanische Fischpaste); "chinmi" (Hors d' Oeuve), wie bspw. "uni-no-shiokara" (gesalzene Seeigelinnereien), "ika-no-shiokara" (gesalzene Tintenfischinneren), "su-konbu" (verarbeiteter Tang), "saki-surume" (getrocknete Tintenfischstreifen) und "fugu-no-mirin-boshi" (getrockneter mirin gewürzter Kugelfisch), "tsukudani" (in Sojasoße gekochte Speisen), wie bspw. jenen aus Purpurtang, essbaren Wildpflanzen, getrocknetem Tintenfisch, Fisch und Schalentieren; alltäglichen Gerichten, wie bspw. "nimame" (gekochte Bohnen), Kartoffelsalat und "konbu-maki" (Tangrolle); Milchprodukten, in Dosen konservierten und in Flaschen abgefüllten Produkten, wie bspw. solchen aus Fleisch, Fisch, Obst und Gemüse; alkoholischen Getränken, wie bspw. verfeinertem Sake, künstlichem Sake, Spirituosen und ausländischen Weinen, alkoholfreien Getränken, wie bspw. Tee, Kaffee, Kakao, Saft, kohlensäurehaltigen Getränken, Sauermilchgetränken und Getränken enthaltend ein Milchsäurebakterium, Fertigmischung für heißen Kuchen und "sokuseki-shiruko" (eine Fertigmischung für eine Reis-Bohnen-Suppe mit Reiskuchen) und Fertigsuppenmischungen; sowie Getränken, wie bspw. Babyspeisen, Speisen für die Heilbehandlung, mit Nährstoffen supplementierten Getränken, Peptidlebensmitteln und gefrorenen Lebensmitteln, sowie zum Verbessern von Geschmack und Qualität der vorgenannten Lebensmittelprodukte verwendet werden.

**[0043]** Die vorliegenden Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose oder solche enthaltend Maltohexaitol und/oder Maltoheptaitol können ebenfalls in Futtermitteln und Haustiernahrungen für Haustiere, Geflügel und Fische eingesetzt werden, um deren Geschmackspräferenzen zu verbessern. Diese Saccharidzusammensetzungen können willkürlich als Süßmittel, geschmacksverbesserndes Agens oder qualitätsverbesserndes Agens in anderen Produkten in der Form eines Feststoffes, Paste oder Flüssigkeit, wie bspw. Tabak, Zigarette, Zahnputzmittel, Lippenstift, Rouge, Lippencreme, Medizin für die interne Anwendung, Tablette, Pastille, Lebertran in Form von Tropfen, Kaschu, oralen Kühlgetränk, Gurgelmittel, Kosmetika oder Pharmazeutika verwendet werden.

**[0044]** Die vorliegenden Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose oder solche enthaltend Maltohexaitol und/oder Maltoheptaitol können als ein qualitätsverbesserndes Agens oder ein Stabilisierungsmittel für biologisch aktive Verbindungen, anfällig, ihre wirksamen Bestandteile und Aktivitäten zu verlieren, sowie in Gesundheitslebensmitteln und Pharmazeutika enthaltend biologisch aktive Verbindungen eingesetzt werden. Beispiele für solche biologisch aktiven Substanzen sind Lymphokine, wie bspw. α-, β- und γ-Interferone, Tumornekrosefaktor-α (TNF-α), Tumornekrosefaktor-β (TNF-β), macrophagenwanderungsinhibierender Faktor und Interleukin 2; Hormone, wie bspw. Insulin, Wachstumshormon, Prolaktin, Erythropoietin, follikelstimulierendes Hormon und Plazentahormon, biologische Präparationen, wie bspw. BCG-Impfstoff gegen japanische Enzephalitis, Masernimpfstoff, lebender Polio-Impfstoff, Pockenimpfstoff, Tetanus-Toxoid, Gegengift gegen Trimeresurus flavoviridis und humanes Immunoglobulin; Antibiotika wie bspw. Penicillin, Erythromycin, Chloramphenicol, Tetracyclin, Streptomycin und Kanamycinsulfat; Vitamine, wie Thiamin, Riboflavin, L-Ascorbinsäure, Lebertran, Carotinoid, Ergosterol und Tocopherol; Enzyme, wie bspw. Lipase, Elastase, Urokinase, Protease, β-Amylase, Isoamylase, Glucanase und Laktose; Extrakte, wie bspw. Ginsengextrakt, Schnappschildkrötenextrakt, Chlorellaextrakt, Aloeextrakt und Propolisextrakt; lebensfähige Mikroorganismen, wie bspw. Viren, Milchsäurebakterien und Hefen; und andere biologisch aktive Verbindungen, wie bspw. Gelee royale. Durch Verwenden der vorliegenden Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose oder solcher enthaltend Maltohexaitol und/oder Maltoheptaitol werden die zuvor genannten biologisch aktiven Verbindungen willkürlich in Gesundheitslebensmittel und Pharmazeutika mit einer befriedigend hohen Stabilität und Qualität ohne Befürchtung, deren wirksamen Bestandteile und Aktivitäten zu verlieren oder zu inaktivieren, präpariert.

**[0045]** Wie zuvor beschrieben können die Saccharidzusammensetzungen gemäß der vorliegenden Erfindung willkürlich in oral oder parenteral zu applizierenden Lebensmitteln, Getränken, Kosmetika und Pharmazeutika sowie in Haushaltsartikeln, Materialien für Land- und Forstwirtschaft, chemischen Reagenzien und Materialien für die chemische Industrie eingesetzt werden.

**[0046]** Verfahren zum Einarbeiten der vorliegenden Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose oder solcher enthaltend Maltohexaitol und/oder Maltoheptaitol in die oben genannten Produkte sind herkömmliche, wie bspw. Vermischen, Auflösen, Einweichen, Durchsetzen, Bespritzen, Auftragen, Besprühen, Injizieren und Verfestigen, solange die Einarbeitung vor Komplettierung der Verarbeitung erreicht wird. Obgleich die Menge an diesen einzuarbeitenden Saccharidzusammensetzungen abhängig von den eingesetzten Zusammensetzungen variiert wird, liegt diese üblicherweise bei 0,1% oder höher, vorzugsweise 0,5% oder höher mit Bezug auf Maltohexaose, Maltoheptaose, Maltohexaitol und Maltoheptaitol, d. s. b.. Die nachfolgenden Versuche erläutern die vorliegende Erfindung in mehr Einzelheiten:

Versuch 1

Herstellung des Enzyms

**[0047]** Ein flüssiges Nährkulturmedium bestehend aus 2,0 Gew.-% löslicher Stärke, 0,5 Gew.-% Pepton, 0,1 Gew.-% Hefeextrakt, 0,1 Gew.-% Kaliumdiphosphat, 0,06 Gew.-% Natriumphosphatdihydrat, 0,05 Gew.-% Magnesiumsulfatheptahydrat, 0,5 Gew.-% Calciumcarbonat und Wasser wurden in ungefähr 100 ml Teilmengen in 500-ml Erlenmeyer-Flaschen platziert und bei 121°C für 15 Minuten autoklaviert, um Sterilisation zu bewirken, abgekühlt, mit einer Stammkultur von Alcaligenes latus D2271 (FERM BP-4578) inokuliert und bei 37°C für 20 Stunden unter rührenden und schüttelnden Bedingungen bei 200 Upm (rpm) inkubiert. Die resultierenden Kulturen wurden vereinigt und als Impfkultur verwendet.

**[0048]** Ungefähr 20 l einer frischen Präparation desselben in der zuvor genannten Kultur eingesetzten Nährkulturmediums wurden in einen 30 l Fermenter platziert, sterilisiert, auf 37°C abgekühlt, mit einem Vol.-% der Impfkultur inokuliert und für ungefähr 24 Stunden unter Rühren unter aeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert. Ungefähr 19 l der Kultur wurden zentrifugiert, um ungefähr 18 l an Kulturüberstand zu erhalten. Die AMYLASE-Aktivität des resultierenden Kulturüberstandes betrug ungefähr 58 Einheiten/ml.

