



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

NUMERO DE PUBLICATION : 1007313A3

NUMERO DE DEPOT : 09300744

Classif. Internat. : C12N C12P

Date de délivrance le : 16 Mai 1995

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 15 Juillet 1993 à 15H00 à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : SOLVAY (Société Anonyme)
rue du Prince Albert 33, B-1050 BRUXELLES(BELGIQUE)

représenté(e)s par : MEYERS Liliane, SOLVAY - Département Prop. Indus., Rue de Ransbeek, 310 - 1120 BRUXELLES.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : PULLULANASE, MICROORGANISMES LA PRODUISANT, PROCÉDES DE PREPARATION DE CETTE PULLULANASE ET UTILISATIONS DE CELLE-CI.

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Bruxelles, le 16 Mai 1995
PAR DELEGATION SPECIALE :

WUYTS L
Directeur.

Pullulanase, microorganismes la produisant,
procédés de préparation de cette pullulanase et utilisations
de celle-ci

L'invention concerne une nouvelle pullulanase. L'invention concerne également une nouvelle souche de microorganismes produisant cette pullulanase et les procédés de préparation de cette pullulanase. L'invention concerne également les
5 utilisations et les compositions comprenant celle-ci. L'invention concerne également une molécule d'ADN contenant le gène de cette pullulanase et un vecteur d'expression contenant cette molécule d'ADN, utile pour exprimer la pullulanase dans les souches de Bacillus.

10 L'amidon, dont les constituants essentiels sont l'amylose et l'amylopectine, peut être converti en sucres simples par un procédé enzymatique réalisé en deux étapes : une étape de liquéfaction de l'amidon et une étape de saccharification de l'amidon liquéfié. En vue d'atteindre un taux de conversion élevé de
15 l'amidon, il a déjà été proposé d'ajouter lors de la saccharification de l'amidon liquéfié une enzyme hydrolysant les liaisons glucosidiques α -1,6, comme, par exemple, une pullulanase.

Dans le brevet européen 0 063 909, on décrit une enzyme dite
20 débranchante, c'est-à-dire capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques α -1,6 dans l'amylopectine, qui présente une activité pullulanase et possède un optimum d'activité à un pH de 4-5 à 60 °C. Cette enzyme dérive d'une souche de Bacillus acidopullulyticus.

25 Par ailleurs, dans le brevet Etats-Unis 5,055,403, on a proposé une pullulanase présentant une activité enzymatique en

milieu acide et dérivée d'une souche de *Bacillus naganoensis*. Cette enzyme présente un maximum d'activité à un pH d'environ 5 mesurée à 60 °C et un maximum d'activité à une température d'environ 62,5 °C mesurée à un pH de 4,5.

5 Quoiqu'actives à pH acide et à une température d'environ 60 °C et dès lors utilisables lors de la saccharification de l'amidon liquéfié, les pullulanases de l'art antérieur présentent l'inconvénient d'être très peu stables dans de telles conditions de température et de pH, leur durée de demi-vie à une température
10 de 60 °C et à un pH d'environ 4,5 en l'absence de substrat ne dépassant pas quelques dizaines de minutes.

En conséquence il y a actuellement un besoin pour une pullulanase utilisable lors de la saccharification de l'amidon liquéfié, très stable dans une large gamme de température et de
15 pH, et en particulier à une température d'environ 60 °C et à un pH d'environ 4,5.

La présente invention a pour but de fournir une nouvelle pullulanase, active à pH acide, présentant une thermostabilité à pH acide très largement supérieure à celle des pullulanases de
20 l'art antérieur et une durée de demi-vie de plusieurs heures sous ces conditions précitées.

La présente invention a également pour but d'identifier, isoler et fournir une souche, et en particulier une souche de *Bacillus*, qui produit naturellement ladite pullulanase.

25 La présente invention a également pour but d'isoler et de fournir une séquence de nucléotides codant pour ladite pullulanase.

La présente invention a également pour but de préparer et fournir un vecteur d'expression contenant la séquence de
30 nucléotides codant pour ladite pullulanase.

La présente invention a également pour but de préparer et fournir un hôte de *Bacillus* transformé avec ladite séquence de nucléotides ou avec le vecteur d'expression contenant la séquence de nucléotides de la souche de *Bacillus* codant pour ladite
35 pullulanase.

A cet effet l'invention concerne une pullulanase produite par un *Bacillus*, et plus particulièrement par un microorganisme aérobique et non thermophile, et de préférence par le *Bacillus*

deramificans T 89.117D ou par un dérivé ou mutant de cette souche de *Bacillus deramificans*.

L'invention concerne également une pullulanase mutée obtenue par modification de la séquence de nucléotides du gène qui code
5 pour la pullulanase définie ci-dessus.

De préférence la pullulanase, isolée et purifiée, est constituée d'un seul type de polypeptide, ayant un poids moléculaire d'environ 100 ($\pm$ 10) kDa.

De manière particulièrement préférée, ladite pullulanase a un
10 point isoélectrique compris entre 4,1 et 4,5.

La pullulanase selon l'invention est thermostable et active dans une large gamme de température. La pullulanase est active à pH acide.

Ladite pullulanase est capable de catalyser l'hydrolyse des
15 liaisons glucosidiques α -1,6 présentes aussi bien dans l'amylopectine que dans le pullulane. C'est donc une enzyme dite déramifiante ou débranchante.

De plus, la séquence N-terminale (SEQ ID NO:1) de ladite pullulanase est la suivante dans le sens amino-carboxy et de
20 gauche à droite :

Asp	Gly	Asn	Thr	Thr	Thr	Ile	Ile	Val	His
1				5				10	
Tyr	Phe	Cys	Pro	Ala	Gly	Asp	Tyr	Gln	Pro
				15				20	

De préférence, la pullulanase selon l'invention dégrade le pullulane en maltotriose et l'amylopectine en amylose.

L'invention concerne une pullulanase, thermostable et active à pH acide, ayant une durée de demi-vie d'environ 55
25 heures mesurée à une température d'environ 60 °C dans une solution tamponnée à un pH d'environ 4,5 et en l'absence de substrat. De préférence ladite pullulanase est capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques de type α -1,6 dans l'amylopectine.

30 Par durée de demi-vie, on entend que la pullulanase montre une activité enzymatique relative d'au moins 50 % mesurée après

une incubation de 55 heures à une température d'environ 60 °C dans une solution tamponnée à un pH d'environ 4,5 et en l'absence de substrat.

La pullulanase selon l'invention est thermostable à pH
5 acide. En effet, la pullulanase selon l'invention montre une activité enzymatique relative d'au moins 55 % mesurée après une incubation de 40 heures à une température de 60 °C dans une solution tamponnée à un pH d'environ 4,5 et en l'absence de substrat. Elle montre une activité enzymatique relative d'au
10 moins 70 % mesurée après une incubation de 24 heures sous ces mêmes conditions.

Par activité enzymatique relative, on entend le rapport entre l'activité enzymatique, mesurée au cours d'un essai réalisé dans des conditions données de pH, température, substrat et
15 durée, et l'activité enzymatique maximale mesurée au cours de ce même essai, l'activité enzymatique étant mesurée à partir de l'hydrolyse du pullulane et l'activité enzymatique maximale étant fixée arbitrairement à la valeur de 100.

La pullulanase selon l'invention est par ailleurs stable
20 dans une large gamme de pH acides. Sous les conditions décrites ci-après, elle est active à un pH compris entre 3 et 7. En effet, ladite pullulanase montre une activité enzymatique relative d'au moins 85 % mesurée après une incubation de 60 minutes à une température d'environ 60 °C en l'absence de substrat et dans une
25 gamme de pH compris entre environ 3,5 et environ 5,8. De préférence, elle montre une activité enzymatique relative supérieure à 90 % mesurée dans une gamme de pH compris entre environ 3,8 et environ 5 sous ces mêmes conditions.

La pullulanase selon l'invention développe une activité
30 enzymatique optimale mesurée à une température d'environ 60 °C dans une gamme de pH comprise entre 4,0 et 4,8. De préférence ladite pullulanase développe une activité enzymatique optimale mesurée à une température d'environ 60 °C à un pH d'environ 4,3.

La pullulanase selon l'invention développe par ailleurs une
35 activité enzymatique optimale, mesurée à un pH d'environ 4,3, dans une gamme de température comprise entre 55 et 65 °C, et plus particulièrement à 60 °C.

La pullulanase selon l'invention développe une activité

enzymatique de plus de 80 % de l'activité enzymatique maximale (l'activité enzymatique maximale étant mesurée à une température de 60 °C et à un pH de 4,3) dans une gamme de pH compris entre environ 3,8 et environ 4,9 pour une température d'environ 60 °C.

5 La pullulanase selon l'invention possède par ailleurs toutes les propriétés adéquates compatibles avec les conditions industrielles réelles de saccharification de l'amidon. Ces propriétés sont un optimum de pH inférieur à 5, un optimum de température aux alentours de 60 °C et une bonne stabilité de
10 l'enzyme dans ces conditions de pH acide et de température élevée. Le milieu acide est imposé par l'utilisation simultanée de la glucoamylase et de la pullulanase lors de la saccharification industrielle de l'amidon. En effet la glucoamylase utilisée pour la saccharification de l'amidon est généralement
15 produite par un champignon et notamment par une souche d'*Aspergillus*, tel que *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* ou *Aspergillus foetidus*. Les conditions idéales adaptées à la saccharification d'amidon liquéfié en présence d'une glucoamylase sont une température d'environ 60 °C et un pH d'environ 4,0 à 4,5.
20 Ceci est notamment le cas pour la glucoamylase vendue sous les marques **DIAZYME L-200** par SOLVAY ENZYMES (Elkhart, Etats-Unis) et **OPTIDEX** par SOLVAY ENZYMES (Hannovre, Allemagne). Par ailleurs l'étape de saccharification dure plusieurs heures, en général de 40 à 60 heures, il est essentiel que les enzymes utilisées soient
25 stables, actives et efficaces tout au long de cette étape, ces enzymes doivent donc présenter une thermostabilité élevée en milieu acide et une durée de demi-vie la plus longue possible. C'est pourquoi la pullulanase de la présente invention est plus efficace que les pullulanases connues.

