



PATENTDIREKTORATET  
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3368/87

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> C 12 N 9/28  
C 12 N 15/56

(22) Indleveringsdag: 30 jun 1987

(41) Alm. tilgængelig: 31 dec 1987

(44) Fremlagt: 22 apr 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 30 jun 1986 DK 3111/86

(71) Ansøger: \*Novo Industri A/S; Novo Alle; 2880 Bagsværd, DK

(72) Opfinder: Martin \*Schuelein; DK, Børge Krag \*Diderichsen; DK, Helle \*Outtrup; DK, Barrie Edmund \*Norman; DK

(74) Fuldmægtig: -

(54) **Kimære alfa-amylaser og fremgangsmåde til fremstilling deraf**

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

3368-87

3368-87

Hidtil ukendte hybride  $\alpha$ -amylaser med formlen

Q-R-L

hvor Q er en N-terminal polypeptidrest med fra 55 til 60 aminosyrerester, som for mindst 75 procents vedkommende er homologe med de 55 N-terminale aminosyrerester i Bacillus amyloliquefaciens  $\alpha$ -amylase som beskrevet i Takkinen et al., J.Biol.Chem. 258 (1983) 1007 - 1013, R er en polypeptidrest med den almene formel

Pro-Tyr-Asp-Leu-Tyr-Asp-Leu-Gly-Glu-Phe-X<sub>8</sub>-Gln-Lys-

Gly-Thr-Val-Arg-Thr-Lys-Tyr-Gly-Thr-Lys-X<sub>9</sub>-Glu-Leu-

Gln-X<sub>10</sub>-Ala-Ile-Lys

hvor X<sub>8</sub> er His eller Gln, X<sub>9</sub> er Gly eller Ser og X<sub>10</sub> er Ser eller Asp, og L er en C-terminal polypeptid på fra 390 til 400 aminosyrerester, som for mindst 75 procents vedkommende er homologe med de 395 C-terminale aminosyrerester i Bacillus licheniformis 584 (ATCC 27811)  $\alpha$ -amylase.

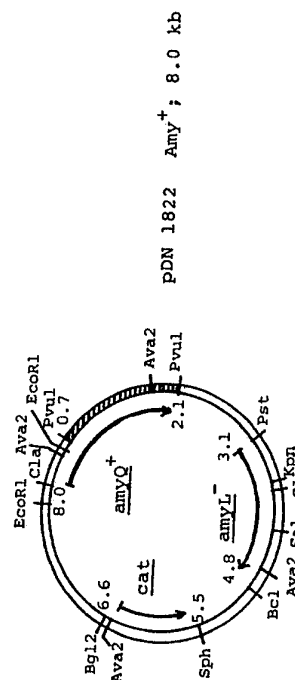


Fig. 2

Denne opfindelse angår stivelseshydrolyseenzymmer. Mere specifikt angår den foreliggende opfindelse kimære  $\alpha$ -amylaser og en fremgangsmåde til fremstilling af sådanne kimære  $\alpha$ -amylaser.

5 Den generelle enzymatiske proces, der almindeligvis anvendes af producenter af høj-DX-sirupper ud fra stivelse, hvor udtrykket DX betyder vægtprocent dextrose (D-glucose) beregnet på grundlag af tørstofindholdet (DS) i siruppen, er en to-trinsproces: forflydigelse og forsukring. Det første  
10 trin forflydigelse indebærer hydrolyse af stivelse til en blanding af oligosaccharider, de såkaldte maltodextriner. Denne proces katalyseres af  $\alpha$ -amylaser ved en temperatur på mindst 75°C, fortrinsvis ved ca. 90°C, eller ved en lyn-kogningsproces, hvor stivelsesopslemningen opvarmes i adskillige  
15 minutter til 105 - 110°C, sædvanligvis med en enkelt dosis  $\alpha$ -amylase og derpå holdes på ca. 90°C i mindst en time.

Til brug i forflydningsprocessen er forskellige mikrobielle, især bakterielle  $\alpha$ -amylaser kommercielt tilgængelige, f.eks. BAN<sup>TM</sup> (fra Bacillus amyloliquefaciens) og  
20 TERMAMYL® (fra Bacillus licheniformis), begge kan fås hos NOVO Industri A/S, Danmark, og THERMOLASE<sup>TM</sup> (fra Bacillus stearothermophilus), som fås fra Enzyme Development Corporation, N.Y., U.S.A.

Medens BAN  $\alpha$ -amylase kun er stabil op til ca. 85°C  
25 og derfor næppe egnet til lynkogningsprocessen, er både TERMAMYL® og THERMOLASE<sup>TM</sup> enzymer godt tilpassede til denne næsten globalt foretrukne fremgangsmåde til stivelsesforflydning, da de er varmestabile.

Forsukringstrinnet, hvor maltodextrinerne omdannes  
30 til dextrose, katalyseres oftest med et glucoamylaseenzym. Kommercielle glucoamylasepræparater, oftest hidrørende fra Aspergillus- eller Rhizopusarter, kan fås hos forskellige producenter, f.eks. som AMG<sup>TM</sup> 200L, et produkt stammende fra Aspergillus niger og fremstillet af NOVO Industri A/S,  
35 Danmark.