Versuch 2

Aufreinigung des Enzyms

**[0049]** Der in Versuch 1 erhaltene Kulturüberstand wurde einer UF-Membranfiltration unterworfen, um ungefähr 800 ml an konzentrierter Enzymlösung mit 1.200 Einheiten/ml der AMYLASE zu erhalten. Dreihundert ml des resultierenden Enzymkonzentrates wurden gegen 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) enthaltend 5 mM Calciumchlorid für 24 Stunden dialysiert und zentrifugiert, um unlösliche Verbindungen zu entfernen. Vierhundert ml des resultierenden dialysierten Überstandes wurden einer Säulenchromatographie unter Verwendung einer Säule gepackt mit 100 ml "DEAE-TOYOPEARL® 650", einem Ionenaustauscher, unterworfen.

**[0050]** Die vorliegende AMYLASE adsorbierte nicht an dem Ionenaustauscher und die Aktivität wurde in den nicht adsorbierten Fraktionen gefunden. Die Fraktionen mit der Zielenzymaktivität wurden vereinigt und gegen eine frische Präparation desselben Puffers enthaltend 0,5 M Ammoniumsulfat dialysiert. Die so erhaltene dialysierte Lösung wurde zentrifugiert, um unlösliche Verbindungen abzutrennen, und der resultierende Überstand wurde einer hydrophoben Säulenchromatographie unter Verwendung einer mit 100 ml "BUTYL-TOYOPEARL® 650", einem hydrophoben Gel, gepackten Säule unterworfen. Das auf dem Gel adsorbierte Enzym wurde von der Säule mit einem linearen Gradientenpuffer im Bereich von 0,5 M bis 0 M eluiert, gefolgt vom Wiedergewinnen der Fraktionen mit der Enzymaktivität. Die resultierenden Fraktionen wurden einer hydrophoben Säulenchromatographie unter Verwendung von "PHENYL SUPERROSE® HR5/5" unterworfen, gefolgt vom Wiedergewinnen von Fraktionen mit der Enzymaktivität.

**[0051]** Die Ausbeute der zuvor erhaltenen, aufgereinigten Enzympräparation betrug ungefähr 25% mit Bezug auf den Kulturüberstand. Die spezifische Aktivität der aufgereinigten Enzympräparation betrug ungefähr 1.860 Einheiten/mg Protein. Das Protein wurde bezüglich dessen Quantität mit dem Lowry-Verfahren unter Verwendung von Rinderserumalbumin als Standard bestimmt. Die aufgereinigte Proteinpräparation wurde bezüglich ihrer Reinheit auf Elektrophorese unter Verwendung von 7,5 Gew.-% Polyacrylamidgel bestimmt, um eine einzige Proteinbande zu erhalten, und dies zeigte, dass die Präparation ein elektrophoretisch homogenes Enzym mit einer relativ hohen Reinheit war.

Versuch 3

Eigenschaften des Enzyms

**[0052]** Die in Versuch 3 erhaltene AMYLASE-Präparation wurde einer Elektrophorese unter Verwendung von 10 Gew.-% Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel unterworfen und dies zeigte, dass das Molekulargewicht ungefähr 43.000 ± 3.000 Daltons im Vergleich mit denen des von Japan Bio-Rad Laboratories, Tokio, Japan kommerziell vertriebenen Proteinmarkers aufwies.

**[0053]** Die aufgereinigte AMYLASE-Präparation wurde einer Isoelektrophorese unter Verwendung von Polyacrylamidgel enthaltend 2 Gew.-% "AMPHOLINE", ein von Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Schweden kommerziell vertriebener Ampholyt, unterworfen. Das resultierende Gel wurde bezüglich dessen pH

untersucht, um zu zeigen, dass das Enzym einen pI von ungefähr 7,6 ± 0,5 aufwies.

**[0054]** Die Effekte von Temperatur und pH auf die Enzymaktivität wurden in der Gegenwart von Calciumchlorid im Einklang mit dem zur Bestimmung der Enzymaktivität eingesetzten Assay studiert. Diese Ergebnisse wurden in den Fig. 1 bzw. Fig. 2 gezeigt. Die optimale Temperatur betrug ungefähr 70°C und der optimale pH betrug ungefähr 5,0. Die thermische Stabilität des Enzyms wurde durch Inkubieren desselben in 20 mM Acetatpuffer enthaltend 5 mM Calciumchlorid (pH 6,0) bei unterschiedlichen Temperaturen für 60 min, Abkühlen der Puffer und Untersuchen der verbleibenden Enzymaktivität in jedem Puffer bestimmt. Die pH-Stabilität des Enzyms wurde durch Inkubieren desselben in 20 mM Acetatpuffer mit unterschiedlichen pH's bei 40°C für eine Stunde, Einstellen des Puffers auf pH 6,0 und Untersuchen der verbleibenden Enzymaktivität in jedem Puffer bestimmt. Die Ergebnisse der thermischen und pH-Stabilitäten wurden in den Fig. 3 bzw. Fig. 4 gezeigt. Das Enzym war bis zu einer Temperatur von ungefähr 60°C und bei einem pH von ungefähr 4,5–10,5 stabil. Das Enzym war eine Amylase, welche keine Stärke hydrolysierende Aktivität aufweist, aber eine relativ hohe Abhängigkeit von Calciumionen in Substraten enthaltenden Lösungen aufweist. Die Enzymaktivität wurde in der Gegenwart von einem mM Kupferionen, Bleiionen, Zinkionen oder Quecksilberionen oder durch 10 mM EDTA inhibiert.

Versuch 4

Aktivität auf Stärke

**[0055]** Zu löslicher Stärke mit einer Endkonzentration von 2 Gew.-% in 20 mM Acetatpuffer (pH 5,5) enthaltend 5 mM Calciumchlorid wurden 50 Einheiten/g Stärke der in Versuch 2 erhaltenen, aufgereinigten AMYLASE zugefügt und die Mischungslösung wurde einer enzymatischen Reaktion bei 40°C unterworfen, gefolgt vom Sammeln der Reaktionslösung in einem vorgeschriebenen Zeitintervall und Erhitzen der Proben für 10 Minuten auf 100°C, um das verbleibende Enzym zu inaktivieren. Die resultierende Reaktionslösung wurde bezüglich deren Hydrolyserate, Blauwert und Saccharidzusammensetzung analysiert.

**[0056]** Die Hydrolyserate wurde durch Quantifizieren des gesamten Zuckergehaltes der Reaktionsmischung mit der Anthron-Schwefelsäure Reaktionsmethode, Quantifizieren des reduzierenden Zuckergehaltes der Reaktionsmischung in Form von Glucose mit dem Somogyi-Nelson-Verfahren und Errechnen des Verhältnisses des reduzierenden Zuckergehaltes gegen den Gesamtzuckergehalt bestimmt. Der Blauwert wurde durch Zufügen von 0,1 ml der Reaktionsmischung zu 15 ml an 0,05 N wässriger Schwefelsäurelösung, Vermischen der Resultierenden, Zufügen von 0,2 ml an 0,1 N Jodlösung zu der resultierenden Lösung, um Farbe zu entwickeln, Bestimmen der relativen Absorption bei 660 nm als Jod-Farben-Grad und Errechnen des Prozentsatzes an Jod-Farben-Grad jeder Reaktionslösung bei jeder Reaktionszeit zu dem anfänglichen Jod-Farben-Grad bei einer Reaktionszeit von 0 bestimmt.

**[0057]** Die Saccharidzusammensetzung wurde zuerst durch Entsalzen der Reaktionsmischung, dann Analysieren der entsalzten Lösung auf Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (nachfolgend als "HPLC" abgekürzt), bestimmt. Das in der Analyse eingesetzte System und die Bedingungen waren CCPD-System, ein von Tosoh Corporation, Tokio, Japan kommerziell vertriebenes Gerät zur HPLC, "MCI GEL CK04SS (10 mm ⌀ × 200 mm), eine von Mitsubishi Chemical Corporation, Tokio, Japan kommerziell vertriebene Säule zur Analyse, eine Flussrate von 0,2 ml/min für das Elutionsmittel sowie ein differentialer Refraktometer als ein Detektor. Die Ergebnisse wurden in den Tabellen 1 und 2 gezeigt.