30 La présente invention concerne également un procédé pour la production d'une pullulanase comprenant la culture d'une bactérie aérobie (et non thermophile) capable de produire la pullulanase dans un milieu nutritif approprié contenant des sources de carbone et d'azote et des sels minéraux sous condition
35 d'aérobiose et la récolte de la pullulanase ainsi obtenue.

La présente invention concerne également un procédé pour la production d'une pullulanase comprenant la culture de la souche de *Bacillus deramificans* T 89.117D (LMG P-13056) ou un dérivé de

cette souche capable de produire la pullulanase dans un milieu nutritif approprié contenant des sources de carbone et d'azote et des sels minéraux sous condition d'aérobiose et la récolte de la pullulanase ainsi obtenue.

5 Les conditions de culture de ces bactéries telles que composants du milieu de culture, paramètres de culture, température, pH, aération, agitation, sont bien connues de l'homme du métier.

10 Les sources de carbone du milieu de culture sont habituellement choisies parmi l'amidon, l'amidon partiellement hydrolysé, l'amidon soluble, des oligosaccharides, le glucose, l'amylose, l'amylopectine ou un mélange de deux ou plusieurs de ceux-ci. Les sources de carbone du milieu de culture sont de préférence choisies parmi l'amidon partiellement hydrolysé, le glucose ou un
15 mélange de ceux-ci. De bons résultats ont été obtenus avec le glucose. Les sources d'azote du milieu de culture sont habituellement choisies parmi l'extrait de levure, la farine de soja, la farine de graines de coton, la farine de poisson, la gélatine, la farine de pomme de terre ou un mélange de deux ou
20 plusieurs de ceux-ci. Les sources d'azote du milieu de culture sont de préférence choisies parmi l'extrait de levure, la farine de soja ou un mélange de ceux-ci. De bons résultats ont été obtenus avec l'extrait de levure. Les sels minéraux du milieu de culture sont généralement choisis pour les anions parmi chlorure,
25 carbonate, phosphate, sulfate et pour les cations parmi potassium, sodium, ammonium, magnésium, calcium ou un mélange de deux ou plusieurs de ceux-ci. De bons résultats ont été obtenus avec un mélange des sels suivants KH_2PO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

30 La culture est généralement conduite à une température comprise entre 20 et 45 °C et de préférence entre 25 et 40 °C.

La culture est généralement conduite à un pH compris entre 3,5 et 6 et de préférence entre 4 et 6.

35 La culture est conduite sous condition d'aérobiose en présence d'air ou d'oxygène et sous agitation.

Les techniques de récolte de la pullulanase produite sont bien connues de l'homme du métier. Habituellement, on emploie la centrifugation, l'ultrafiltration, l'évaporation, la précipi-

tation, la filtration, la microfiltration, la cristallisation ou une combinaison de l'une ou l'autre de ces techniques telle qu'une centrifugation suivie d'une ultrafiltration.

La pullulanase peut ensuite être purifiée, si nécessaire, des techniques de purification d'enzymes sont connues de l'homme du métier.

La pullulanase peut également être séchée par atomisation ou lyophilisation.

La présente invention concerne également l'identification et la fourniture d'une nouvelle bactérie isolée aérobie produisant la pullulanase. Généralement elles appartiennent à la famille des Bacillaceae. De préférence elles appartiennent au genre Bacillus. De manière particulièrement préférée, ledit Bacillus est la souche de Bacillus deramificans T 89.117D ou un dérivé ou mutant de cette souche.

Par dérivé ou mutant de cette souche, on entend toute bactérie modifiée naturellement ou artificiellement. Les dérivés de cette souche peuvent être obtenus par les techniques connues de modification telles que rayonnement ultra-violet, rayons X, agents mutagènes ou génie génétique.

La souche de Bacillus deramificans T 89.117D a été déposée à la collection nommée BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICRO-ORGANISMS (LMG culture collection, Université de Gand, Laboratoire de Microbiologie - K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gand, Belgique) conformément au Traité de Budapest sous le numéro LMG P-13056.

La souche de la présente invention a été identifiée par ses caractéristiques biochimiques : bactérie Gram positif, aérobie qui se présente sous la forme de bâtonnet, elle forme une endo-spore.

L'invention concerne également l'isolement et la fourniture d'une molécule d'ADN comprenant une séquence de nucléotides codant pour la pullulanase de Bacillus deramificans T 89.117D (LMG P-13056). De préférence cette molécule d'ADN comprend tout le gène de la pullulanase de Bacillus deramificans T 89.117D.

L'invention concerne également la préparation et la fourniture d'un vecteur d'expression contenant la molécule d'ADN qui comprend la séquence de nucléotides qui code pour la pullulanase de Bacillus deramificans T 89.117D. De préférence la

molécule d'ADN comprend le gène de structure qui code pour la pullulanase de *Bacillus deramificans* T 89.117D. De manière particulièrement préférée ce vecteur est le vecteur PUBDEBRA1.

5 Par vecteur d'expression on entend toute séquence d'ADN qui comprend un réplicon et d'autres régions d'ADN (séquences de nucléotides) qui est fonctionnelle indépendamment de l'hôte comme une unité génique complète.

10 Par unité d'expression génique complète, on entend le gène de structure et la ou les région(s) du promoteur et la ou les région(s) de régulation nécessaire pour la transcription et la traduction. Par gène de structure on entend la séquence codante qui est utilisée comme patron pour la synthèse de l'ARN et permet la synthèse de la protéine par l'hôte.

15 Le vecteur d'expression préféré est le vecteur PUBDEBRA1. Ce vecteur contient le gène qui code pour la pullulanase de la souche de *Bacillus deramificans* T 89.117D selon l'invention. Ce vecteur peut être introduit dans un hôte approprié. Généralement cet hôte est une souche de *Bacillus*. De préférence cet hôte est une souche de *Bacillus licheniformis*. De manière particulièrement
20 préférée cet hôte est une souche de *Bacillus licheniformis* SE2. D'excellents résultats ont été obtenus avec ce vecteur lorsqu'il est introduit dans la souche de *Bacillus licheniformis* SE2 delapl, utilisée comme hôte.

25 La présente invention concerne également des souches recombinantes dans lesquelles ledit gène codant pour la pullulanase est introduit par les techniques de génie génétique. Le gène peut être introduit sur un plasmide ou intégré dans le chromosome de l'hôte en une ou plusieurs copies, le promoteur peut être modifié ou remplacé par un autre promoteur mieux adapté à l'hôte
30 récepteur, le gène lui-même peut être modifié de façon à produire une pullulanase mutante.

L'invention concerne également les souches de microorganismes différentes de l'organisme producteur de départ, dans lesquelles le gène codant pour la pullulanase est introduit par
35 transformation, soit sous forme intégrée dans l'ADN chromosomique, soit sous forme autorépliquative (plasmide).

L'invention concerne également une pullulanase mutée obtenue par modification de la séquence de nucléotides du gène qui code

pour la pullulanase définie ci-dessus.

L'invention concerne également un procédé pour la préparation d'une pullulanase recombinante, le procédé comprenant l'isolement d'un fragment d'ADN codant pour la pullulanase, 5 l'insertion de ce fragment d'ADN dans un vecteur approprié, l'introduction de ce vecteur dans un hôte approprié ou l'introduction de ce fragment d'ADN dans le chromosome d'un hôte approprié, la culture de cet hôte, l'expression de la pullulanase et la récolte de la pullulanase. L'hôte approprié est choisi 10 généralement parmi le groupe constitué des microorganismes *Escherichia coli*, *Bacillus* ou *Aspergillus*. Habituellement l'hôte est choisi parmi les *Bacillus*. De préférence l'hôte est choisi parmi les microorganismes *Bacillus* aérobies. De manière particulièrement préférée l'hôte est choisi parmi les 15 microorganismes *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus amylo-liquefaciens* ou *Bacillus deramificans* T 89.117D (LMG P-13056).

De bons résultats ont été obtenus lorsque l'hôte pour l'expression de la pullulanase selon la présente invention est 20 une souche recombinante dérivée de *Bacillus licheniformis*, et de préférence la souche de *Bacillus licheniformis* SE2 delap1.

La souche de *Bacillus licheniformis* SE2 a été déposée le 21 juin 1993 à la collection nommée BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICROORGANISMS (LMG culture collection, Gand, Belgique) 25 conformément au Traité de Budapest sous le numéro LMG P-14034.

La souche transformée (SE2 delap1) ainsi obtenue de *Bacillus licheniformis* SE2 diffère de la souche mère par le seul fait qu'elle ne contient pas dans son chromosome la séquence d'ADN qui code pour la protéase mature.

30 L'invention concerne également une pullulanase produite, de façon hétérologue, par un microorganisme du genre *Bacillus* qui contient un gène codant pour une protéase alcaline lorsqu'il est à l'état sauvage. De préférence ce microorganisme est une souche de *Bacillus licheniformis* comprenant la molécule d'ADN qui 35 comprend la séquence de nucléotides qui code pour la pullulanase de *Bacillus deramificans* T 89.117D. De manière particulièrement préférée, le gène codant pour la protéase alcaline a été délété de cette souche de *Bacillus*. Cette souche est de préférence la

souche de *Bacillus licheniformis* SE2 delap1.