Med henblik på yderligere at øge dextroseudbyttet fra 30 - 40 vægtprocent DS maltodextrinopløsninger er det blevet almindeligt at udføre forsukringsprocessen med glucoamylase sammen med et afgreningsenzym for at lette hydrolysen af forgrenede oligosaccharider hidrørende fra amylopektindelen i stivelse. Et sådant afgreningsenzym med maksimumaktivitet indenfor de samme pH- og temperaturområder som glucoamylase er beskrevet i europæisk patentansøgning nr. 82302001.1 (publikation nr. 0063909). Afgreningsenzymet forhandles af NOVO Industri A/S, Danmark, enten i ren tilstand eller som en blanding med passende tilsætning af glucoamylase under navnene henholdsvis PROMOZYME og DEXTROZYME.

Uheldigvis indebærer den ellers gunstige kombination af B. licheniformis  $\alpha$ -amylase til forflydning og glucoamylase-PROMOZYME til forsukring i omdannelsen af stivelse til høj-DX-sirupper en ulempe. Man har iagttaget, at tilstedeværelsen af  $\alpha$ -amylaserestaktivitet fra forflydningstrinnet har en negativ effekt på den maksimalt opnåelige DX ved forsukring med glucoamylase-PROMOZYME. Problemet er størst for den termostabile B. licheniformis  $\alpha$ -amylases vedkommende, som stadig er aktiv under de til forsukring foretrukne betingelser (pH og temperatur på henholdsvis ca. 4,6 og 60°C). Man har fundet en løsning, som består i inaktivering af  $\alpha$ -amylasen inden forsukringen ved forsuring af den forflydige stivelse til pH under 4,5, medens der opretholdes en temperatur på mindst 90°C. Efter inaktivering af  $\alpha$ -amylasen indstilles temperaturen og pH på forsukringsbetingelser, hvilket betyder, at pH-værdien skal hæves til ca. 4,5. Denne yderligere pH-indstilling forøger uundgåeligt siruppens saltindhold, og dermed udgifterne i forbindelse med afsaltning af slutproduktet.

Formålet med den foreliggende opfindelse er at afhjælpe de tidligere nævnte ulemper, som stadig knytter sig til anvendelsen af B. licheniformis  $\alpha$ -amylase under omdannelsen af stivelse til en høj-DX-sirup. Dette og andre formål,

som vil blive omtalt i det følgende, opnås ved at udføre forflydningsprocessen med en hidtil ukendt type kimær  $\alpha$ -amylase.

De kimære  $\alpha$ -amylaseenzymer ifølge opfindelsen er 5 ejendommelige ved, at de kan fremstilles ved dyrkning af en værtsorganisme, der er transformeret med et i værtsorganismen funktionsdygtigt plasmid omfattende et hybrid  $\alpha$ -amylasegen kodende for fra 55 til 85 N-terminale aminosyrerester i *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase og fra 426 til 395 C-10 terminale aminosyrerester i *Bacillus licheniformis* 584(ATCC 27811)

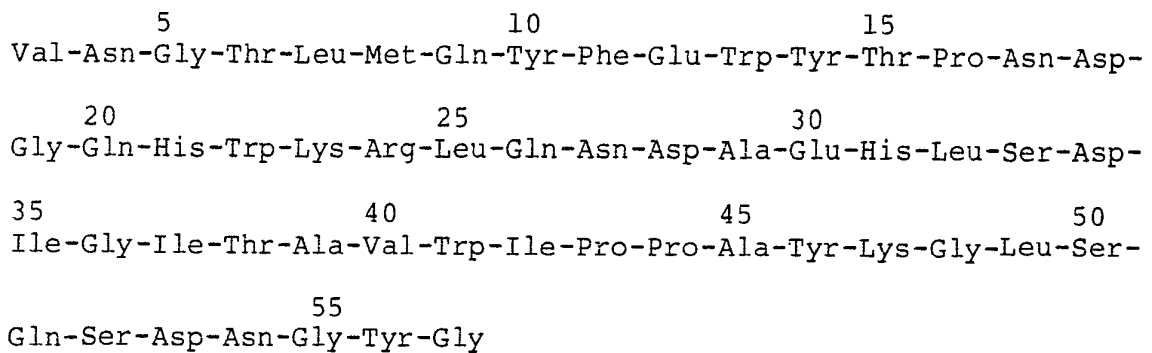
$\alpha$ -amylase, og at den har den almene formel II:



15

hvor Q' er de 55 N-terminale aminosyrerester i *B. amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase med den almene formel Ib

20



(Ib)

30

L' er de 395 C-terminale aminosyrerester i *B. licheniformis* 584 (ATCC 27811)  $\alpha$ -amylase med den almene formel Ic