Tabelle 1

| Reaktionszeit (min) | Hydrolyserate (%) | Jod-Farb-Grad (%) |
|---|---|---|
| 0 | 1,9 | 100 |
| 5 | 3,6 | 45 |
| 10 | 5,3 | 19 |
| 20 | 8,0 | 4,5 |
| 30 | 9,8 | 2,0 |
| 60 | 13,4 | 1,0 |
| 90 | 14,7 | 0,9 |
| 120 | 15,7 | 0,9 |

Tabelle 2

| Reaktionszeit (min) | Saccharidzusammensetzung (%) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | G1 | G2 | G3 | G4 | G5 | G6 | G7 | ≥G8 |
| 5 | 0,0 | 0,0 | 0,2 | 0,2 | 0,3 | 2,1 | 2,2 | 95,0 |
| 10 | 0,0 | 0,7 | 0,9 | 0,7 | 1,0 | 3,9 | 4,0 | 88,8 |
| 20 | 0,0 | 1,5 | 2,0 | 1,8 | 1,8 | 7,9 | 7,8 | 77,2 |
| 30 | 0,0 | 2,7 | 3,3 | 2,7 | 2,6 | 11,7 | 11,0 | 66,0 |
| 60 | 0,0 | 6,0 | 6,0 | 4,3 | 3,8 | 19,4 | 16,1 | 44,4 |
| 90 | 0,4 | 8,5 | 7,1 | 4,8 | 4,2 | 25,4 | 18,8 | 30,8 |
| 120 | 0,7 | 10,1 | 8,4 | 4,5 | 4,0 | 25,7 | 19,3 | 27,3 |

**[0058]** Wie aus den Ergebnissen in Tabelle 1 ersichtlich wurde gezeigt, dass die vorliegende AMYLASE eine Amylase vom endo-Typ ist, weil der Grad an Reduktionsrate größer war als der des Inkrements der Hydrolyserate von Stärke, und, weil Oligosaccharide mit geringerem Molekulargewicht, wie Maltose und Maltotriose, von Beginn der enzymatischen Reaktion an gefunden wurden, selbst wenn die Menge gering war. Insbesondere wurde basierend auf dem Ergebnis der Erkenntnis, dass der Anomerentyp des gebildeten Produktes die α-Form war, wenn bezüglich der optischen Rotation des anomeren Typs untersucht, gezeigt, dass die AMYLASE eine α-Amylase vom endo-Typ ist.

**[0059]** Wie aus den Ergebnissen in Tabelle 2 ersichtlich wurde gezeigt, dass das vorliegende Stärke hydrolysierende Enzym eine neue α-Amylase ist, ein Enzymtyp, welcher inherent Maltohexaose und Maltoheptaose bildet, wenn es auf Stärke einwirkt, aufgrund der Tatsache, dass es eine größere Menge an Maltohexaose und Maltoheptaose als andere Oligosaccharide von Beginn der enzymatischen Reaktion an unter Erhöhung des Bildungsspiegels mit Fortführung der enzymatischen Reaktion und Nicht-Abnahme des Bildungsspiegels, selbst wenn die enzymatische Reaktion verlängert wurde, bildete. Die Gesamtausbeute an Maltohexaose und Maltoheptaose aus Stärke betrug ungefähr 45%, d. s. b..

Versuch 5

Substrat-Spezifität

**[0060]** Fünfzig Einheiten/g Substrat, d. s. b., an durch das Verfahren in Versuch 2 erhaltener, aufgereinigter vorliegender AMYLASE wurden zu einem Substrat mit einer endgültigen Konzentration von 2 Gew.-% Amylo-

se, Amylopektin, Glykogen, α-Cyclodextrin, β-Cyclodextrin, γ-Cyclodextrin, Pullulan, Dextran, Glucose, Maltose, Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose, Maltohexaose oder Maltoheptaose zugegeben und der Mischung wurde erlaubt, bei 40°C und einem pH von 5,5 für 2 Stunden in der Gegenwart von 5 mM Calciumchlorid zu reagieren. Die Reaktionsmischungen vor und nach der enzymatischen Reaktion wurden einer Dünnschichtchromatographie (nachfolgend als "TLC" abgekürzt) unter Verwendung von "KIESEL GEL 60", einer Aluminiumplatte (20 × 20 cm), kommerziell vertrieben von E. Merck, Darmstadt, Deutschland, unterworfen, um zu untersuchen, ob das Enzym auf die Saccharide als ein Substrat einwirkte. Das TLC wurde einmal bei Umgebungstemperatur unter Verwendung eines Entwicklerlösungsmittels von 1-Butanol : Pyridin : Wasser = 6 : 4 : 1 pro Volumen entwickelt. Die Farbentwicklung wurde durch Besprühen der Platten mit einer Lösung von 20 vol.-%-iger Schwefelsäure in Methanol und Erhitzen der Platten für 10 Minuten auf 110°C bewirkt.

**[0061]** Als ein Ergebnis wurde gefunden, dass die vorliegende AMYLASE hauptsächlich Maltohexaose und Maltoheptaose bildete, wenn auf Amylose, Amylopektin und Glykogen als ein Substrat einwirkte gleichermaßen wie in löslicher Stärke, aber im Wesentlichen nicht auf Maltoheptaose einwirkte, selbst wenn es geringfügig Glucose und Maltohexaose als ein Hydrolysat bildete, und nicht auf α-Cyclodextrin, β-Cyclodextrin, γ-Cyclodextrin, Pullulan, Dextran, Glucose, Maltose, Maltotriose, Maltotetraose, Maltopentaose und Maltohexaose einwirkte.

Versuch 6

Akuter Toxizitätstest

**[0062]** Ein pulverförmiges Saccharidprodukt reich an Maltohexaose oder Maltoheptaose, welches durch das Verfahren in Beispiel A-7 erhalten wurde, und ein sirupartiges Produkt reich an Maltohexaitol oder Maltoheptaitol, welches durch das Verfahren in Beispiel A-8 erhalten wurde, wurden Mäusen für deren akuten Toxizitätstest oral appliziert. Als ein Ergebnis wurde gezeigt, dass diese Saccharide eine relativ geringe Toxizität aufwiesen und keine Maus starb, selbst wenn die höchstmögliche Dosis verabreicht wurde. Daher betrug der $LD_{50}$-Wert der Saccharide, obwohl nicht so akkurat, 50 g/kg oder höher.

**[0063]** Die folgenden Beispiele A stellen die Präparation der vorliegenden AMYLASE, Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose hergestellt unter Verwendung von AMYLASE und Präparationen von Saccharidzusammensetzungen enthaltend Maltohexaitol und/oder Maltoheptaitol dar. Beispiele B stellen Zusammensetzungen enthaltend eines oder mehrere dieser Saccharide dar.

Beispiel A-1

**[0064]** In Übereinstimmung mit dem Verfahren in Versuch 1 wurde eine Impfkultur von Alcaligenes latus D2271 (FERM BP-4578) in eine frische Präparation desselben wie in Versuch 1 eingesetzten Nährkulturmediums inokuliert und in einem Fermenter für 30 Stunden unter Bewegungs-Belüftungsbedingungen ausgenommen des Kultivierens des Mikroorganismus bei 30°C kultiviert. Die Aktivität der vorliegenden AMYLASE in dem resultierenden Überstand betrug 66 Einheiten/ml der Kultur. Die Kultur wurde mit einer MF-Membran filtriert und das Filtrat wurde mit einer UF-Membran konzentriert, um eine konzentrierte Enzymlösung enthaltend ungefähr 1.300 Einheiten/ml der vorliegenden AMYLASE in einer Ausbeute von ungefähr 82% gegenüber der Aktivität der anfänglichen Kultur zu erhalten.

Beispiel A-2

**[0065]** Fünf % einer Kartoffelstärke-Suspension (pH 5,5), d. s. b., wurde durch Erhitzen gelatinisiert, auf 70°C abgekühlt, mit Calciumchlorid vermischt, um 0,02% zu ergeben, mit 2 Einheiten/g Stärke der AMYLASE gemäß Beispiel A-1 vermischt, verflüssigt und für 20 Stunden verzuckert. Die resultierende Mischung wurde bei 120°C für 20 Minuten autoklaviert, um das verbliebene Enzym zu inaktivieren, abgekühlt, entfärbt und mit einer Aktivkohle filtriert, mit Ionenaustauscherharzen in H- und OH-Form entsalzt, aufgereinigt und zu einem 75%-igen Sirup in einer Ausbeute von ungefähr 95% zu dem Material, d. s. b., konzentriert.

**[0066]** Das Produkt enthielt 24,2% Maltohexaose und 17,7% Maltoheptaose, d. s. b., und hatte eine Süßkraft von ungefähr 15% von der von Sucrose. Das Produkt kann willkürlich in einer Vielzahl von Zusammensetzungen, wie bspw. Lebensmitteln, Getränken, Kosmetika, Pharmazeutika und geformten Produkten als ein geringes Süßmittel, formverleihendes Agens, viskositätskontrollierendes Agens, feuchtigkeitserhaltendes Agens, glanzverleihendes Agens, Klebstoff, aromaverleihendes Agens, kristallisationsvorbeugendes Agens und Klebrigkeit verhinderndes Agens für Süßigkeiten eingesetzt.