Par produite de façon hétérologue, on entend une production qui n'est pas effectuée par le microorganisme naturel, c'est à dire le microorganisme qui contient à l'état sauvage le gène qui
5 code pour la pullulanase.

La pullulanase selon l'invention a des débouchés multiples dans diverses industries, telles que, par exemples, les industries alimentaires, les industries pharmaceutiques ou les industries chimiques.

10 La pullulanase peut notamment être utilisée en boulangerie comme "anti-staling", c'est-à-dire comme additif pour éviter au pain de rassir au cours de sa conservation ou en brasserie au cours de la fabrication de bières à faible teneur en calories.

La pullulanase peut également être utilisée lors de la
15 préparation d'aliments à faible teneur en calories dans lesquels l'amylose est utilisé comme substitut des matières grasses.

Pour les applications alimentaires, la pullulanase peut être immobilisée sur un support. Les techniques d'immobilisation d'enzymes sont bien connues de l'homme du métier.

20 La pullulanase selon l'invention convient particulièrement bien pour le traitement de l'amidon et du pullulane.

L'invention concerne l'utilisation de la pullulanase pour la saccharification de l'amidon liquéfié.

La présente invention concerne également l'utilisation de la
25 pullulanase lors d'un procédé de dégradation d'amidon ou d'amidon partiellement hydrolysé comprenant une étape de saccharification de l'amidon ou de l'amidon partiellement hydrolysé en présence d'une pullulanase. Généralement ce procédé est effectué en présence d'une ou de plusieurs autres enzymes telles que gluco-
30 amylase, α -amylase, β -amylase, α -glucosidase ou d'autres enzymes saccharifiantes.

Etant donné ses propriétés biochimiques, la pullulanase de la présente invention permet d'effectuer l'étape de saccharifi-
cation dans des conditions fortement acides, c'est-à-dire jusqu'à
35 au moins un pH de 3,9. Ce pH est plus acide que celui acceptable par les pullulanases connues.

La présente invention concerne également des compositions enzymatiques comprenant la pullulanase selon l'invention.

Les compositions comprenant la pullulanase de la présente invention peuvent être utilisées sous forme solide ou liquide.

La pullulanase est formulée selon les utilisations prévues. Des stabilisants ou des agents de conservation peuvent également
5 être ajoutés aux compositions enzymatiques comprenant la pullulanase selon l'invention. Par exemple on peut stabiliser la pullulanase par l'addition de propylène glycol, d'éthylène glycol, de glycérol, d'amidon, de pullulane, d'un sucre tel que du glucose, d'un sel tel que le chlorure de sodium ou d'un
10 mélange de deux ou plusieurs de ces produits. De bons résultats ont été obtenus lors de l'addition de propylène glycol.

Les compositions enzymatiques, selon l'invention, peuvent également comprendre, en plus de la pullulanase, une ou plusieurs autres enzymes. De telles enzymes sont notamment des hydrolases
15 d'hydrates de carbone, comme, par exemples, les glucoamylase, α -amylase, β -amylase, α -glucosidase, isoamylase, cyclomaltodextrin-glucotransférase, β -glucanase, α -glucosidase, glucose-isomérase, des enzymes saccharifiantes, des enzymes qui coupent les liens glucosidiques ou un mélange de deux ou plusieurs de
20 celles-ci.

La présente invention concerne de préférence une composition enzymatique comprenant une glucoamylase et une pullulanase.

La figure 1 représente la carte de restriction du plasmide pUBDEBRA1.

25 La figure 2 représente la carte de restriction du plasmide pLD1.

La figure 3 représente la carte de restriction du plasmide pUBCDEBRA11DNSI.

La signification des symboles et abréviations utilisés dans
30 ces figures est rassemblée dans le tableau suivant.

Symbole	Signification
Abréviation	

ORIEC	origine de répllication dans E. coli
REP	protéine nécessaire pour la répllication
35 ORI+	origine de répllication du brin +

	ORI-	origine de répllication du brin -
	KMR	gène apportant la résistance à la kanamycine
	BLMR	gène apportant la résistance à la bléomycine
	AMPR	gène apportant la résistance à l'ampicilline
5	PP	pré-pro-séquence
	BLIAPR	séquence codant pour la protéase alcaline de B. licheniformis
	5'BLIAPR	séquence 5' située en amont de la séquence codant pour la protéase alcaline de B. licheniformis
10	3'BLIAPR	séquence 3' située en aval de la séquence codant pour la protéase alcaline de B. licheniformis

La présente invention est illustrée par les exemples suivants.

Exemple 1

15 La souche de *Bacillus deramificans* T89.117D a été isolée du sol sur un milieu nutritif gélosé et sélectionnée pour sa capacité de dégrader un dérivé coloré du pullulane connu sous le nom de l'AZCL-pullulane et vendu par la Société **MEGAZYME**.

Cette souche a été mise en culture à 37 °C dans le milieu de
20 croissance MYE dont la composition est la suivante : KH_2PO_4 33 mM; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 6 mM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 45 mM; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1 mM; Extrait de levure 0,5 % (poids/volume); Glucose 0,5 % (poids/volume). Le pH du milieu est ajusté à pH 4,5 avec H_3PO_4 .

25 Le milieu gélosé (MYE/agar) contient 2 % (poids/volume) agar en plus.

La souche de la présente invention a été identifiée par ses caractéristiques biochimiques : bactérie Gram positif, aérobe qui se présente sous le forme de bâtonnet, elle forme une endo-spore.
30 Elle appartient donc au genre *Bacillus*.

Les cellules végétatives de cette souche en culture sur le milieu MYE à 37 °C ont une forme de bacille de taille 0,7 x 3,0-3,5 μm . La mobilité des cellules végétatives est faible.

Après une croissance de trois jours à 37 °C sur le milieu
35 MYE, l'observation microscopique révèle la présence de sporanges (sub)terminales légèrement déformées et en forme d'ellipse.

Le test de la catalase est faiblement positif en présence de

10 % de peroxyde d'hydrogène. Le test de l'oxydase est positif en présence de 1 % de tétraméthyl-1,4-phénylène-diammoniumdichlorure.

Cette souche est aérobie, c'est à dire qu'elle se développe
5 en aérobiose. Elle ne se développe pas en anaérobiose, c'est-à-dire sous une atmosphère de 84 % (v/v) N₂, 8 % (v/v) CO₂, 8 % (v/v) H₂ à 37 °C, par contre elle se développe en microanaérobiose, c'est-à-dire sous une atmosphère de 82.5 % (v/v) N₂, 6 % (v/v) O₂, 7.5 % (v/v) H₂, 4 % (v/v) CO₂ à 37 °C. %
10 (v/v) représente un pourcentage exprimé en volume par volume.

Cette souche n'est pas thermophile. Elle présente un développement normal après incubation en milieu MYE à 20 °C, 30 °C, 37 °C et 45 °C, par contre elle ne se développe pas à 50 °C et 55 °C. Elle présente un développement normal après incubation
15 en milieu MYE tamponné avec le tampon phosphate aux pH suivants pH 4,0, pH 4,5, pH 5,0 et pH 5,5, par contre elle ne se développe pas à pH 7,0. Elle présente un développement normal après incubation en milieu MYE en présence de NaCl aux concentrations de 2,0 % (poids/volume) et 3,5 % (poids/volume), présente un
20 développement faible en présence de 5,0 % (poids/volume) de NaCl et ne se développe pas en présence de 7,0 % (poids/volume) de NaCl.

Cette souche n'hydrolyse pas la caséine : en effet aucune zone de lyse n'a pu être observée après plus de 2 semaines
25 d'incubation à 37 °C. Elle décompose la tyrosine faiblement, ne produit pas d'acétoïne à partir de pyruvate et ne réduit pas le nitrate en nitrite ou en N₂.

La souche de *Bacillus deramificans* T89.117D selon l'invention est taxonomiquement différente de la souche de
30 *Bacillus acidopullulyticus* décrite dans le brevet européen 0 063 909 et de la souche de *Bacillus naganoensis* décrite dans le brevet U.S. 5,055,403. La souche de *Bacillus deramificans* T89.117D présente une croissance à un pH compris entre 4,7 et 5,5, ne présente pas de croissance à un pH de 7,0, se développe
35 en présence de 3,5 % (poids/volume) de NaCl, décompose la tyrosine et ne réduit pas le nitrate en nitrite.

La souche de *Bacillus deramificans* T89.117D a été déposée à la collection nommée BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF MICRO-

ORGANISMS (LMG culture collection) sous le numéro LMG P-13056.

Exemple 2

La souche de *Bacillus deramificans* T89.117D est mise en culture dans un milieu (MYA) liquide dont la composition est
5 identique à celle du milieu MYE à l'exception de la teneur en extrait de levure et en glucose, c'est à dire

Extrait de levure 2,5 % (poids/volume)

Amidon de pomme de terre 2,5 % (poids/volume).

La culture est réalisée sous agitation, avec une aération
10 efficace, à une température de 37 °C.

Après 68 heures de culture, on sépare la pullulanase et la biomasse cellulaire par centrifugation (5000 tours par minutes pendant 30 minutes), la pullulanase produite par la souche de *Bacillus deramificans* T89.117D est extracellulaire.

15 Puis on concentre la pullulanase par ultrafiltration, en vue d'obtenir une solution aqueuse concentrée de pullulanase.

On mesure l'activité enzymatique de la solution obtenue.

Une unité enzymatique de la pullulanase (PUN) est définie comme la quantité d'enzyme qui, à un pH de 4,5, à une température
20 de 60 °C et en présence de pullulane, catalyse la libération de sucres réducteurs à raison de 1 µM d'équivalent glucose par minute.