90 95 100  
Ser-Leu-His-Ser-Arg-Asp-Ile-Asn-Val-Tyr-Gly-Asp-Val-  
105 110 115  
Val-Ile-Asn-His-Lys-Gly-Gly-Ala-Asp-Ala-Thr-Glu-Asp-Val-Thr-  
5 120 125 130  
Ala-Val-Glu-Val-Asp-Pro-Ala-Asp-Arg-Asn-Arg-Val-Ile-Ser-Gly-  
1 135 140 145  
Glu-His-Arg-Ile-Lys-Ala-Trp-Thr-His-Phe-His-Phe-Pro-Gly-Arg-  
150 155 160  
10 Gly-Ser-Thr-Tyr-Ser-Asp-Phe-Lys-Trp-His-Trp-Tyr-His-Phe-Asp-  
165 170 175  
Gly-Thr-Asp-Trp-Asp-Glu-Ser-Arg-Lys-Leu-Asn-Arg-Ile-Tyr-Lys-  
180 185 190  
Phe-Gln-Gly-Lys-Ala-Trp-Asp-Trp-Glu-Val-Ser-Asn-Glu-Asn-Gly-  
15 195 200 205  
Asn-Tyr-Asp-Tyr-Leu-Met-Tyr-Ala-Asp-Ile-Asp-Tyr-Asp-His-Pro-  
210 215 220  
Asp-Val-Ala-Ala-Glu-Ile-Lys-Arg-Trp-Gly-Thr-Trp-Tyr-Ala-Asn-  
225 230 235  
20 Glu-Leu-Gln-Leu-Asp-Gly-Phe-Arg-Leu-Asp-Ala-Val-Lys-His-Ile-  
240 245 250  
Lys-Phe-Ser-Phe-Leu-Arg-Asp-Trp-Val-Asn-His-Val-Arg-Glu-Lys-  
255 260 265  
Thr-Gly-Lys-Glu-Met-Phe-Thr-Val-Ala-Glu-Tyr-Trp-Gln-Asn-Asp-  
25 270 275 280  
Leu-Gly-Ala-Leu-Glu-Asn-Tyr-Leu-Asn-Lys-Thr-Asn-Phe-Asn-His-  
285 290 295  
Ser-Val-Phe-Asp-Val-Pro-Leu-His-Tyr-Gln-Phe-His-Ala-Ala-Ser-  
300 305 319  
30 Thr-Gln-Gly-Gly-Gly-Tyr-Asp-Met-Arg-Lys-Leu-Leu-Asn-Ser-Thr-  
315 320 325  
Val-Val-Ser-Lys-His-Pro-Leu-Lys-Ala-Val-Thr-Phe-Val-Asp-Asn-  
330 335 340  
His-Asp-Thr-Gln-Pro-Gly-Gln-Ser-Leu-Glu-Ser-Thr-Val-Gln-Thr-  
35 345 350 355  
Trp-Phe-Lys-Pro-Leu-Ala-Tyr-Ala-Phe-Ile-Leu-Thr-Arg-Glu-Ser-  
360 365 370

Gly-Tyr-Pro-Gln-Val-Phe-Tyr-Gly-Asp-Met-Tyr-Gly-Thr-Lys-Gly-  
 375 380 385  
 Asp-Ser-Gln-Arg-Glu-Ile-Pro-Ala-Leu-Lys-His-Lys-Ile-Glu-Pro-  
 390 395 400  
 5 Ile-Leu-Lys-Ala-Arg-Lys-Gln-Tyr-Ala-Tyr-Gly-Ala-Gln-His-Asp-  
 405 410 415  
 Tyr-Phe-Asp-His-His-Asp-Ile-Val-Gly-Trp-Thr-Arg-Glu-Gly-Asp-  
 420 425 430  
 Ser-Ser-Val-Ala-Asn-Ser-Gly-Leu-Ala-Ala-Leu-Ile-Thr-Asp-Gly-  
 10 435 440 445  
 Pro-Gly-Gly-Ala-Lys-Arg-Met-Tyr-Val-Gly-Arg-Gln-Asn-Ala-Gly-  
 450 455 460  
 Glu-Thr-Trp-His-Asp-Ile-Thr-Gly-Asn-Arg-Ser-Glu-Pro-Val-Val-  
 465 470 475  
 15 Ile-Asn-Ser-Glu-Gly-Trp-Gly-Glu-Phe-His-Val-Asn-Gly-Gly-Ser-  
 480 483  
 Val-Ser-Ile-Tyr-Val-Gln-Arg (1c)

20 og R er en polypeptidrest med den almene formel (Ia)

58 60 70  
 Pro-Tyr-Asp-Leu-Tyr-Asp-Leu-Gly-Glu-Phe-X<sub>8</sub>-Gln-Lys-  
 80  
 25 Gly-Thr-Val-Arg-Thr-Lys-Tyr-Gly-Thr-Lys-X<sub>9</sub>-Glu-Leu-  
 88  
 Gln-X<sub>10</sub>-Ala-Ile-Gly (Ia)

hvor X<sub>8</sub> er His eller Gln, X<sub>9</sub> er Gly eller Ser, X<sub>10</sub> er Ser  
 30 eller Asp.

Kort sagt tilvejebringer den foreliggende opfindelse hidtil ukendte  $\alpha$ -amylaser med den almene formel I

Q-R-L

(I)

hvor Q er en N-terminal polypeptidrest med den ovennævnte  
formel Ib svarende til de N-terminale aminosyrerester i  
5 Bacillus amyloliquefaciens  $\alpha$ -amylasen (Takkinen et al., 1983,  
J.Biol.Chem. 258:1007-1013); R er en polypeptidrest med den  
ovennævnte formel Ia, og L er en C-terminal polypeptidrest  
med den ovennævnte formel Ic svarende til de C-terminale  
aminosyrerester i Bacillus licheniformis 584 (ATCC 27811)  $\alpha$ -  
10 amylase (Stephens et al., 1984, J.Bacteriol., 158:369-372).