Beispiel A-3

**[0067]** Zehn % einer Kartoffelstärke-Suspension (pH 4,5), d. s. b, wurden durch Erhitzen gelatinisiert, auf 50°C abgekühlt, mit 1.000 Einheiten/g Stärke Isoamylase, kommerziell vertrieben von Nayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan, vermischt und für 20 Stunden enzymatisch reagiert. Die resultierende Mischung wurde auf pH 5,2 eingestellt, bei 120°C für 10 Minuten autoklaviert, auf 70°C abgekühlt, mit Calciumchlorid vermischt, um eine Konzentration von 0,02%, d. s. b., zu ergeben, mit 5 Einheiten/g Stärke, d. s. b., der vorliegenden, in Beispiel A-1 präparierten AMYLASE vermischt, verflüssigt und für 8 Stunden verzuckert. Die Reaktionslösung wurde für 20 Minuten bei 120°C autoklaviert, abgekühlt und gleichermaßen wie in Beispiel A-2 aufgereinigt und konzentriert, um ein sirupartiges Produkt mit einer Konzentration von 75% in einer Ausbeute von ungefähr 93% zu dem Material, einer Ausbeute von ungefähr 93% zu dem Material, d. s. b., zu erhalten. Die Saccharidzusammensetzung bestand aus 40,3% Oligosacchariden mit einem Grad an Glucosepolymerisation von 5 oder weniger, 27,3% Maltohexaose, 19,2% Maltoheptaose und 13,2%, d. s. b., Dextrin mit einem Glucosepolymerisationsgrad von 8 oder höher. Gleichermaßen wie das Produkt in Beispiel A-2 kann das Produkt willkürlich als Süßmittel mit einer relativ geringen Süßheit und relativ geringem Zuckergehalt in einer Vielzahl von Zusammensetzungen, wie bspw. Lebensmitteln, Getränken, Kosmetika, Pharmazeutika und geformten Produkten, eingesetzt werden.

Beispiel A-4

**[0068]** Dreiunddreißig % einer Maisstärke-Suspension, d. s. b., wurde mit Calciumcarbonat vermischt, um eine endgültige Konzentration von 0,1%, d. s. b., zu ergeben, und die resultierende Mischung wurde auf pH 6,0 eingestellt, mit 0,2 pro g Stärke, d. s. b., "TERMAMYL® 60 L", einer von Novo Industri A/S Kopenhagen, Dänemark kommerziell vertriebenen α-Amylase, vermischt und einer enzymatischen Reaktion bei 95°C für 15 Minuten unterworfen. Die Reaktionsmischung wurde für 30 Minuten bei 120°C autoklaviert, auf 50°C abgekühlt, mit 500 Einheiten/g Stärke Isoamylase, kommerziell vertrieben von Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., Okayama, Japan, und 1,8 Einheiten/g Stärke der vorliegenden, in Beispiel A-1 präparierten AMYLASE vermischt und für 40 Stunden einer enzymatischen Reaktion unterworfen. Die Reaktionsmischung wurde gleichermaßen wie in Beispiel A-2 erhitzt, abgekühlt, aufgereinigt, konzentriert und sprühgetrocknet, um eine pulverförmige Zusammensetzung enthaltend Maltohexaose und Maltoheptaose mit einem Feuchtigkeitsgehalt von weniger als 2% in einer Ausbeute von ungefähr 90%, d. s. b., zu erhalten.

**[0069]** Die Saccharidzusammensetzung bestand aus 38,8% Oligosacchariden mit einem Grad an Glucosepolymerisation von 5 oder weniger, 26,7% Maltohexaose, 15,7% Maltoheptaose und 18,8% Dextrin mit einem Grad an Glucosepolymerisation von 8 oder höher. Gleichermaßen wie das Produkt in Beispiel A-2 kann das Produkt willkürlich als Süßmittel mit einer relativ geringen Süßheit und relativ geringem Zuckergehalt in einer Vielzahl von Zusammensetzungen, wie bspw. Lebensmitteln, Getränken, Kosmetika, Pharmazeutika und geformten Produkten, eingesetzt werden.

Beispiel A-5

**[0070]** Eine durch das Verfahren in Beispiel A-3 erhaltene Saccharidzusammensetzung enthaltend Maltohexaose und Maltoheptaose wurde zur Fraktionierung durch Verwenden eines stark sauren Ionenaustauscherharzes säulenchromatographiert, um den Gehalt an Maltohexaose und Matoheptaose zu erhöhen. So wurde die Saccharidzusammensetzung zu einer 55 gew.-%-igen Lösung als ein Saccharidlösungsmaterial konzentriert. "DIAION SK 104 ($K^+$-Form, Polymerisationsgrad von 4%)", ein von Mitsubishi Chemical Corporation, Tokio, Japan kommerziell vertriebenes Harz, wurde in 4 umhüllte Säulen aus rostfreiem Stahl mit einem inneren Durchmesser von 5,4 cm gepackt und die Säulen wurden in Reihe kaskadiert, um eine Gesamtgelbetttiefe von 20 m zu ergeben. Die Säulen wurden erhitzt, um eine innere Säulentemperatur von 60°C zu ergeben, und diesen 7 Vol.-% der Saccharidlösung unter Beibehalten der Temperatur zugeführt, gefolgt vom Fraktionieren der Saccharidlösung durch Aufgeben auf die Säulen mit 60°C heißem Wasser bei einer Flussrate SV (Raumgeschwindigkeit) von 0,12 und Sammeln der Fraktionen enthaltend 35% oder mehr Maltohexaose oder 25% oder mehr Maltoheptaose. Die Fraktionen wurden vereinigt, aufgereinigt und gleichermaßen wie in Beispiel A-2 konzentriert, um eine sirupartige Saccharidzusammensetzung reich als Maltohexaose und Maltoheptaose in einer Ausbeute von ungefähr 50% zu dem Saccharidlösungsmaterial, d. s. b., zu ergeben. Das Produkt enthielt ungefähr 45% Maltohexaose und ungefähr 31% Maltoheptaose, d. s. b., und die Süßkraft betrug weniger als 10% von der von Sucrose. Gleichermaßen wie in Beispiel A-2 kann das Produkt willkürlich als ein Süßmittel mit einer geringen Süßheit und Zuckergehalt in einer Vielzahl von Zusammensetzungen, wie bspw. Lebensmitteln, Getränken, Kosmetika, Pharmazeutika und geformten Produkten eingesetzt werden.

Beispiel A-6

**[0071]** Eine durch das Verfahren in Beispiel A-5 erhaltene sirupartige Saccharidzusammensetzung reich an Maltohexaose und Maltoheptaose, wurde sprühgetrocknet, um eine pulverförmige Saccharidzusammensetzung mit einem Feuchtigkeitsgehalt von weniger als ungefähr 2% und reich an Maltohexaose und Maltoheptaose in einer Ausbeute von ungefähr 98% Sirup, d. s. b., zu erhalten. Gleichermaßen wie in Beispiel A-2 kann das Produkt willkürlich als ein Süßmittel mit einer geringen Süßheit und Zuckergehalt in einer Vielzahl von Zusammensetzungen, wie bspw. Lebensmitteln, Getränken, Kosmetika, Pharmazeutika und geformten Produkten, eingesetzt werden.

Beispiel A-7

**[0072]** Eine durch das Verfahren in Beispiel A-5 erhaltene Saccharidzusammensetzung reich an Maltohexaose und Maltoheptaose, wurde zu einer 50%-igen Lösung präpariert, welche als ein Saccharidlösungsmaterial eingesetzt wurde. "DIAION SK 104 ($K^+$-Form, Polymerisationsgrad von 4%)", ein stark saurer, von Mitsubishi Chemical Corporation, Tokio, Japan kommerziell vertriebener Kationenaustauscher wurde als ein Harz zur Fraktionierung eingesetzt, und gleichermaßen wie in Beispiel A-5 zu einer Säule gepackt. Die Säule wurde erhitzt, um eine innere Säulentemperatur von 60°C zu ergeben, und dieser 5 Vol.-% der Saccharidlösung unter Beibehaltung der Temperatur zugefügt und die Saccharidlösung wurde durch Aufgeben auf die Säule mit 60°C heißem Wasser, um Fraktionen enthaltend 80% oder mehr Maltohexaose und Fraktionen enthaltend 70% oder mehr Maltoheptaose, d. s. b., trennend zu sammeln, fraktioniert. Die Fraktionen wurden vereinigt, aufgereinigt, konzentriert und zu einer pulverförmigen Saccharidzusammensetzung reich an Maltohexaose und einer pulverförmigen Saccharidzusammensetzung reich an Maltoheptaose mit einem Feuchtigkeitsgehalt von weniger als ungefähr 2% in einer Ausbeute von ungefähr 30% bzw. ungefähr 20%, d. s. b., sprühgetrocknet.