La mesure de l'activité enzymatique pullulanase est réalisée selon le protocole suivant. 1 ml d'une solution de pullulane à 1
25 % dans un tampon acétate 50 mM à pH 4,5 est incubée à 60 °C pendant 10 minutes. 0,1 ml d'une solution de pullulanase correspondant à une activité comprise entre 0,2 et 1 PUN/ml y est ajoutée. La réaction est stoppée après 15 minutes par addition de 0,4 ml de NaOH 0,5 M. Le dosage des sucres réducteurs libérés
30 se fait par la méthode de SOMOGYI-NELSON (J. Biol. Chem. 153 (1944) 375-380; J. Biol. Chem. 160 (1945) 61-68), et également dans les autres exemples de cette demande.

Une deuxième méthode est utilisée pour effectuer les dosages de la pullulanase. La réaction enzymatique en présence de pullu-
35 lane est effectuée selon les conditions de l'essai, puis est arrêtée par l'addition d'acide sulfurique (0,1 N). Les produits d'hydrolyse du pullulane sont ensuite soumis à une chromatographie HPLC (colonne HPX-87H de BIO-RAD; la phase mobile est

constituée de H_2SO_4 10 mM) afin de séparer les différents constituants. La quantité de maltotriose formé est estimée par mesure de la surface du pic obtenu.

L'activité dite débranchante, c'est-à-dire l'hydrolyse des liaisons glucosidiques α -1,6 présentes dans l'amylopectine, peut être quantifiée par l'augmentation de la coloration bleue provoquée, en présence d'iode, par la libération d'amylose à partir d'amylopectine.

La mesure de l'activité enzymatique débranchante est réalisée selon le protocole suivant. 0,4 ml d'une solution d'amylopectine à 1 % contenant un tampon acétate 50 mM à pH 4,5 est incubée à 60 °C pendant 10 minutes. La réaction est démarrée par l'addition de 0,2 ml de pullulanase et elle est arrêtée après 30 minutes par addition de 0,4 ml d'HCl 0,3 M. 0,8 ml d'une solution d'iode à 0,0025 % est ensuite ajoutée à 0,2 ml de ce mélange réactionnel et la densité optique est mesurée à 565 nm.

En vue de purifier la pullulanase, on diafiltre la solution aqueuse concentrée de pullulanase par 6 fois 500 ml d'une solution de NaCl à 9 g/l et on ajuste le pH de la solution aqueuse, ainsi obtenue, à pH 3,5 par addition d'HCl 25 % à température ambiante.

Le précipité obtenu est éliminé par centrifugation (5000 tours par minutes pendant 30 minutes), on récupère le surnageant de centrifugation. Le pH de ce surnageant est ajusté à pH 6,0 par addition de NaOH 5 M. Le précipité obtenu est éliminé par centrifugation.

On récupère le surnageant de centrifugation, que l'on chauffe jusqu'à 55 °C pendant 15 minutes.

Le précipité formé est à nouveau éliminé par centrifugation. On récupère le surnageant de centrifugation.

On ajoute à ce surnageant de l'acétone à une concentration finale de 60 % (volume/volume), la suspension formée est mise à 4 °C durant 2 heures. Le précipité formé à 4 °C est mis en solution dans un tampon MES (acide 2(N-morpholino)éthanesulfonique) 20 mM, $CaCl_2$ 1mM (pH 6,0). Cette solution de pullulanase est nommée solution A.

On purifie de nouveau cette solution A par chromatographie d'échange ionique. Une colonne d'environ 20 ml de volume

interne, vendue sous la marque S-SEPHAROSE HP HI LOAD 16/10, est préalablement équilibrée par un tampon CH_3COONa 50 mM, NaCl 100 mM (pH 4,0) à un débit de 5 ml/minute. La solution A est diluée 10 fois dans le tampon acétate et 15 ml de cette solution diluée
 5 sont déposés sur la colonne. Une phase isocratique est assurée par élution de 80 ml du tampon acétate (100 mM NaCl), suivie d'une élution par 200 ml du tampon acétate 50 mM (pH = 6,0) contenant un gradient linéaire en NaCl (100 - 500 mM).

L'activité pullulanase est mesurée dans chaque fraction.

10 Les fractions les plus actives sont rassemblées en une solution nommée B.

A partir de cette solution B on effectue une précipitation par de l'acétone à une concentration finale de 80 % (volume/volume). Le précipité obtenu est mis en solution dans
 15 une volume de 0,6 ml du tampon MES 20 mM, CaCl_2 1 mM (pH 6,0).

Cette solution de pullulanase est nommée solution C.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Fractions	Volume ml	Protéines			Activité pullulanase			Activité spécifique PUN/mg
		mg/ml	Total	%	PUN/ml	Total	%	
Solution A	1,5	6,48	9,7	100	17,5	26,3	100	2,7
Solution B	12	0,025	0,3	3	0,7	8,4	32	28

Le tableau 1 montre que cette étape de la purification a augmenté d'un facteur 10 l'activité spécifique pullulanase de la
 20 solution enzymatique.

L'activité débranchante, c'est-à-dire l'activité d'hydrolyse des liens α -1,6 dans l'amylopectine, de la pullulanase a également été mesurée comme décrit ci-dessus, par coloration à l'iode après hydrolyse de l'amylopectine. Les résultats montrent
 25 que l'activité débranchante a également été enrichie.

Exemple 3

Détermination du point isoélectrique

On effectue sur la solution C une électrophorèse IEF (iso

electro focusing) dans un gradient de pH variant de 4,0 à 6,5.

On dépose un volume correspondant à 0,12 unités de pullulanase en triple sur gel. Après migration, un tiers du gel est coloré au bleu de Coomassie.

5 Les deux autres parties du gel sont recouvertes par des gels d'agar (1 % poids/volume) tamponnés par CH_3COONa 100 mM, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 1 mM (pH 4,5) contenant respectivement 0,1 % (poids/volume) d'AZCL-pullulane ou 1 % (poids/volume) d'amylopectine. L'ensemble (gel d'acrylamide-gel d'agar) ainsi
10 obtenu est ensuite incubé à 60 °C en atmosphère saturée en humidité relative durant 16 heures. Le gel recouvert de la surcouche d'amylopectine est ensuite incubé à température ambiante dans une solution contenant de 3 mM I_2 , 50 mM KI afin de révéler l'activité débranchante par apparition de la coloration
15 bleue.

La révélation à l'iode du gel amylopectine révèle un halo bleu foncé, signe d'une activité débranchante, à un point iso-électrique compris entre 4,1 et 4,5 pour l'enzyme de la présente invention. La révélation de l'activité pullulanase indique le
20 même résultat.

Ceci démontre que la pullulanase de la présente invention présente une activité pullulanase et une activité débranchante.

Ceci démontre que la pullulanase de la présente invention est capable d'hydrolyser les liens de type α -1,6, aussi bien dans
25 le pullulane que dans l'amylopectine. Ceci démontre une spécificité faible de la pullulanase de la présente invention vis-à-vis de son substrat.

Exemple 4

pH et température d'activité enzymatique

30 On mesure l'activité enzymatique de la pullulanase à différentes températures (55, 60 et 65 °C) et à différents pH (de 3,25 à 7) en tampon citrate - phosphate 50 mM par la mesure des sucres réducteurs libérés. On met en oeuvre la solution C de pullulanase, telle qu'obtenue à l'exemple 2, diluée à environ 1 PUN/ml.

35 Les résultats sont rassemblés dans le tableau 2.

Au cours de cet essai l'activité enzymatique maximale a été mesurée, par la mesure des sucres réducteurs libérés, pour l'échantillon placé à un pH d'environ 4,3 et à une température

d'environ 60 °C. Par définition on a donc attribué à cet échantillon une activité enzymatique relative de 100 %.

Cet exemple montre que la pullulanase selon l'invention présente une activité enzymatique optimale mesurée à une température d'environ 60 °C dans une gamme de pH comprise entre 4,0 et 4,8.

Cet exemple montre également que la pullulanase selon l'invention présente une activité enzymatique optimale, mesurée à un pH d'environ 4,3, dans une gamme de température comprise entre 55 et 65 °C.

De plus, cet exemple montre que la pullulanase selon l'invention développe une activité enzymatique de plus de 80 % de l'activité enzymatique maximale dans une gamme de pH compris entre environ 3,8 et environ 4,9.

TABLEAU 2

Activité relative de l'enzyme %			
pH	Température °C		
	55	60	65
3,25	5,7	2,2	4,3
3,75	80,8	83,7	11,5
4,30	87,9	100	84,1
4,90	82,4	87,1	68
5,50	50,6	39,6	13,5
6,00	7,5	2,9	0
6,40	0	0	0

15 Exemple 5

Détermination de la demi-vie de l'enzyme

On dilue la solution A de la pullulanase, telle qu'obtenue à l'exemple 2, de telle sorte qu'elle développe une activité enzymatique d'environ 0,7 PUN/ml dans un tampon acétate de sodium 100 mM à un pH de 4,5. On incube la solution diluée contenant la pullulanase à 60 °C et des échantillons sont prélevés à des temps différents.

Une mesure de l'activité enzymatique par la méthode des sucres réducteurs (methode de SOMOGYI décrit ci-dessus) est ensuite réalisée. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 3.

TABLEAU 3

Temps heures	Activité relative %
0	100
16	76
24	74
40	57
48	54
64	47

5 Cet exemple montre que la pullulanase est thermostable à pH acide.

Cet exemple montre que la demi-vie de la pullulanase est d'environ 55 heures dans ces conditions. En effet la pullulanase présente une activité enzymatique relative d'au moins 50 %
 10 mesurée après une incubation de 55 heures à une température d'environ 60 °C dans une solution tamponnée à un pH d'environ 4,5 et en l'absence de substrat.