På grund af relevansen af Takkinen et al., supra og  
Stephens et al., supra ved definitionen af aminosyresekven-  
serne af de af B. amyloliquefaciens og B. licheniformis  
producerede  $\alpha$ -amylaser, hvoraf dele af sekvenserne er inde-  
15 holdt i de kimære amylaser ifølge opfindelsen skal der her  
henvises til disse i deres helhed.

Aminosyresekvenserne i de kimære enzymer beskrevet  
og vist ovenfor kan modificeres ved substituering, deletion  
eller tilsætning af aminosyrerester inden for sekvensen, der  
20 giver en tavs ændring i molekylet, således at produktet bibe-  
holder sin aktivitet. Sådanne aminosyresubstitutioner kan  
foretages på basis af lighed i polaritet, ladning, opløselig-  
hed, hydrophobicitet, hydrophili og/eller den amphipatiske  
natur hos de involverede rester. For eksempel omfatter sure  
25 aminosyrerester (negativt ladet ved pH 6,0) aspartansyre og  
glutaminsyre, basiske aminosyrer (positivt ladet ved pH 6,0)  
lysin og arginin; aminosyrer med uladete polære hovedgrupper  
eller ikke-polære hovedgrupper med samme hydrophile egenska-  
ber omfatter følgende: leucin, isoleucin, valin, glycin,  
30 alanin, asparagin, glutamin, serin, threonin, phenylalanin,  
tyrosin.

Opfindelsen angår endvidere en fremgangsmåde til  
fremstilling af den hidtil ukendte kimære  $\alpha$ -amylase ifølge  
krav 1.



ved forsukring med glucoamylase-PROMOZYME, medens den stadig bibeholder den udmærkede thermostabilitet, som er karakteristisk for *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylase.

De følgende udtryk har i denne beskrivelse den  
5 nedenfor angivne betydning:

DS = tørstof

DX = vægtprocent dextrose (D-glucose).

10 Opfindelsen forklares nærmere i det følgende under henvisning til tegningerne, hvor

fig. 1 viser gel-permeationskromatogrammer af  $\alpha$ -amylaser fra *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* og en kimær  $\alpha$ -amylase ifølge opfindelsen,

15 fig. 2 viser restriktionskortet over plasmid pDN1822,

fig. 3 viser restriktionskortet over plasmid pDN1850, og

20 pDN1864. fig. 4 viser restriktionskortet over plasmid

Som tidligere angivet angår opfindelsen kimære  $\alpha$ -amylaser med den almene formel II



25 hvor Q', R og L' defineres som beskrevet ovenfor. Foretrukne formler er beskrevet i de følgende afsnit.

En foretrukken kimær  $\alpha$ -amylase med den almene formel II er en sådan, hvor aminosyreresterne  $X_8$ ,  $X_9$  og  $X_{10}$  i  
30 R er henholdsvis Gln, Ser og Asp.

I yderligere en foretrukket kimær  $\alpha$ -amylase med den almene formel II er aminosyreresterne  $X_8$ ,  $X_9$  og  $X_{10}$  i R henholdsvis His, Gly og Ser.

Yderligere foretrukne kimære  $\alpha$ -amylaser ifølge  
35 opfindelsen er sådanne, hvor værtsorganismen er *B. subtilis*. Især sådanne hvor plasmidet er et af plasmiderne pDN1851, pDN1858, pDN1859, pDN1860, pDN1861, pDN1862 eller pDN1864.

Amylaserne ifølge opfindelsen er kimære enzymer og kan fremstilles på forskellige måder som beskrevet i det følgende.

Naturligt forekommende enzymer kan modificeres 5 genetisk ved tilfældig eller målrettet mutagenese, eller en del af et enzym kan erstattes med en del af et andet, så der fremkommer et kimært enzym. Denne udskiftning kan komme i stand enten ved konventionel in vitro gensplejsningsteknikker eller ved in vivo rekombination eller ved kombinationer af 10 begge teknikker. Ved anvendelse af konventionel in vitro gensplejsningsteknik kan en ønsket portion af den  $\alpha$ -amylase genkodende sekvens fjernes ved at der bruges passende steds-specifikke restriktionsenzymer; den fjernede del af kodnings-sekvensen kan derpå erstattes ved indsættelse af en ønsket 15 del af en anden  $\alpha$ -amylasekodende sekvens, således at der fremstilles en kimær nucleotidsekvens, der koder for en ny  $\alpha$ -amylase.

In vivo rekombinationsteknikkerne afhænger af, at forskellige DNA-segmenter med yderst homologe områder (DNA- 20 sekvensidentitet) kan rekombinere, d.v.s. spalte og udveksle DNA, og etablere nye bindinger i de homologe områder. Derfor vil rekombination af homologe sekvenser in vivo, når kodningssekvenserne for to forskellige men homologe amylase- enzymer anvendes til at transformere en værtscelle, resultere 25 i produktionen af kimære gensekvenser. Translation af disse kodningssekvenser i værtscellen vil resultere i produktion af et kimært amylasegenprodukt.