**[0073]** Die Reinheiten der pulverförmigen Saccharidzusammensetzungen reich an Maltohexaose und der pulverförmigen Saccharidzusammensetzungen reich an Maltoheptaose betrugen ungefähr 89% und ungefähr 81%, d. s. b., und deren Süßkraft betrug weniger als 10% von der von Sucrose. Gleichermaßen wie in Beispiel A-2 können die Produkte willkürlich als Süßmittel mit geringer Süßheit und Zuckergehalt in einer Vielzahl von Zusammensetzungen, wie bspw. Lebensmitteln, Getränken, Kosmetika, Pharmazeutika und geformten Produkten, eingesetzt werden.

Beispiel A-8

**[0074]** Eine durch das Verfahren in Beispiel A-3 erhaltene sirupartige Saccharidzusammensetzung enthaltend Maltohexaose und Maltoheptaose wurde zu einer 50%-igen Lösung präpariert, welche dann in einen Autoklaven platziert wurde, mit 10% Raney-Nickel als einem Katalysator vermischt und auf eine Temperatur von 90–125°C unter Rühren erhitzt wurde, gefolgt vom Erhöhen des Wasserstoffdruckes auf 20–100 kg/cm$^2$, um die Hydrierung zu beenden. Daran anschließend wurde das Raney-Nickel aus der Reaktionsmischung entfernt und gleichermaßen wie in Beispiel A-2 wurde die Reaktionsmischung aufgereinigt und konzentriert, um eine Saccharidzusammensetzung enthaltend Maltohexaitol und Maltoheptaitol mit einem Feuchtigkeitsgehalt von 25% in einer Ausbeute von ungefähr 90% Sirup, d. s. b., zu erhalten.

**[0075]** Das Produkt enthält 27% Maltohexaitol, 19% Maltoheptaitol, d. s. b., und die Süßkraft betrug ungefähr 20% von der von Sucrose. Das Produkt kann willkürlich in einer Vielzahl von Lebensmittelprodukten als ein Süßmittel mit einer geringen Süßheit und Zuckergehalt, körperverleihendes Agens, viskositätskontrollierendes Agens, feuchtigkeitszurückhaltendes Agens, glanzverleihendes Agens, Klebstoff, aromaverleihendes Agens, kristallisationsverhinderndes Agens und klebrigkeitsverhinderndes Agens für Süßigkeiten eingesetzt werden.

Beispiel A-9

**[0076]** Eine durch das Verfahren in Beispiel A-5 erhaltene Saccharidzusammensetzung reich an Maltohexaose und Maltoheptaose wurde durch das Verfahren gemäß Beispiel A-8 hydriert und die Resultierende wurde aufgereinigt und zu einer 50%-igen Saccharidlösung reich an Maltohexaitol und Maltoheptaitol konzentriert. Eine so erhaltene Saccharidlösung wurde im Einklang mit dem Verfahren in Beispiel A-7 durch Verwenden eines stark sauren Kationenaustauscherharzes säulenchromatographiert, um getrennt Fraktionen enthaltend 80% oder mehr Maltohexaitol und Fraktionen enthaltend 70% oder mehr an Maltoheptaitol, welche dann vereinigt, aufgereinigt und zu einem Saccharidsirup reich an Maltohexaitol und einem Saccharidsirup reich an Maltoheptaitol, von denen jeder eine Konzentration von ungefähr 75% aufwies und in Ausbeuten von ungefähr 30% bzw. ungefähr 20%, d. s. b., erhalten wurde, konzentriert wurden. Die Reinheiten der so erhaltenen Sac-

charidsirupe betrug ungefähr 90% bzw. ungefähr 82%, d. s. b., und deren Süßkraft betrug weniger als 10% von der von Sucrose. Gleichermaßen wie in Beispiel A-2 kann das Produkt willkürlich als ein Süßmittel mit einer geringen Süßheit und Zuckergehalt in einer Vielzahl von Zusammensetzungen, wie Lebensmittelprodukten, Getränken, Kosmetika, Pharmazeutika und geformten Produkten, eingesetzt werden.

Beispiel B-1

Süßmittel

**[0077]** Ein Gewichtsteil einer sirupartigen Saccharidzusammensetzung enthaltend Maltohexaose und Maltoheptaose, erhalten durch das Verfahren in Beispiel A-2 wurde homogen mit 0,02 Gewichtsteilen "αG Sweet", α-Glucosylsteviosid, kommerziell erhältlich von Toyo Sugar Refining Co., Ltd., Tokio, Japan, vermischt, um ein sirupartiges Süßmittel zu erhalten. Das Produkt hatte eine zufriedenstellende Süßheit und eine zweifach höhere Süßkraft als Sucrose und der kalorische Wert war bis auf ungefähr 1/2 von der von Sucrose erniedrigt. Aufgrund dessen kann es zweckmäßigerweise als ein niedrigkalorisches Süßmittel für niedrigkalorische Lebensmittelprodukte für dicke Personen und Diabetiker, welche auf eine reduzierte Kalorienaufnahme beschränkt sind, eingesetzt werden. Das Produkt bildet kaum Säuren und unlösliche Glucane, wenn dentale Karies induzierende Mikroorganismen auf dieses einwirken, und dies erweist es als geeignet zum Süßen von Lebensmittelprodukten darauf gerichtet, Zahnkaries zu vermeiden.

Beispiel B-2

Puddingcreme

**[0078]** Fünfhundert Gewichtsteile Maisstärke, 400 Gewichtsteile einer pulverförmigen Saccharidzusammensetzung reich an Maltohexaose und Maltoheptaose, 500 Gewichtsteile Maltose und 5 Gewichtsteile Salz wurden bis zur Homogenität durch ein Sieb passiert. Die resultierende Mischung wurde mit 1.400 Gewichtsteilen Ei vermischt und graduell mit 5.000 Gewichtsteilen kochender Milch vermischt. Die so erhaltene Mischung wurde während dem Erhitzen weiter gerührt und das Erhitzen wurde gestoppt, als die Maisstärke in der Mischung vollständig gelatinisiert war, um die gesamten Inhalte halbdurchscheinend zu machen, gefolgt vom Abkühlen der Resultierenden und Zugabe einer ausreichenden Menge an Vanillearoma zu dieser. Das Produkt hatte eine glatte Oberfläche und Glanz sowie einen milden Geschmack und eine milde Süße.

Beispiel B-3

Süßer Reisgelee (Uiro)

**[0079]** Neunzig Gewichtsteile Reispulver, 20 Gewichtsteile Maisstärke, 20 Gewichtsteile Zucker, ein Gewichtsteil pulverförmiger grüner Tee, eine angemessene Menge Wasser und 90 Gewichtsteile einer durch das Verfahren in Beispiel A-8 erhaltenen sirupartigen Saccharidzusammensetzung enthaltend Maltohexaitol und Maltoheptaitol wurden bis zur Homogenität geknetet. Die resultierende Mischung wurde in ein Gefäß platziert und für 60 Minuten bedampft, um einen Reisgelee mit pulverförmigem grünem Tee zu erhalten. Das Produkt hatte einen zufriedenstellenden Glanz, Bisseigenschaften und Aroma. Die Retrogradation von Stärke in dem Produkt wird gut verhindert und die Lagerzeit ist zufriedenstellend.

Beispiel B-4

Harte Süßwaren

**[0080]** Siebenhundert Gewichtsteile einer durch das Verfahren in Beispiel A-3 erhaltenen sirupartigen Saccharidzusammensetzung enthaltend Maltohexaose und Maltoheptaose wurden mit 90 Gewichtsteilen Sucrose vermischt und die resultierende Mischung wurde durch Erhitzen im Vakuum konzentriert, bis der Feuchtigkeitsgehalt auf unter 2% absank. Die konzentrierte Lösung wurde mit 0,15 Gewichtsteilen Zitronensäure und ausreichenden Mengen an Zitronenaroma und einem Färbemittel vermischt und die resultierende Mischung wurde in gewöhnlicher Weise geformt, um das gewünschte Produkt zu erhalten. Das Produkt ist eine qualitativ hochwertige harte Süßware mit einem zufriedenstellenden Geschmack und Bisseigenschaften sowie mit einer relativ geringen Hygroskopizität und einer geringeren Klebrigkeit.