Cet exemple montre de plus que la pullulanase selon l'invention présente une activité enzymatique relative d'au moins
 15 55 % mesurée après une incubation de 40 heures à une température d'environ 60 °C dans une solution tamponnée à un pH d'environ 4,5 et en l'absence de substrat. Cet exemple montre également qu'elle présente une activité enzymatique relative d'au moins 70 % mesurée après une incubation de 24 heures sous ces mêmes
 20 conditions.

Exemple 6

Stabilité de la pullulanase vis-à-vis du pH

On dilue la solution A de la pullulanase, telle qu'obtenue à l'exemple 2, de telle sorte qu'elle developpe une activité enzy-
 25 matique d'environ 0,7 PUN/ml, dans différents tampons citrate-phosphate 100 mM à des pH variants entre pH 3,0 et 8,0. On

incube les différentes solutions diluées contenant la pullulanase pendant 60 minutes à 60 °C.

Ensuite on mesure l'activité enzymatique de ces différentes solutions après incubation pendant 60 minutes à pH 4,2 à 60 °C en 5 présence de 1,6 % (poids/volume) de pullulane. La quantité de maltotriose formée est mesurée par chromatographie HPLC. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 4.

Cet exemple montre que la pullulanase selon l'invention est stable dans une large gamme de pH acide, en effet elle présente 10 une activité enzymatique relative d'au moins 85 % mesurée après une incubation de 60 minutes à une température d'environ 60 °C en l'absence de substrat et dans une gamme de pH compris entre environ 3,5 et environ 5,8. Cet exemple montre également qu'elle présente une activité enzymatique relative supérieure à 90 % 15 mesurée dans une gamme de pH compris entre environ 3,8 et environ 5 sous ces mêmes conditions et qu'elle n'est inactivée qu'à un pH inférieur ou égale à 3 ou supérieur ou égale à 7.

TABLEAU 4

pH	Activité relative %
3	0
3,5	90
4	98
4,5	100
5	96
5,5	92
6	89
6,5	75
7	0

Exemple 7 et exemple 8R (de comparaison)

On prépare un milieu de saccharification en mettant en 20 suspension de l'amidon de maïs à une concentration de 35 % (poids/poids) en poids de matières sèches d'amidon et du chlorure de calcium à une concentration de 0,02 % (poids/volume).

On liquéfie cette suspension d'amidon de maïs en présence d' α -amylase, vendue sous la marque **TAKATHERM L-340** par SOLVAY ENZYMES, à 105 °C pendant 5 minutes à pH 6,0.

On refroidit rapidement l'amidon liquéfié, ainsi obtenu, à une température de 95 °C et on continue l'hydrolyse pendant 120 minutes à 95 °C sous agitation. A ce stade le degré d'hydrolyse est compris entre 10 et 12 DE (DE représente l'unité de "Dextrose Equivalents", c'est-à-dire le nombre d'extrémités réductrices exprimées en équivalent glucose)????.

10 L'amidon liquéfié ainsi obtenu est dilué à une concentration finale de 32 g de poids sec par 100 g de milieu de saccharification.

On refroidit le milieu de saccharification obtenu à une température de 60 °C.

15 On ajuste le pH de ce milieu de saccharification à différentes valeurs avec de l'acide acétique, depuis 3,9 jusqu'à 4,8 et on le maintient constant au cours de la saccharification.

On ajoute au milieu de saccharification une quantité de glucoamylase correspondante à 0,176 DU/g.ds. (unité enzymatique glucoamylase par g de matières sèches de milieu de sacchari-
20 fication), la glucoamylase utilisée est vendue sous la marque **DIAZYME L-200** par SOLVAY ENZYMES.

Pour l'exemple 7 selon l'invention, on ajoute également au milieu de saccharification une quantité de pullulanase, corres-
25 pondante à 0,075 PUN/g.ds., sous forme de solution aqueuse concentrée de pullulanase, telle que décrite à l'exemple 2.

L'exemple 8R de comparaison est réalisé, comme décrit ci-dessus pour l'exemple 7, mais sans addition de pullulanase.

Après 48 heures, on arrête la saccharification et on analyse
30 les produits obtenus par chromatographie. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 5.

Cet exemple montre que la pullulanase de l'invention est efficace en saccharification. La pullulanase de l'invention possède donc toutes les propriétés adéquates compatibles avec les
35 conditions industrielles réelles de saccharification de l'amidon.

Cet exemple montre que le taux de conversion de l'amidon est supérieur en présence de la pullulanase selon l'invention, à différents pH, et ceci jusqu'à un pH très acide, c'est-à-dire au

moins 3,9.

TABLEAU 5

pH	Exemples	Produits obtenus en %			>DP3
		Glucose	DP2	DP3	
3,9	8R	94,18	2,92	0,54	2,37
	7	95,63	2,90	0,73	0,73
4,2	8R	94,18	2,98	0,56	2,29
	7	94,79	4,30	0,56	0,38
4,5	8R	93,72	2,88	0,57	2,83
	7	95,49	3,00	0,75	0,76
4,8	8R	93,32	2,79	0,60	3,30
	7	95,25	2,70	0,87	1,18

DP2 représente les oligosaccharides contenant deux unités de glucose (dimère de glucose), DP3 les oligosaccharides contenant trois unités de glucose (trimère de glucose), >DP3 les oligosaccharides contenant plus de 3 unités de glucose.

Exemple 9 et exemple 10R (de comparaison)

On répète l'exemple 7, mais en fixant le pH de milieu de saccharification à un pH de 4,2.

On ajoute au milieu de saccharification une quantité de glucoamylase correspondante à 0,17 DU/g.ds. (unité enzymatique par g de matières sèches de milieu de saccharification), la glucoamylase utilisée est vendue sous la marque DIAZYME L-200 par SOLVAY ENZYMES.

Pour l'exemple 9 selon l'invention, on ajoute également au milieu de saccharification diverses quantités de pullulanase, correspondantes respectivement à 0,0325 PUN/g.ds., 0,050 PUN/g.ds., 0,075 PUN/g.ds. et 0,10 PUN/g.ds. (unité enzymatique pullulanase par gramme de matières sèches de milieu de saccha-

rification), sous forme de solution aqueuse concentrée de pullulanase, telle que décrite à l'exemple 2.

L'exemple 10R de comparaison est réalisé, comme décrit ci-dessus pour l'exemple 9, mais sans addition de pullulanase.

5 Les résultats sont rassemblés dans le tableau 6.

Cet exemple montre que la quantité de pullulanase qu'il faut mettre en oeuvre pour observer une augmentation du pourcentage de glucose produit est inférieure à 0,0325 PUN/g.ds.

TABLEAU 6

Exemples	Pullulanase PUN/g.ds.	Produits obtenus en %			
		Glucose	DP2	DP3	>DP3
10	0	94,78	3,55	0,73	0,94
9	0,0325	95,16	3,45	0,78	0,61
	0,050	95,30	3,39	0,74	0,56
	0,075	95,25	3,47	0,74	0,55
	0,10	95,27	3,49	0,70	0,53

Exemple 11

10 Le plasmide PUBDEBRA1 (figure 1) contient le gène qui code pour la pullulanase de la souche de Bacillus deramificans T 89.117D sous le contrôle de son propre promoteur de transcription, introduit dans le vecteur pUB131. La construction du plasmide PUBDEBRA1 est décrite ci-après.

15 L'ADN chromosomique est extrait à partir d'une culture de la souche de Bacillus deramificans T 89.117D (identifié sous le numéro LMG P-13056).

Pour ce faire, une culture de 200 ml de ce bacille est réalisée en milieu liquide MYE. Lorsqu'elle est en phase
20 stationnaire, elle est centrifugée à 5000 tours par minute pendant 10 minutes. Le culot de centrifugation ainsi obtenu est repris dans 9 ml de tampon TRIS-HCl (tris(hydroxy-méthyl)aminométhane acidifié avec HCl) 0,1 M, à un pH de 8, EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) 0,1 M, NaCl 0,15 M contenant
25 18 mg de lysozyme, la suspension ainsi obtenue est incubée 15

minutes à 37 °C.

Le lysat ainsi obtenu est ensuite traité par 200 µl d'une solution de RNase à 10 mg/ml pendant 20 minutes à 50 °C. 1 ml d'une solution de SDS (sodium dodécyl sulfate) à 10 % est alors ajoutée à ce lysat. Ensuite on incube ce lysat durant 30 minutes à 70 °C.

Puis le lysat est refroidi aux environ de 45 °C, on y ajoute ensuite 0,5 ml d'une solution de protéinase K à 20 mg/ml (préparée extemporanément).

10 Le lysat est incubé à 45 °C sous agitation manuelle jusqu'à l'obtention d'une solution transparente.

On effectue à partir de cette solution transparente plusieurs extractions au phénol sous les conditions et en suivant les procédures décrites dans Molecular Cloning - a laboratory manual - SAMBROOK, FRITSCH, MANIATIS - second edition, 1989, à la page E.3, jusqu'à l'obtention d'une interface propre, comme cela y est décrit.

20 L'ADN est précipité par 20 ml d'éthanol. Le précipité est récupéré par centrifugation à 5000 tours par minute pendant 5 minutes, puis mis en suspension dans 2 ml de tampon TE à pH 8,0 (10 mM TRIS-HCl, 1mM EDTA à pH 8,0).

L'ADN ainsi obtenu est ensuite clivé partiellement par l'enzyme de restriction Sau3AI. Les conditions de restriction dans cet exemple, et dans tous les autres exemples de cette demande, sont celles décrites par SAMBROOK et al (page 5,28-5,32), à part que ces conditions de restriction sont augmentées d'un facteur 10, afin d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour les étapes de purification suivantes.