$\alpha$ -amylasegenerne fra *Bacillus licheniformis* (i det følgende benævnt amyL) og fra *Bacillus amyloliquefaciens* (i 30 det følgende benævnt amyQ) er homologe for ca. 70 procents vedkommende på DNA niveau og egnede til hybriddannelse ved in vivo gensplejsning.

I en anden udførelsesform kan det kimære enzym syntetiseres ved allerede kendte standardkemiske metoder (se 35 f.eks. Hunkapiller et al., 1984, Nature 310: 105-111). Derfor

kan peptider med de ovenfor beskrevne aminosyresekvenser syntetiseres helt eller delvis og forenes til dannelsen af de kimære enzymer ifølge opfindelsen.

Som tidligere nævnt har restaktiviteten fra anvendelsen af den termostabile  $\alpha$ -amylase fra *B. licheniformis* på forflydningstrinnet en negativ effekt på det maksimalt opnåelige D-glucoseudbytte på forsukringstrinnet ved anvendelse af *A. niger* glucoamylase og *B. acidopullulyticus* pullulanase.

Årsagen til denne negative effekt er ikke fuldt ud kendt, men man antager, at *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylase udvikler "græsedextriner", som er dårlige substrater for *B. acidopullulyticus* pullulanase, ved at hydrolysere 1,4- $\alpha$ -glucoside bindinger tæt på grenpunkterne i amylopektin. Disse græsedextriner, som indeholder for få glucoseenheder i en eller flere af sidekæderne vil være mindre følsomme overfor angreb af *B. acidopullulyticus* pullulanase.

I fig. 1 er angivet virkningsmønstrene for *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylase, *B. amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase og den kimære QL1864  $\alpha$ -amylase på amylopektin ved hjælp af gelpermeationskromatogrammer af amylopektinnedbrydninger efter 48 timer.

Af figuren ses det, at virkningsmønstret for *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylase på amylopektin er forskelligt fra *B. amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylases virkningsmønster. *B. licheniformis* enzymet producerer hovedsageligt DP<sub>6</sub>, DP<sub>5</sub> og DP<sub>3</sub> initialt. Ved forlænget hydrolyse hydrolyseres DP<sub>6</sub> fraktionen yderligere, og de vigtigste komponenter er DP<sub>5</sub>, DP<sub>3</sub> og DP<sub>2</sub> med DP<sub>5</sub> som langt den vigtigste. Når *B. amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase anvendes er hovedbestanddelen DP<sub>6</sub>.

Virkningsmønstret for de kimære  $\alpha$ -amylaser ifølge opfindelsen eksemplificeret ved QL1864  $\alpha$ -amylasen på amylopektin er tydeligt forskellig fra begge de naturligt forekommende  $\alpha$ -amylaser idet der hovedsageligt produceres DP<sub>2</sub>, DP<sub>3</sub> og DP<sub>5</sub> i omtrent lige stor mængde. Som det vises i det følgende, har dette ændrede virkningsmønster overraskende

medført, at *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylasens negative effekt på D-glucoseudbyttet er fjernet, medens termostabiliteten er bibeholdt.

Som følge heraf konkluderedes, at de kimære  $\alpha$ -amylaser ifølge opfindelsen kan anvendes særdeles effektivt til forflydigelse af stivelse.

#### Eksempel 1

##### 10 Fremstilling af hybrid QL1864

Ved konventionel teknik blev amyL og amyQ fra de samme mikroorganismer som anvendt af Stephens et al. og Takkinen et al. klonet i *B. subtilis*. Restriktionsenzymkortet for de to gener var i overensstemmelse med offentliggjorte DNA sekvenser for generne for *B. licheniformis* amylase (amyL) (Stephens et al., J.Bacteriol. 158: 369 (1984) og *B. amylo-liquefaciens* amylase (amyQ) (Takkinen et al., J.Biol.Chem. 258: 1007, 1983).

amyQ (amyQ<sup>+</sup>) og en C-terminal del af amyL (amyL<sup>-</sup>) blev anbragt parallelt på plasmid pDN1822. Dette er et *B. subtilis* plasmid baseret på kloningsvektor pUB110 (Jalanko et al., Gene 14:325-328(1981)) og indeholdende kloramphenicol-resistensgenet (Cam<sup>R</sup>) (cat gen) fra kloningsvektor pC194 (Horinouchi og Weisblum, J. Bacteriol. 150:815-825(1982)). Restriktionskortet over pDN1822 er vist i fig. 2, hvor generne er angivet med pile. Den C-terminale del af amyQ på pDN1822 blev derpå deleteret ved fraskæring af et PvuI-PvuI-fragment, som vist ved skravering på fig. 2, til opnåelse af plasmid pDN1850 (fig. 3). pDN1850 er amylasenegativ (Amy<sup>-</sup>), men indeholder en N-terminal del af amyQ og en C-terminal del af amyL. Imidlertid forekommer rekombination mellem amyQ og amyL med en hyppighed på ca.  $10^{-4}$ , hvilket resulterer i plasmider indeholdende et hybrid QL amylasegen (amyQL<sup>+</sup>) og med en amylasepositiv fenotype (Amy<sup>+</sup>).