Beispiel B-5

Rettich eingelegt in Sake-Bodensatz ("bettara-zuke")

**[0081]** Dreißig kg Rettich wurden in gewöhnlicher Weise sukzessiv mit Salz, Saccharid und 4 kg einer gut vermischten Zusammensetzung bestehend aus einem Gewichtsteil einer durch das Verfahren in Beispiel A-2 erhaltenen sirupartigen Saccharidzusammensetzung enthaltend Maltohexaose und Maltoheptaose, 3 Gewichtsteilen Maltose, 0,05 Gewichtsteilen einer pulverförmigen Lakritze, 0,008 Gewichtsteilen Äpfelsäure, 0,07 Gewichtsteilen Natriumglutamat, 0,03 Gewichtsteilen Kaliumsorbat und 0,2 Gewichtsteilen Pullulan gepökelt. Das Produkt wies einen befriedigenden Glanz und Textur auf und hatte eine zufriedenstellende Süßheit und Bisseigenschaft.

Beispiel B-6

Intubationsnahrung

**[0082]** Eine Zusammensetzung wurde durch Vermischen von 20 Gewichtsteilen einer pulverförmigen, durch das Verfahren in Beispiel A-4 erhaltenen Saccharidzusammensetzung enthaltend Maltohexaose und Maltheptaose, 1,1 Gewichtsteilen Glycin, einem Gewichtsteil Natriumglutamat, 0,4 Gewichtsteilen Calciumlactat, 0,1 Gewichtsteilen Magnesiumcarbonat, 0,01 Gewichtsteilen Thiamin und 0,01 Gewichtsteilen Riboflavin hergestellt. Vierundzwanzig g/Teilmengen der Zusammensetzung wurden in Aluminium laminierte kleine Taschen verteilt, welche dann hitzeversiegelt wurden, um das genannte Produkt zu erhalten. Beim Gebrauch wird eine Tasche des Produktes in ungefähr 33–500 ml Wasser aufgelöst und der Nasenhöhle oder dem Magen durch Intubationszuführung als eine Intubationsnahrung verabreicht. Das Produkt kann nicht nur Menschen, sondern auch Vieh dargereicht werden.

Beispiel B-7

Intubationsnahrung

**[0083]** Eine Zusammensetzung wurde durch Vermischen von 80 Gewichtsteilen einer, durch das Verfahren in Beispiel A-6 erhaltenen pulverförmigen Saccharidzusammensetzung enthaltend Maltohexaose und Maltoheptaose, 190 Gewichtsteilen getrocknetem Eigelb, 209 Gewichtsteilen Magermilch, 4,4 Gewichtsteilen Natriumchlorid, 1,85 Gewichtsteilen Kaliumchlorid, 4 Gewichtsteilen Magnesiumsulfat, 0,01 Gewichtsteilen Thiamin, 0,1 Gewichtsteilen Natriumascorbat, 0,6 Gewichtsteilen Vitamin-E-Acetat und 0,04 Gewichtsteilen Nicotinamid präpariert. Fünfundzwanzig g/Teilmengen der Zusammensetzung wurden auf kleine Aluminium laminierte Taschen verteilt, welche dann hitzeversiegelt wurden, um das vorgenannte Produkt zu erhalten. Beim Gebrauch wird eine Tasche des Produktes in ungefähr 150–300 ml Wasser aufgelöst und der Nasalhöhle, der Speiseröhre und dem Magen durch Intubationszuführung als eine Intubationsnahrung verabreicht.

Beispiel B-8

Tablette

**[0084]** Vier Gewichtsteile einer, durch das Verfahren in Beispiel A-6 erhaltenen pulverförmigen Saccharidzusammensetzung enthaltend Maltohexaose und Maltoheptaose wurden bis zur Homogenität mit 50 Gewichtsteilen Aspirin, 10 Gewichtsteilen Maltose und 4 Gewichtsteilen Maisstärke vermischt und die resultierende Mischung wurde durch eine 20 R-Stanzmaschine mit einem Durchmesser von 12 mm tablettiert, um eine Tablette mit 680 mg Gewicht, 5,25 mm Dicke und 8 ± 1 kg Härte zu erhalten. Das Produkt ist eine leicht schluckbare Tablette mit einer ausreichenden Süßheit.

Beispiel B-9

Milchlotion

**[0085]** Ein halbes Gewichtsteil Polyoxyethylenbehenylether, ein Gewichtsteil Polyoxyethylensorbitoltetraoleat, ein Gewichtsteil öllösliches Glycerylmonostearat, 0,5 Gewichtsteile Behenylalkohol, ein Gewichtsteil Avocadoöl, 3,5 Gewichtsteile einer sirupartigen, durch das Verfahren in Beispiel A-9 erhaltenen Saccharidzusammensetzung reich an Maltohexaitol, ein Gewichtsteil α-Glycosylrutin und ausreichende Mengen an Vitamin E sowie Antiseptikum wurden durch Erhitzen in gewöhnlicher Weise vermischt und die Mischung wurde mit 5 Ge-

wichtsteilen an 1,3-Butylenglycol, 0,1 Gewichtsteilen Carboxyvinylpolymer und 85,3 Gewichtsteilen verfeinertem Wasser gemischt. Die so erhaltene Mischung wurde durch einen Homogenisierer emulgiert. Das Produkt ist eine feuchtigkeitszurückhaltende Milchlotion, welche vorteilhaft als eine Sonnencreme oder ein hautweißendes Agens einsetzbar ist.

Beispiel B-10

Hautcreme

**[0086]** Zwei Gewichtsteile Polyoxyethylenglykolmonostearat, 5 Gewichtsteile selbst-emulgierendes Glycerylmonostearat, 2 Gewichtsteile α-Glycosylrutin, ein Gewichtsteil flüssiges Paraffin, 10 Gewichtsteile Glyceryltrioctanat, 4 Gewichtsteile einer pulverförmigen Saccharidzusammensetzung enthaltend Maltohexaose und eine ausreichende Menge eines Antiseptikums wurden durch Erhitzen aufgelöst und die resultierende Lösung wurde mit 5 Gewichtsteilen 1,3-Butylenglycol und 66 Gewichtsteilen verfeinertem Wasser vermischt. Die resultierende Mischung wurde durch einen Homogenisierer emulgiert und mit einer ausreichenden Menge eines Aromas unter Rühren vermischt, um eine Hautcreme zu erhalten. Das Produkt ist eine Creme mit einer zufriedenstellenden Aufbringbarkeit und zweckmäßigerweise als eine Sonnencreme, ein hautverfeinerndes Agens oder ein hautweißendes Agens einsetzbar.

Beispiel B-11

Zahnpasta

**[0087]** Fünfundvierzig Gewichtsteile Calciumhydrogenphosphat, 1,5 Gewichtsteile Natriumlaurat, 25 Gewichtsteile Glycerin, 0,5 Gewichtsteile Polyoxyethylensorbitanlaurat, 15 Gewichtsteile einer durch das Verfahren in Beispiel A-5 erhaltenen sirupartigen Saccharidzusammensetzung reich an Maltohexaose und Maltoheptaose, 0,02 Gewichtsteile Saccharin und 0,05 Gewichtsteile eines Antiseptikums wurden mit 13 Gewichtsteilen Wasser vermischt. Das Produkt mit einem überlegenen Glanz und Detergentizität wird geeigneterweise als Zahnpasta eingesetzt.