30 Le rapport entre la quantité d'ADN mise en oeuvre et la quantité d'enzyme est ajusté afin d'obtenir un maximum de fragments de taille comprise entre 5 et 10 kpb (kpb : 10³ paires de bases).

L'ensemble des fragments ainsi obtenus est ensuite soumis à une électrophorèse en gel d'agarose (0,8 %) comme décrit par SAMBROOK et al (page 6,01-6,19) et les fragments de taille comprise entre 5 et 10 kpb sont isolés et purifiés par la méthode GENE CLEAN. Ils sont ensuite ligaturés avec le plasmide pBR322 qui est vendu par la société BIOLABS, [CLONTECH LABORATORIES

(U.S.A.) catalogue n° 6210-1] coupés au site BamHI et déphosphorylé comme décrit par SAMBROOK et al (page 1.60-1.61). Cette même technique est utilisée dans les autres exemples.

La ligation ainsi obtenue est transformée dans des cellules
5 de *E. coli* MC1061 [CLONTECH LABORATORIES, catalogue n° C-1070-1] par électroporation (SAMBROOK et al, page 1.75-1.81); les souches transformées sont sélectionnées sur boîte de Pétri contenant le milieu LB (Luria-Bertani) gélosé et 100 µg/ml d'ampicilline, après croissance à 37 °C pendant environ 18 heures. Le milieu LB
10 est décrit par SAMBROOK et al (page A.4). Ce milieu contient 10 g/l de tryptone, 5 g/l d'extrait de levure et 10 g/l de chlorure de sodium.

Les colonies obtenues sur ces boîtes sont ensuite répliquées sur deux boîtes du même milieu.

15 Une des deux boîtes est recouverte d'un milieu gélosé contenant 1 % (poids/volume) d'agar, 100 mM d'acétate de sodium (pH 4,5) et 0,1 % (poids/volume) d'AZCL-pullulane. Après incubation à 60 °C durant 18 heures, la colonie montrant une zone d'hydrolyse de l'AZCL-pullulane la plus importante est repérée,
20 et la colonie correspondante est isolée sur l'autre boîte répliquée.

Le fragment EcoRI-BamHI de 4,5 kpb du plasmide pBRDEBRA3 est obtenu par une double digestion du plasmide pBRDEBRA3 avec BamHI et EcoRI, puis une purification par électrophorèse en gel
25 d'agarose (0,8 % poids/volume). Ce fragment est ensuite ligaturé avec le vecteur pUB131, (décrit dans la demande de brevet européen 0 415 296), qui a préalablement fait l'objet d'une double digestion avec BamHI et EcoRI, aux sites BamHI et EcoRI, en utilisant la souche de *Bacillus subtilis* PSL1 comme hôte.

30 Le plasmide pUBDEBRA1, ainsi obtenu, est isolé et purifié à partir des cellules transformées PSL1 par la technique de la lyse alcaline (SAMBROOK et al, page 1.25-1.28). Cette même technique est utilisée dans les autres exemples.

Toutes les souches de *Bacillus subtilis* transformées sont
35 capables d'exprimer le gène de la pullulanase et de sécréter la pullulanase.

Les souches PSL1 transformées contenant le plasmide pUBDEBRA1 sont repiquées sur une boîte de Pétri contenant le

milieu LB avec 25 µg/ml de kanamycine.

Les colonies obtenues sont recouvertes d'une surcouche d'agarose (1 % poids/volume) contenant de l'AZCL-pullulane (0,1 % poids/volume) et de l'acétate de sodium (100 mM, pH 4,5). Après
5 une incubation à 60 °C durant 18 heures, on observe que toutes les colonies des souches transformées sont entourées d'un halo d'hydrolyse de l'AZCL-pullulane.

Exemple 12

Identification des parties terminales du gène de la protéase
10 alcaline de la souche hôte de *Bacillus licheniformis* SE2.

Cet exemple concerne l'identification des parties terminales du gène de la protéase alcaline de la souche hôte de *Bacillus licheniformis*, afin de préparer le plasmide de délétion pour déléter ledit gène du *Bacillus licheniformis* SE2.

15 1. Extraction de l'ADN chromosomique à partir de *B. licheniformis* SE2.

En vue d'isoler le gène de la protéase alcaline de l'ADN chromosomique du *Bacillus licheniformis* SE2, on extrait d'abord l'ADN chromosomique, en suivant la méthode décrite à l'exemple 11
20 pour l'extraction de l'ADN chromosomique, à l'exception du milieu de culture constitué du milieu LB, et on le purifie.

2. Identification de la partie C-terminale du gène de la protéase alcaline.

L'ADN chromosomique extrait est soumis à une analyse par
25 restriction, analyse décrite dans *Molecular Cloning - SAMBROOK et al.* (page 1.85) et *Molecular Cloning, a laboratory Manual*. MANIATIS et al, 1982 Cold Spring Harbor Laboratory, page 374-379). Les fragments d'ADN obtenus à partir de ces digestions sont séparés selon leur taille sur un gel d'agarose à 0,8 %
30 (poids/volume).

Le gel d'agarose est alors soumis à une analyse par la technique du SOUTHERN BLOT (Technique décrite par SAMBROOK et al - page 9.31), en vue d'identifier les fragments qui contiennent les séquences de nucléotides de la partie C-terminale du gène de
35 la protéase alcaline.

La sonde construite qui est utilisée pour les hybridations,

est un oligonucléotide synthétique correspondant à la partie C-terminale du gène de la protéase alcaline. La technique utilisée pour construire l'oligonucléotide synthétique est décrite dans BEAUCAGE, S.L. et al. (1981), Tetrahedron Letters, 5 22:1859-1882 et en utilisant des β -cyanoéthyl phosphoramidites dans un appareil de BIOSEARCH CYCLONE SYNTHESIZER. La séquence de l'oligonucléotide synthétique qui a été construit est la suivante (SEQ ID NO:2) :

5' - GGCGGAGCAAGCTTTGTGG - 3'

10 Ces résultats montrent que la partie C-terminale du gène de la protéase alcaline est localisée sur le fragment PstI d'environ 2,7 kpb.

L'hybridation avec les sondes d'ADN est effectuée en suivant la technique décrite dans Molecular Cloning - SAMBROOK et al. - 15 page 9.52-9.55. Cette même technique est utilisée dans les autres exemples.

La préparation d'ADN chromosomique extrait provenant de la souche de Bacillus licheniformis SE2 est ensuite digérée avec l'enzyme PstI et les fragments obtenus sont séparés selon leur 20 taille par électrophorèse de gel d'agarose (0,8 %).

Les fragments obtenus d'environ 2,7 kpb sont extraits des gels et purifiés par la technique dite "Gene Clean " mettant en oeuvre des billes de verre et mise sur le marché par la Société BIO101 (U.S.A.).

25 Les fragments PstI de 2,7 kpb sont ensuite ligaturés (SAMBROOK et al, page 1.68-1.69) avec le plasmide pUC18 (CLONTECH Laboratories, n° 6110-1), qui a été préalablement digéré au site PstI et déphosphorylé. La ligation ainsi obtenue a été ensuite transformée dans des cellules d'Escherichia coli MC1061 par la 30 technique au CaCl_2 (SAMBROOK et al- page 1.82-1.84). La technique permettant de déphosphoryler les fragments d'ADN ou de linéariser les vecteurs est décrite par SAMBROOK et al (page 1.60-1.61). La technique de la ligation est également décrite par SAMBROOK et al (page 1.68-1.69).

35 Les souches transformées sont sélectionnées sur boîtes de Pétri contenant le milieu LB gélosé et supplémenté de 100 $\mu\text{g/ml}$

d'ampicilline. Les souches transformées à partir d'E. coli MC1061 ainsi obtenues sont ensuite sélectionnées par hybridation avec l'oligonucléotide synthétique marqué en utilisant la sonde C-terminale utilisée dans l'étude du SOUTHERN et le plasmide pKC1
5 est isolé.

L'oligonucléotide synthétique est marqué par phosphorylation avec de l'ATP [γ - ^{32} P] en utilisant la T4-polynucléotide kinase du phage T4 et en suivant la technique décrite par SAMBROOK et al (page 11.31-11.33).

10 3. Identification de la partie N-terminale du gène de la protéase alcaline.

L'ADN chromosomique extrait est soumis à une analyse par restriction. Les fragments d'ADN obtenus à partir de ces digestions sont séparés selon leur taille sur un gel d'agarose à
15 0,8 %.

Le gel d'agarose est alors soumis à une analyse par la technique du SOUTHERN BLOT, en vue d'identifier les fragments qui contiennent les séquences de nucléotides de la partie N-terminale du gène de la protéase alcaline.

20 La sonde qui est utilisée pour les hybridations, est un oligonucléotide synthétique correspondant à la partie N-terminale du gène de la protéase alcaline. La séquence de l'oligonucléotide synthétique qui a été construite est la suivante (SEQ ID NO:3) :

5' - ATGGCTCCTGGCGCAGGC - 3'

25 Ces résultats montrent que la partie N-terminale du gène de la protéase alcaline est localisée sur le fragment PstI d'environ 5,5 kpb et également sur un fragment BclI-PstI, plus petit, d'environ 2 kpb. Ce fragment ne contient pas les sites de restriction XbaI, ClaI, HpaI et SphI.

30 La préparation d'ADN chromosomique extrait provenant de la souche de Bacillus licheniformis SE2 est ensuite digérée avec l'enzyme PstI et les fragments obtenus sont séparés selon leur taille par électrophorèse de gel d'agarose (0,8 %).