35 Transformering med et plasmidpræparat af pDN1850 til en plasmidfri *B. subtilis* vært, *B. subtilis* DN497, beskrevet i dansk patentansøgning nr. 5719/85 s. 11-12, og

selektering for Cam<sup>R</sup> i agarplader indeholdende stivelse resulterede i ca. 1:10<sup>4</sup> transformanter, der fremstillede en aktiv amylase. Transformanterne var omgivet af en ring af nedbrudt stivelse, som kunne påvises med ioddamp. Disse Amy<sup>+</sup> transformanter indeholdt et QL hybrid amylasegen på plasmidet. Fra disse transformanter blev plasmiderne pDN1851 til pDN1865 isoleret, og man fandt, at transformanter indeholdende plasmider pDN1851, pDN1858 til pDN1862 og pDN1864 fremstillede  $\alpha$ -amylaser, som opfylder opfindelsens formål. Ved restriktionsenzymkortlægning af plasmid pDN1864 blev amyQL1864 genet karakteriseret (fig. 4) og vist at indeholde et Ava2 site fra amyQ, men ikke det nærliggende EcoRI site fra amyQ. Følgelig skete rekombination mellem amyQ og amyL mellem de kodoner, der koder for aminosyre nr. 58 og nr. 67 i B. licheniformis  $\alpha$ -amylasen, som vist ved det skraverede område på fig. 3. B. subtilis QL1864 fremstiller derfor en kimær amylase, sammensat af ca. 1/6 amyQ amylase ved den N-terminale ende og 5/6 amyL amylase ved den C-terminale ende.

I de følgende undersøgelser defineres enzymenhederne som vist nedenfor:

En NU (NOVO Unit)  $\alpha$ -amylaseaktivitet er den mængde enzym, som nedbryder 5,26 mg opløst stivelse i timen ved 37°C, pH 5,6 og 0,0043 M Ca<sup>++</sup> over en reaktionsperiode på 7 - 20 minutter.

En AG enhed glucoamylaseaktivitet er den mængde enzym, som hydrolyserer et micromol maltose pr. minut ved 25°C og pH 4,3.

En pullulanaseenhed (PUN) defineres som den mængde enzym, som under standardbetingelser (temperatur 40°C og pH 5,0) hydrolyserer pullulan med en hastighed svarende til dannelsen af "reducerende grupper" svarende til 1  $\mu$ mol glucose pr. minut.

#### Forsukringsforsøg

Som tidligere nævnt har det vist sig, at tilstedeværelsen af en B. licheniformis  $\alpha$ -amylaserestaktivitet hidrørende fra forflydningstrinnet har en negativ virkning på

det maksimale D-glucoseudbytte på forsukringstrinnet, når B. acidopullulyticus pullulanase og A. niger glucoamylase anvendes sammen.

For at evaluere indflydelsen af en restaktivitet 5 fra de kimære  $\alpha$ -amylaser ifølge opfindelsen på forsukrings- trinnet, blev de sammenlignet med B. licheniformis  $\alpha$ -amylase på følgende måde:

Forsukringssubstrater blev fremstillet ved genop- løsning af DE 8 (DE= Dextrose Equivalent (%reducerende 10 sukkerarter udtrykt som D-glucose)) forstøvningstørret malto- dextrin i deioniseret vand og opfyldning til ca. 30% DS (tørstof). Forsukringseksperimenter blev udført ved standard laboratoriebatchreaktioner på 500 ml.

pH blev målt ved forsukringstemperatur med pH- 15 elektrode og pH-meter kalibreret og justeret i puffer ved 60°C.

Følgende standardbetingelser anvendtes:

Substratkoncentration	28,2% (initialt) 30,8% (finalt)
Temperatur	60°C
20 pH (initialt, ved 60°C)	4,6
Enzymdosering:	
glucoamylase	0,15 AG/g DS
pullulanase	0,33 PUN/g DS
$\alpha$ -amylase	60 NU/g DS

25

Resultaterne af prøverne er vist i tabel 1.

Tabel 1

## Reaktionsbetingelser

5 $\alpha$ -amylase	Tid (h)	pH	%DP <sub>1</sub>	%DP <sub>2</sub>	%DP <sub>3</sub>	%DP <sub>4</sub>
	24	4,5	92,8	2,5	1,1	3,6
	48	4,4	96,7	1,8	0,7	0,8
ingen	72	4,4	96,8	2,0	0,6	0,6
10 (kontrol)	96	4,4	96,8	2,2	0,5	0,5
B. licheniformis	24	4,5	92,4	2,5	2,4	2,7
	48	4,5	95,9	1,8	1,5	0,9
	72	4,4	96,2	2,0	1,1	0,7
	96	4,4	96,4	2,1	0,9	0,6
15 QL1864	24	4,6	92,1	2,8	1,9	3,2
	48	4,5	96,3	1,7	1,2	0,9
	72	4,5	96,5	2,0	0,9	0,7
	96	4,5	96,6	2,1	0,8	0,6

20 Af tabellen ses, at skønt tilstedeværelsen af QL1864  $\alpha$ -amylase reducerede det maksimalt opnåelige DX med 0,2% (i sammenligning med kontrollen), repræsenterer den en forbedring i forhold til B. licheniformis  $\alpha$ -amylase, hvor reduktionen er 0,4%.