Beispiel B-12

Düngemittel in Form eines Stäbchens

**[0088]** Siebzig Gewichtsteile eines Düngemittels enthaltend 14% N, 8% $P_2O_5$, 12% $K_2O$, 5 Gewichtsteile Pullulan, 5 Gewichtsteile einer durch das Verfahren in Beispiel A-3 erhaltenen Saccharidzusammensetzung enthaltend Maltohexaose und Maltoheptaose, 15 Gewichtsteile Calciumsulfat und 5 Gewichtsteile Wasser wurden bis zur Homogenität vermischt und die resultierende Mischung wurde durch einen Extruder unter den Bedingungen eines L/D-Verhältnisses von 20, einem Druckverhältnis von 1,8 und einem Düsendurchmesser von 30 mm auf 80°C erhitzt, um das genannte Produkt zu erhalten. Für die Verwendung des Produktes wird kein spezielles Trägergefäß benötigt und es ist leicht handhabbar und besitzt ausreichende Festigkeit für eine Anwendung in einer zusammenhängenden Schicht. Die Elutionsgeschwindigkeit der in dem Produkt enthaltenen Bestandteile ist durch Variieren der Zusammensetzung kontrollierbar. Falls erforderlich kann das Produkt leicht mit einem oder mehreren Pflanzenhormonen, landwirtschaftlichen Chemikalien und Bodenkonditionierern vermischt werden.

**[0089]** Wie oben beschrieben haben die vorliegenden Erfinder gefunden, dass die vorliegende AMYLASE eine relativ hohe optimale Temperatur und thermische Stabilität aufweist sowie einen relativ breiten Bereich von optimalem pH und stabilem pH. Ferner haben diese gefunden, dass die Ausbeute an der vorliegenden, durch Mikroorganismen hergestellten AMYLASE beträchtlich hoch ist und dies macht diese leicht in der Herstellung von Saccharidzusammensetzungen reich an Maltohexaose und/oder Maltoheptaose und solchen reich an Maltohexaitol und/oder Maltoheptaitol aus stärkehaltigen Verbindungen einsetzbar. Folglich hat die vorliegende Erfindung eine große Bedeutung in diesem Gebiet.

**[0090]** Des Weiteren können die Saccharidzusammensetzungen reich an Maltohexaose und/oder Maltoheptaose und deren hydrierte Produkte als ein Süßmittel mit geringerer Süßheit in einer Vielzahl von Zusammensetzungen eingesetzt werden, bspw. einem körperverleihendem Agens, viskositätskontrollierendem Agens, feuchtigkeitszurückbehaltendem Agens sowie glanzverleihendem Agens und ebenfalls als ein nahrungsergänzendes Agens in einer Vielzahl von Zusammensetzungen, wie bspw. Lebensmitteln, Getränken, Kosmetika, Pharmazeutika und geformten Produkten, eingesetzt werden.

**Patentansprüche**

1. Maltohexaose und Maltoheptaose bildende Amylase erhältlich aus einem Mikroorganismus der Gattung Alcaligenes, welche eine Aktivität zur Bildung einer Oligosaccharidzusammensetzung, von welcher die hauptsächlichen Bestandteile Maltohexaose und Maltoheptaose sind, aus Stärke aufweist, wobei die Amylase Maltohexaose, Maltoheptaose sowie ein Oligosaccharid mit einem geringeren Molekulargewicht als Maltohexaose im Wesentlichen nicht hydrolysiert.

2. Amylase nach Anspruch 1, welche die folgenden physikalisch-chemischen Eigenschaften aufweist:
(1) Wirkung
Wirkung auf Stärke unter Bildung einer Oligosaccharidzusammensetzung, von welcher die hauptsächlichen Bestandteile Maltohexaose und Maltoheptaose sind, welche aber Maltohexaose, Maltoheptaose und ein Oligosaccharid mit einem geringeren Molekulargewicht als Maltohexaose im Wesentlichen nicht hydrolysiert;
(2) Molekulargewicht
Ungefähr 43.000 ± 3.000 Daltons auf Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE);
(3) Isoelektrischer Punkt
Ungefähr 7,6 ± 0,5 bei Isoelektrophorese verwendend ein Ampholyt;
(4) Optimaler pH
Ungefähr 5,0 in der Gegenwart von Calciumionen;
(5) Optimale Temperatur
Ungefähr 70°C in der Gegenwart von Calciumionen;
(6) pH-Stabilität
Stabil bei einem pH von ungefähr 4,5–10,5 in der Gegenwart von Calciumionen;
(7) Thermische Stabilität
Stabil bis zu einer Temperatur von ungefähr 60°C in der Gegenwart von Calciumionen.

3. Verfahren zur Herstellung einer Amylase nach Anspruch 1, welches Kultivieren eines zur Bildung von Amylase fähigen Mikroorganismus in einem Nährkulturmedium sowie Gewinnung der gebildeten Amylase aus der Kultur umfasst.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei das Nährkulturmedium nicht mehr als 20 Gew.-% an Stärke d. s. b. enthält und die Kultur bei einer Temperatur von 10–40°C, einem pH von 5–8 und einer DO von 0,5–20 ppm für 10–100 Stunden bewirkt wird.

5. Mikroorganismus Alcaligenes latus D2271 (FERM BP-4578), welcher beim National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Sciences and Technologies, 1–3, Higashi, 1 chome, Tsukuba-shi, Ibarakiken 305, Japan hinterlegt wurde und zur Bildung von Amylase nach Anspruch 1 fähig ist.

6. Verfahren zur Bildung einer Saccharidzusammensetzung enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose, welches umfasst:
(a) Erlauben der Maltohexaose und Maltoheptaose bildenden Amylase nach Anspruch 1, zusammen mit oder ohne einem stärkeentzweigenden Enzym auf Stärke einzuwirken, um Maltohexaose und/oder Maltoheptaose zu bilden; und
(b) Sammeln der resultierenden Saccharidzusammensetzung enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der Schritt (a) des weiteren einen Schritt des Entfernens von begleitenden Sacchariden aus der aus Schritt (a) resultierenden Mischung umfasst.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei der Entfernungsschritt eine Säulenchromatographie unter Verwendung eines stark sauren Kationenaustauschers ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8, wobei der Schritt (a) bewirkt wird durch Erlauben der Amylase, auf eine Lösung enthaltend ungefähr 5–45 Gew.-% der Stärke in einer Menge von ungefähr 0,5–20 Einheiten/g Stärke, bezogen auf die trockene Feststoffbasis, bei einem pH von 3–8 und einer Temperatur von 40–90°C für 1–100 Stunden einzuwirken.

10. Verfahren zur Herstellung einer Saccharidzusammensetzung enthaltend Maltohexaitol und/oder Maltoheptaitol, welches umfasst
(a) Erlauben der Maltohexaose und Maltoheptaose bildenden Amylase nach Anspruch 1, zusammen mit oder

ohne einem stärkeentzweigenden Enzym auf Stärke einzuwirken, um Maltohexaose und/oder Maltoheptaose zu bilden;
(b) Hydrogenieren der resultierenden Saccharidzusammensetzung enthaltend Maltohexaose und/oder Maltoheptaose zu Maltohexaitol und/oder Maltoheptaitol; und
(c) Sammeln des resultierenden Maltohexaitols und/oder Maltoheptaitols.

11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei der Schritt (a) bewirkt wird durch Erlauben der Amylase, auf eine Lösung enthaltend ungefähr 5–45 Gew.-% der Stärke in einer Menge von ungefähr 0,5–20 Einheiten/g Stärke, bezogen auf die trockene Feststoffbasis, bei einem pH von 3–8 und einer Temperatur von 40–90°C für 1–100 Stunden einzuwirken.

12. Verfahren nach Anspruch 10 oder Anspruch 11, wobei der Schritt (b) bewirkt wird durch Zugabe einer Menge von ungefähr 8–10 Gew.-% an Raney-Nickel zu der aus Schritt (a) resultierenden Lösung und Erhitzen der resultierenden Mischung auf 90–140°C sowie bei einem Wasserstoffdruck von 20–150 kg/cm$^2$.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, wobei der Schritt (b) des weiteren einen Schritt des Entfernens von begleitenden Sacchariden aus der resultierenden Mischung in Schritt (b) umfasst.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei der Entfernungsschritt eine Säulenchromatographie verwendend einen stark sauren Kationenaustauscher ist.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