35 Les fragments obtenus d'environ 5,5 kpb sont extraits des gels et purifiés par la technique dite "Gene Clean".

Les fragments PstI de 5,5 kpb ainsi obtenus sont ensuite soumis à une série de digestions avec BclI, XbaI, ClaI, HpaI et SphI. Les fragments d'ADN ainsi produits sont ligaturés avec le plasmide pMK4, tel que décrit dans SULLIVAN et al., (1984), Gene 5 29:21-26, qui a été préalablement linéarisé par BamHI et PstI. Le plasmide pMK4 peut être obtenu à la collection B.G.S.C. (Bacillus Genetic Stock Center (Ohio State University) Columbus, Ohio, U.S.A.) sous le numéro 1E29.

Les ligations ainsi obtenues ont été ensuite transformées 10 dans des cellules d'Escherichia coli MC1061 par la technique au CaCl_2 .

Les souches transformées sont sélectionnées sur boîtes de Pétri contenant le milieu LB gélosé et supplémenté de 100 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline. Les souches transformées à partir d'E. coli MC1061 15 ainsi obtenues sont ensuite sélectionnées par hybridation avec l'oligonucléotide synthétique marqué en utilisant la sonde N-terminale dans l'étude du SOUTHERN et le plasmide pKP1 est isolé.

Exemple 13

20 On détermine les séquences des fragments introduits dans les plasmides pKP1 et pKC1 à partir des sites PstI jusqu'aux sites SacI, en suivant la technique décrite par SAMBROOK et al (page 13,15 et 13,17 et figure 13,3B).

Exemple 14

25 Le plasmide pLD1 (figure 2) est construit dans le but de préparer la souche de Bacillus licheniformis SE2 delapl. La construction du plasmide pLD1 est décrite ci-après.

Le plasmide pKP1 (tel qu'obtenu à l'exemple 12) est instable dans E. coli MC1061. C'est pourquoi le fragment d'ADN 30 chromosomique contenant la partie N-terminale du gène de la protéase alcaline de B. licheniformis SE2 a été introduit dans le vecteur pACYC184 (BIOLABS, U.S.A., sous le numéro #401-M). Cette introduction a été effectuée en introduisant le fragment EcoRI-EcoRI de 1849 bp du plasmide pKP1 dans le site EcoRI du 35 plasmide pACYC184 et la ligation est utilisée pour transformer les cellules d'E. coli MC1061. Le plasmide pKPN11 est ainsi obtenu.

Les souches transformées sont sélectionnées sur boîte de

Pétri contenant le milieu LB gélosé et supplémenté de 12,5 µg/ml de tétracycline. L'orientation du fragment EcoRI-EcoRI de 1849 bp dans le plasmide pKPN11 est déterminée par l'analyse de restriction (SAMBROOK et al. - page 1,85 et MANIATIS et al - page 5 374-379).

Le plasmide pKPN12 est obtenu de la façon suivante : on ôte le fragment StyI-StyI de 1671 bp du plasmide pKPN11 par digestion avec StyI, suivie du remplacement de ce fragment par l'ADN double brin synthétique suivant, qui a été produit préalablement :

```

10  5' - CTTG GAGCTC GTTAAC AGATCT      - 3'      (SEQ ID NO:4)
    3' -      CTCGAG CAATTG TCTAGA GTTC - 5'      (SEQ ID NO:5)
        (StyI) SacI   HpaI   BalIII (StyI)

```

La digestion des plasmides avec des enzymes de restriction est effectuée en suivant la technique décrite par SAMBROOK et al.
15 - 1989 - chapitres 5.28-5.32.

Le fragment d'ADN venant du plasmide pUB131 qui code pour la résistance à la kanamycine et à la bléomycine ou à la phléomycine a été obtenu comme suit :

Le fragment PstI-TaqI de 2666 bp, qui porte les gènes qui
20 codent pour la résistance à la kanamycine et à la bléomycine ou à la phléomycine, est obtenu par double digestion PstI-TaqI du plasmide pUB131. Ce fragment est introduit dans les sites PstI-AccI du plasmide pBS- (STRATAGENE, U.S.A., sous le numéro 211202). On obtient ainsi le plasmide pBSKMPM.

25 Durant la préparation du plasmide pBSKMPM, une petite délétion dans la région de la liaison avec le plasmide pBS- apparaît, cela entraîne la perte des sites SphI et PstI dans le plasmide pBSKMPM. Le plasmide pBSKMPM est utilisé pour produire un ADN simple brin mis en oeuvre pour effectuer une mutagenèse
30 dirigée en vue d'introduire les deux nucléotides synthétiques dont les sites SmaI sont identifiés ci-après, l'un est situé en amont et l'autre en aval des gènes de résistance à la kanamycine et à la phléomycine.

La technique de la mutagenèse dirigée est décrite par
35 SAMBROOK et al - page 15,74-15,79. Elle utilise le kit de mutagenèse vendue par BIO-RAD (n° 170-3576).

Les séquences des oligonucléotides synthétiques mis en oeuvre pour la mutagenèse sont les suivantes (respectivement SEQ ID NO:6 et SEQ ID NO:7) :

5' - CATCTAATCTTCAACACCCGGGCCCGTTTGTGAAC - 3'
SmaI

5' - CAAAATAAAAAAGATACAACCCGGGTCTCTCGTATCTTTTAT - 3'
SmaI

Le plasmide obtenu par cette mutagenèse en présence des deux
5 oligonucléotides est le plasmide pBSKMPM1. Ce plasmide contient deux sites de restriction SmaI qui permettent l'isolement du fragment d'ADN contenant les gènes qui codent pour la résistance à la kanamycine et la phléomycine.

Le fragment SmaI-SmaI de 1597 bp du plasmide pBSKMPM1 est
10 ensuite introduit dans le site SmaI du plasmide pKPN12, le plasmide pKPN14 est ainsi obtenu.

La bonne orientation du fragment introduit dans le plasmide pKPN14 est vérifiée en effectuant une sélection sur les préparations d'ADN plasmidique par l'analyse de restriction
15 (SAMBROOK et al - page 1,85).

Le fragment d'ADN, présent sur le plasmide pKCl et localisé en aval de la séquence N-terminale de la protéase alcaline, est isolé sur le fragment SacI-HindIII de 1,2 kpb du plasmide pKCl (tel qu'obtenu à l'exemple 12) par digestion, d'abord avec
20 HindIII.

L'extrémité 5' saillante de HindIII est rendue à bouts droits par un traitement avec le fragment Klenow de l'ADN polymérase (SAMBROOK et al- page F,2-F,3). La restriction SacI est alors effectuée en vue de produire le fragment souhaité
25 SacI-HindIII à bouts droits. Ce fragment est introduit dans les sites HpaI et SacI du plasmide pKPN14, en produisant le plasmide pLID1.

Toutes ces constructions sont effectuées par transformation de la souche d'E. coli MC1061 en présence de tétracycline (12
30 µg/ml) pour la sélection des souches transformées.

Un plasmide capable de se multiplier dans B. subtilis et

dans *B. licheniformis*, est construit à partir du plasmide pLID1 en remplaçant les fonctions de répllication d'*E. coli*, qui sont portées par le fragment BglIII-BglIII de 3623 bp du plasmide pLID1, par le fragment qui porte les fonctions de répllication de
5 *Bacillus* : fragment BglIII-BamHI de 2238 bp isolé à partir du plasmide pUB131.

Ce remplacement des fonctions de répllication d'*E. coli* par celles de *Bacillus* a été effectué en isolant d'abord le fragment BglIII-BglIII de 3,6 kpb à partir du plasmide pLID1 par digestion
10 du plasmide pLID1 avec BglIII et BamHI. Une digestion BamHI supplémentaire a été nécessaire, en effet une digestion BglIII seule résulterait en fragments de taille identique qui ne pourraient pas être séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Le fragment BglIII-BglIII de 3,6 kpb est alors cloné, dans la
15 souche de *Bacillus subtilis* SE3, dans le fragment BglIII-BamHI de 2238 bp qui a été isolé du plasmide pUB131, en produisant le plasmide pLD1 (figure 2).

La souche de *Bacillus subtilis* SE3 a été déposée le 21 juin 1993 à la collection nommée BELGIAN COORDINATED COLLECTIONS OF
20 MICROORGANISMS conformément au Traité de Budapest sous le numéro LMG P-14035.

Exemple 15

Les modifications souhaitées dans l'ADN chromosomique de la souche de *Bacillus licheniformis* SE2 sont effectuées par les
25 techniques basées sur la recombinaison homologue. Les modifications sont effectuées pour produire la souche de *Bacillus licheniformis* SE2 delap1.

Le plasmide pLD1 est transformé dans *B. licheniformis* SE2 par la technique des protoplastes décrite par MANIATIS et al
30 (page 150-151) et sous les conditions définies à l'exception des modifications suivantes : la poudre de lysozyme est ajoutée à 5 mg/ml dans le SMP, au lieu de 1 mg/ml comme définie à l'étape 7 de la procédure décrite, l'incubation pour obtenir une lyse maximale avec le lysozyme est de 60 minutes, la régénération est
35 faite dans le milieu DM3 (décrit par Molecular Biological Methods for *Bacillus* (Harwood et al, eds) John Wiley and Sons (1990)(page 150-151) contenant 200 µg/ml de kanamycine.

Une souche transformée est isolée et la carte de restriction

du plasmide est vérifiée (pLD1).

La souche transformée est mise en culture dans 50 ml d'un milieu LB supplémenté de 2 g/l de glucose et de 25 µg/ml de kanamycine, pendant 18 heures à 37 °C.

5 Un échantillon de culture (0,1 ml) est prélevé et sert à inoculer un erlenmeyer contenant 50 ml de même milieu LB. La culture est incubée à 37 °C pendant 18 heures. Un échantillon de cette culture est prélevé et testé sur boîte de Pétri contenant le milieu LB gélosé et supplémenté de 25 µg/ml de kanamycine et
10 de 1 % (poids/volume) de lait écrémé (DIFCO) , pour détecter la présence de protéase.