25

Termostivering og termostabilitet

For at evaluere termostivningen af de kimære  $\alpha$ -amylaser fremstillet med de transformerede stammer, blev de kimære  $\alpha$ -amylaser underkastet følgende forsøg:

30

Substrat: Phadebas tabletter (Phadebas® amylase test, Pharmacia Diagnostics, Sverige) en tværbundet blåfarvet stivelsespolymer uopløselig i vand.

35 Puffer:

0,1 M fosfat, pH 6,1 og TRIS puffer pH 9,5.

Enzym:

 $\alpha$ -amylase fortyndet til 1 - 2 NU/ml i 0,09 M CaCl<sub>2</sub>, pH 6,1.

Temperaturer: 37°C og 85°C.

1 ml  $\alpha$ -amylase- fortynding blandes grundigt med 5 ml puffer og inkuberes i et vandbad ved den ønskede temperatur inden tilsætning af en Phadebas tablet.

Reagensglasset rystes i 15 sekunder i en rysterblander, inden det igen anbringes i vandbadet.

Efter nøjagtig 15 minutter standses reaktionen ved tilsætning af 1 ml 1 M NaOH. Efter blanding filtreres blandingen gennem et 9 cm Whatman® GF/A eller FG/C filter.

Filtratets optiske tæthed måles ved en bølgelængde på 620 nm og er lineært relateret til aktiviteten af den tilsatte  $\alpha$ -amylase.

Resultaterne er vist nedenfor sammen med værdierne fra prøver med ren *B. licheniformis* og *B. amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylaserne.

Tabel 2

20 $\alpha$ -amylase	Phadebas 37°C	Phadebas pH 6,1
	pH 6,1:pH 9,5	75°C:37°C
<u>B. licheniformis</u>		
(kontrol)	0,4	3,7
QL1864	2,5	2,5
25 QL1861	2,2	2,2
QL1851	2,1	2,1
QL1862	2,0	2,0
QL1858	2,0	2,0
<u>B. amyloliquefaciens</u>		
30 (kontrol)	8,7	0,01

Af tabellen ses, at de kimære  $\alpha$ -amylaser ifølge opfindelsen er ligeså termoaktiverede som *B. licheniformis*  $\alpha$ -amylasen, og mindre følsomme overfor alkalisk pH end *B. amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase.

For at evaluere stabiliteten af  $\alpha$ -amylaserne ifølge opfindelsen blev følgende stålrørsprøver udført:

En DE 7 maltodextrin genopløst i afioniseret vand 5 blev anvendt som substrat under følgende betingelser:

Substrat: 32 - 33 procent  
 $\alpha$ -amylasedosering: 120 NU/g maltodextrin  
Temperatur: 105°C  
10 pH: 5,5  
Calciumindhold: 60 ppm

Ved hver prøve anbringes 5 stålrør indeholdende reaktionsblandingen i et oliebad ved 105°C og udtages efter 15 henholdsvis 10, 20, 30, 40 og 60 minutter, og  $\alpha$ -amylase-restaktiviteten blev målt ifølge den tidligere omtalte Phadebas metode. Halveringstiden,  $T_{1/2}$ , beregnes ved lineær regression af log (restaktivitet) versus tid.

20 Resultaterne er vist i tabel 3 herunder.

Tabel 3

<u><math>\alpha</math>-amylase</u>	<u><math>T_{1/2}</math> minutter</u>
25 B. amyloliquefaciens	
(kontrol)	5
QL1851	22
QL1858	25
QL1861	18
30 QL1862	22
QL1864	24
B. licheniformis	
(kontrol)	23

35 Af tabellen fremgår det tydeligt, at de hybride  $\alpha$ -amylaser ifølge opfindelsen har bibeholdt stabiliteten af B. licheniformis  $\alpha$ -amylasen.

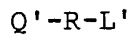
5

NYE PATENTKRAV

10

1. Kimær  $\alpha$ -amylase k e n d e t e g n e t ved, at den kan fremstilles ved dyrkning af en værtsorganisme, der er transformeret med et i værtsorganismen funktionsdygtigt plasmid omfattende et hybrid  $\alpha$ -amylasegen kodende for fra 55  
 15 til 85 N-terminale aminosyrerester i Bacillus amylolique-  
 faciens  $\alpha$ -amylase og fra 426 til 395 C-terminale aminosyre-  
 rester i Bacillus licheniformis 584(ATCC 27811)  
 $\alpha$ -amylase, og at den har den almene formel II:

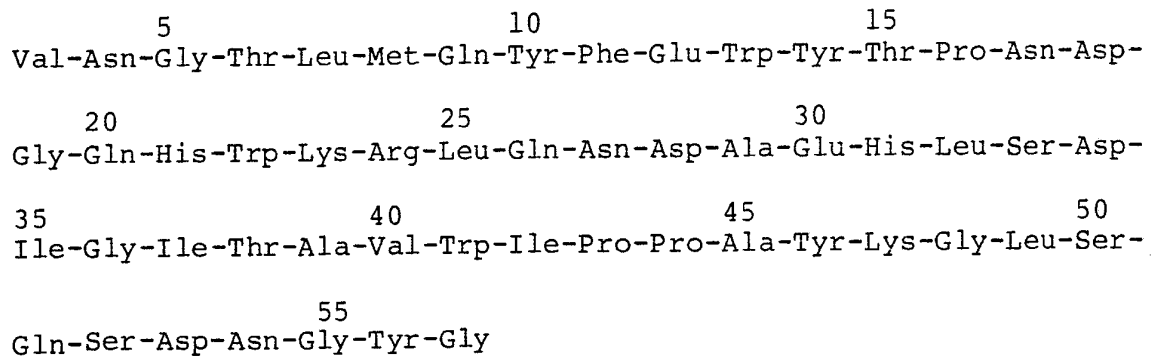
20



(II)

hvor Q' er de 55 N-terminale aminosyrerester i B. amylolique-  
 faciens  $\alpha$ -amylase med den almene formel Ib

25



(Ib)

L' er de 395 C-terminale aminosyrerester i B. licheniformis  
584 (ATCC 27811)  $\alpha$ -amylase med den almene formel Ic

5           90                               95                               100  
Ser-Leu-His-Ser-Arg-Asp-Ile-Asn-Val-Tyr-Gly-Asp-Val-  
                  105                               110                               115  
Val-Ile-Asn-His-Lys-Gly-Gly-Ala-Asp-Ala-Thr-Glu-Asp-Val-Thr-  
                  120                               125                               130  
10 Ala-Val-Glu-Val-Asp-Pro-Ala-Asp-Arg-Asn-Arg-Val-Ile-Ser-Gly-  
          1       135                               140                               145  
Glu-His-Arg-Ile-Lys-Ala-Trp-Thr-His-Phe-His-Phe-Pro-Gly-Arg-  
                  150                               155                               160  
Gly-Ser-Thr-Tyr-Ser-Asp-Phe-Lys-Trp-His-Trp-Tyr-His-Phe-Asp-  
15           165                               170                               175  
Gly-Thr-Asp-Trp-Asp-Glu-Ser-Arg-Lys-Leu-Asn-Arg-Ile-Tyr-Lys-  
                  180                               185                               190  
Phe-Gln-Gly-Lys-Ala-Trp-Asp-Trp-Glu-Val-Ser-Asn-Glu-Asn-Gly-  
                  195                               200                               205  
20 Asn-Tyr-Asp-Tyr-Leu-Met-Tyr-Ala-Asp-Ile-Asp-Tyr-Asp-His-Pro-  
                  210                               215                               220  
Asp-Val-Ala-Ala-Glu-Ile-Lys-Arg-Trp-Gly-Thr-Trp-Tyr-Ala-Asn-  
                  225                               230                               235  
Glu-Leu-Gln-Leu-Asp-Gly-Phe-Arg-Leu-Asp-Ala-Val-Lys-His-Ile-  
25           240                               245                               250  
Lys-Phe-Ser-Phe-Leu-Arg-Asp-Trp-Val-Asn-His-Val-Arg-Glu-Lys-  
                  255                               260                               265  
Thr-Gly-Lys-Glu-Met-Phe-Thr-Val-Ala-Glu-Tyr-Trp-Gln-Asn-Asp-  
                  270                               275                               280  
30 Leu-Gly-Ala-Leu-Glu-Asn-Tyr-Leu-Asn-Lys-Thr-Asn-Phe-Asn-His-  
                  285                               290                               295  
Ser-Val-Phe-Asp-Val-Pro-Leu-His-Tyr-Gln-Phe-His-Ala-Ala-Ser-  
                  300                               305                               319  
Thr-Gln-Gly-Gly-Gly-Tyr-Asp-Met-Arg-Lys-Leu-Leu-Asn-Ser-Thr-



hvor  $X_8$  er His eller Gln,  $X_9$  er Gly eller Ser,  $X_{10}$  er Ser eller Asp.

5

2. Kimær  $\alpha$ -amylase ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at værtsorganismen er Bacillus subtilis.

10

3. Kimær  $\alpha$ -amylase ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at plasmidet er et af plasmiderne pDN 1851, pDN 1858, pDN 1859, pDN 1860, pDN 1861, pDN 1862 eller pDN 1864.

15

4. Kimær  $\alpha$ -amylase ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at  $X_8$  er His,  $X_9$  er Gly og  $X_{10}$  er Ser.

20

5. Kimær  $\alpha$ -amylase ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at  $X_8$  er Gln,  $X_9$  er Ser og  $X_{10}$  er Asp.

25

6. Fremgangsmåde til fremstilling af en kimær  $\alpha$ -amylase ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at

a) en værtsorganisme transformeres med et i værts-  
30 organismen funktionsdygtigt plasmid omfattende et hybrid  $\alpha$ -amylasegen kodende for fra 55 til 85 N-terminale aminosyre-  
rester i Bacillus amyloliquefaciens  $\alpha$ -amylase og fra