**Anhängende Zeichnungen**

FIG.1

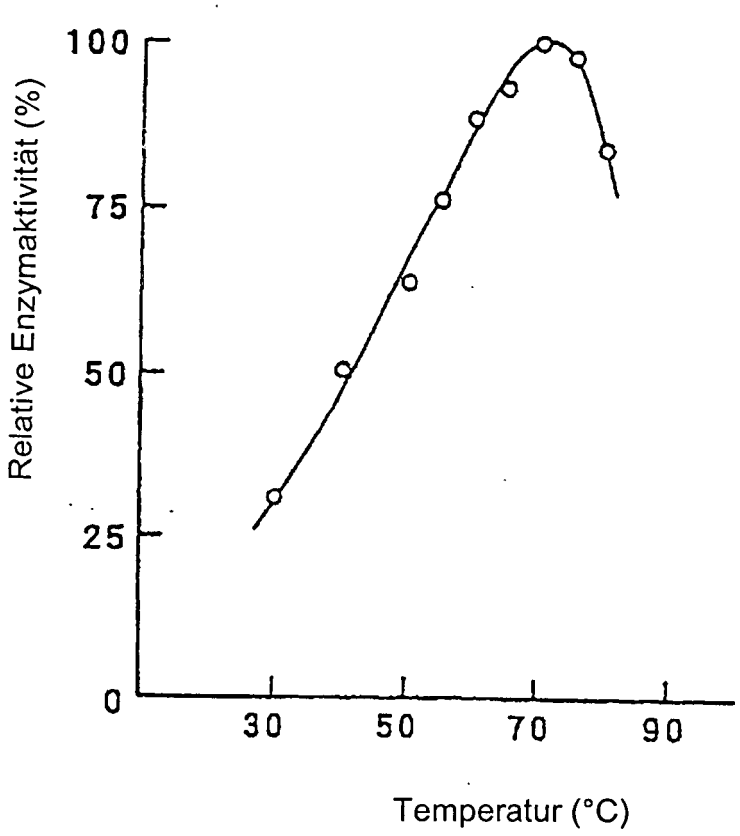


FIG.2

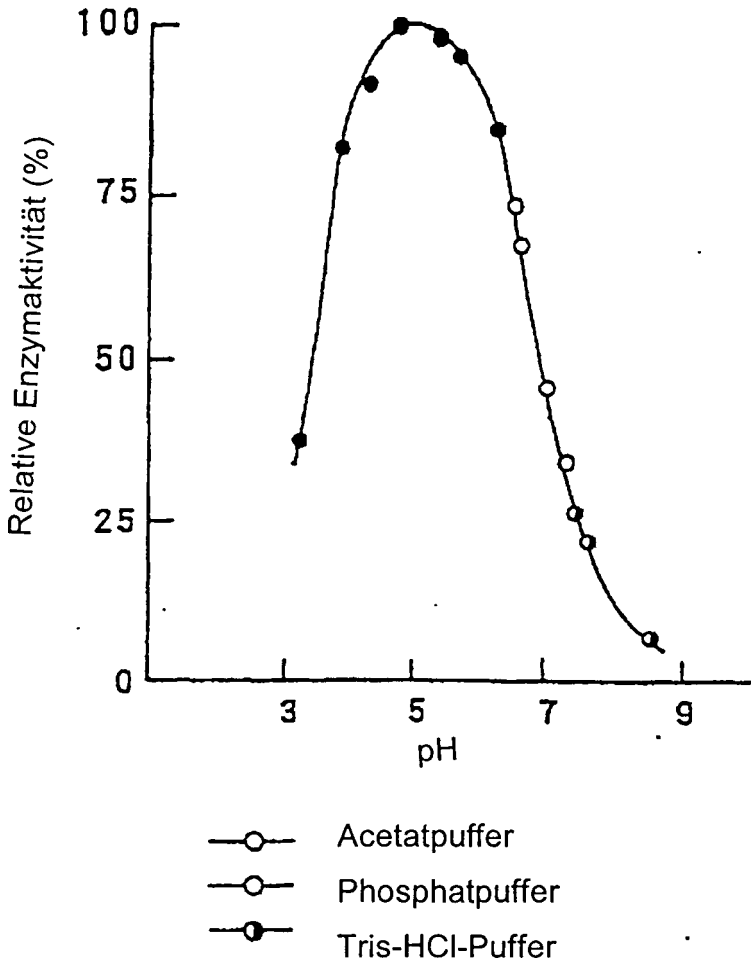

100
75
50
25
0
Relative Enzymaktivität (%)
3
5
7
9
pH
Acetatpuffer
Phosphatpuffer
Tris-HCl-Puffer

FIG.3

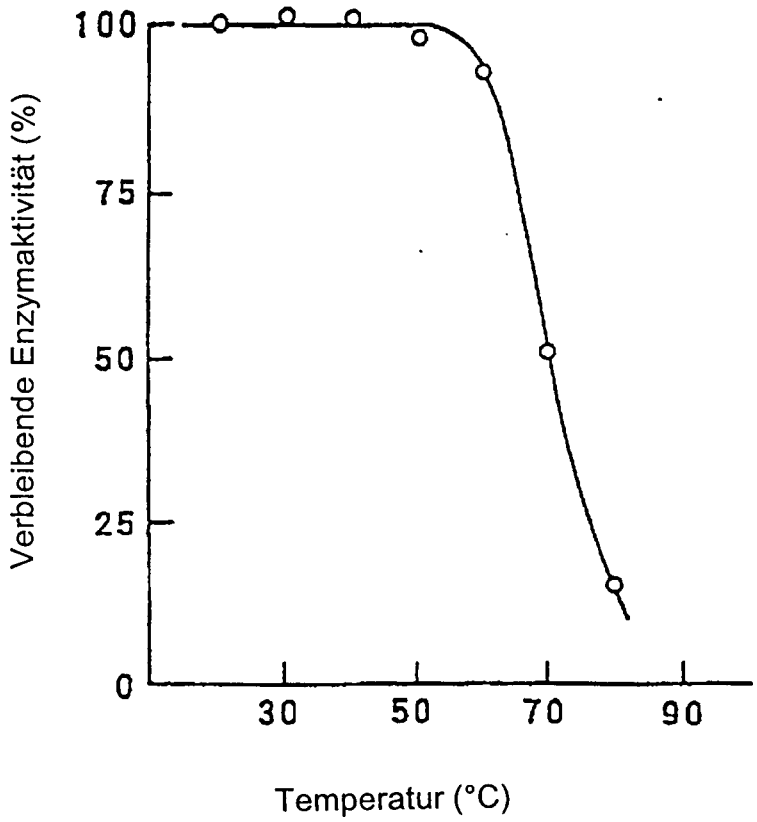
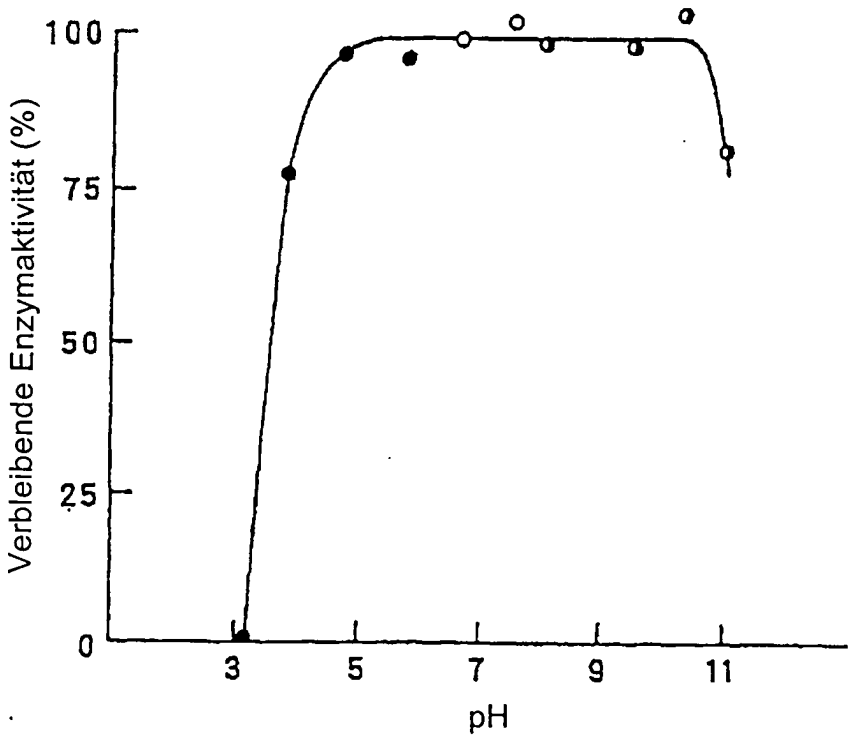

100
75
50
25
0
30
50
70
90
Verbleibende Enzymaktivität (%)
Temperatur (°C)

FIG.4


100
75
50
25
0
Verbleibende Enzymaktivität (%)
3
5
7
9
11
pH
Acetatpuffer
Phosphatpuffer
Natriumcarbonat-Natriumhydrogencarbonat-Puffer