L'absence de halo d'hydrolyse autour des colonies qui présentent une croissance sur ces boîtes de Pétri indiquent que ces colonies sont incapables de produire une protéase alcaline.

15 Les cultures et les tests sont répétés jusqu'à l'obtention d'une souche (apr^- , Km^R), c'est à dire à la fois ne produisant plus de protéase alcaline (apr^-) et résistante à la kanamycine (Km^R).

Le plasmide pLD1 présent dans cette souche de *Bacillus licheniformis* SE2 delap1 est ensuite ôté de celle-ci par culture
20 sur un milieu de croissance à 37 °C en absence d'antibiotique.

Cette souche est mise en culture dans 50 ml de milieu LB supplémenté de 2 g/l de glucose, pendant 18 heures à 37 °C. Un volume de 0,1 ml de cette culture est prélevé et sert à inoculer
25 un autre erlenmeyer contenant également 50 ml d'un même milieu, la culture dure 18 heures à 37 °C. Un échantillon est alors prélevé et est étalé sur boîte de Pétri de milieu LB. Les colonies isolées sont repiquées sur une seconde boîte de milieu LB supplémenté de 25 µg/ml de kanamycine. Une souche sensible à
30 la kanamycine (Km^S) est isolée. On confirme son phénotype (apr^- , Km^S).

L'ADN chromosomique de cette souche est alors isolé et purifié et la structure de la délétion chromosomique est vérifiée par la technique du SOUTHERN BLOT. Les délétions identifiées sont
35 correctes quant à leur position, ayant eu lieu par une double recombinaison homologue dans les séquences situées en amont (5') et en aval (3') du gène de la protéase alcaline.

Le souche obtenue est appelée *B. licheniformis* SE2 delap1.

Elle ne produit pas de protéase alcaline.

Exemple 16

Le plasmide PUBDEBRA1 (figure 1) est extrait de son hôte, isolé et purifié.

5 On prépare une culture de la souche de *B. licheniformis* SE2 delap1, puis on transforme cette souche avec ce plasmide.

La transformation de la souche de *B. licheniformis* SE2 delap1 par le plasmide PUBDEBRA1 est effectuée selon la technique des protoplastes.

10 La souche transformée est sélectionnée, isolée et purifiée. Puis elle est mise en culture.

Exemple 17

La souche de *B. licheniformis* SE2 delap1 transformée par le plasmide PUBDEBRA1, telle qu'obtenue à l'exemple 16, est mise en culture pendant 17 heures à 37 °C dans un milieu de préculture LB
15 supplémenté de 0,5 % (poids/volume) de glucose et 20 µg/ml de kanamycine. Cette préculture est transférée (5 % volume/volume) dans 50 ml de milieu M2 supplémenté de 20 µg/ml de kanamycine. La culture est incubée sous agitation pendant 80 heures à 37°C.
20 Après 80 heures, la biomasse est éliminée par centrifugation à 5000 tours par minutes pendant 10 minutes. Le surnageant de centrifugation est conservé. On mesure l'activité enzymatique sur ce surnageant et on note la présence d'une activité pullulanase.

25 Exemple 18

Cet exemple concerne l'intégration du gène codant pour la pullulanase dans le chromosome de la souche *Bacillus licheniformis* SE2 delap1.

Pour ce faire, le fragment EcoRI-BamHI de 4,5 kb du plasmide
30 pBRDEBRA3 est cloné dans les sites EcoRI et BamHI du vecteur pUBC131 par transformation de la souche *E.coli* MC1061, générant ainsi le plasmide pUBCDEBRA11.

Le vecteur d'intégration pUBCDEBRA11DNSI (figure 3) est ensuite construit en délétant le fragment NsiI-NsiI de 886 bp du
35 plasmide pUBCDEBRA11. Le plasmide ainsi obtenu a perdu la possibilité de se répliquer dans *Bacillus*, par la perte du fragment NsiI de 886 bp.

Pour effectuer cette construction, le plasmide pUBCDEBRA11

est clivé par l'enzyme de restriction NsiI, et le fragment NsiI-NsiI de 9368 bp est purifié par électrophorèse en gel d'agarose. Ce fragment est ensuite soumis à une ligation afin de le recirculariser. La ligation est transformée dans *E. coli* MC1061, et le plasmide pUBCDEBRA11DNSI1 est obtenu.

Afin d'intégrer le plasmide pUBCDEBRA11DNSI1 dans la souche *B. licheniformis* SE2 delap1, il est nécessaire que ce plasmide porte un fragment d'ADN homologue à l'ADN chromosomique. On a donc cloné dans le site BamHI du vecteur d'intégration pUBCDEBRA11DNSI1, des fragments chromosomiques Sau3AI provenant de *B. licheniformis*.

Pour ce faire, l'ADN chromosomique extrait de la souche *Bacillus licheniformis* SE2 delap1 est clivé partiellement par l'enzyme de restriction Sau3AI. Les fragments d'ADN de taille comprise entre 1,5 et 3 kb sont ensuite purifiés par gel d'agarose et ligaturés avec le plasmide pUBCDEBRA11DNSI clivé par l'enzyme de restriction BamHI et déphosphorylé. La ligation ainsi obtenue est transformée dans des cellules de MC1061 par électroporation. Après sélection sur milieu LB gélosé contenant 100 µg/ml d'ampicilline, environ 3000 colonies sont obtenues. L'ensemble de ces colonies est mis en suspension dans du milieu LB et une extraction des plasmides est effectuée par la technique de la lyse alcaline.

La préparation de plasmides ainsi obtenue est alors introduite par transformation par la technique des protoplastes dans la souche de *Bacillus licheniformis* SE2 delap1. Les cellules transformées sont sélectionnées sur le milieu de régénération DM3 (Molecular Biological Methods for *Bacillus* (Harwood, C.R. and Cutting, S.M., Eds) J.Wiley and sons, 1990, 150-151) pour leur résistance à la phléomycine (17 µg/ml), celle-ci ne pouvant leur être conférée que par intégration chromosomique d'un des plasmides construits ci-dessus.

Les colonies ainsi obtenues sont repiquées sur milieu LB gélosé supplémenté de 5 µg/ml de phléomycine et 0,06 % d'AZCL-pullulane. La colonie présentant le halo d'hydrolyse d'AZCL-pullulane le plus grand est alors isolée et repiquée sur milieu LB gélosé.

Une extraction du contenu plasmidique de cette souche est

alors effectuée. La préparation ainsi obtenue est soumise à une analyse par gel d'électrophorèse en agarose, qui montre l'absence de plasmide.

5 L'ADN chromosomique est extrait et purifié comme décrit à l'exemple 8 et soumis à une analyse par la technique de SOUTHERN, qui montre que le plasmide pUBCDEBRA11DNSI s'est intégré dans l'ADN chromosomique par recombinaison homologue dans un fragment Sau3AI d'environ 3 kb.

10 Ceci demontre que le gène codant pour la pullulanase de B. deramificans s'exprime dans B. licheniformis, à l'état intégré dans le chromosome.

R E V E N D I C A T I O N S

1 - Pullulanase caractérisée en ce qu'elle est produite par la souche de *Bacillus deramificans* T 89.117D (LMG P-13056) ou un dérivé ou mutant de cette souche.

- 5 2 - Pullulanase thermostable et active à pH acide, capable d'hydrolyser les liaisons glucosidiques de type α -1,6 dans l'amylopectine, caractérisée en ce que sa séquence N-terminale (SEQ ID NO:1) est la suivante dans le sens amino-carboxy et de gauche à droite :

Asp	Gly	Asn	Thr	Thr	Thr	Ile	Ile	Val	His
1				5				10	
Tyr	Phe	Cys	Pro	Ala	Gly	Asp	Tyr	Gln	Pro
				15				20	

- 10 3 - Pullulanase selon la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle a une durée de demi-vie d'environ 55 heures mesurée à une température d'environ 60 °C dans une solution tamponnée à un pH d'environ 4,5 et en l'absence de substrat.

- 15 4 - Pullulanase caractérisée en ce qu'elle est produite, de façon hétérologue, par un microorganisme du genre *Bacillus* qui contient un gène codant pour une protéase alcaline lorsqu'il est à l'état sauvage.

- 5 - Pullulanase selon la revendication 4 caractérisée en ce

que le gène codant pour la protéase alcaline a été délété du microorganisme du genre Bacillus.

6 - Procédé pour la production d'une pullulanase selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il
5 comprend la culture de la souche de Bacillus deramificans T 89.117D (LMG P-13056) ou d'un dérivé de cette souche capable de produire la pullulanase dans un milieu nutritif approprié contenant des sources de carbone et d'azote et des sels minéraux sous condition d'aérobiose et la récolte de la pullulanase ainsi
10 obtenue.

7 - Procédé pour la préparation d'une pullulanase selon l'une quelconque des revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il comprend l'isolement d'un fragment d'ADN codant pour la pullulanase, l'insertion de ce fragment d'ADN dans un vecteur
15 approprié, l'introduction de ce vecteur dans un hôte approprié ou l'introduction de ce fragment d'ADN dans le chromosome d'un hôte approprié, la culture de cet hôte, l'expression de la pullulanase et la récolte de la pullulanase.

8 - Utilisation d'une pullulanase selon l'une quelconque des
20 revendications 1 à 5 pour le traitement de l'amidon.

9 - Molécule d'ADN comprenant la séquence de nucléotides qui code pour la pullulanase de Bacillus deramificans T 89.117D (LMG P-13056).

10 - Molécule d'ADN selon la revendication 9 caractérisée en
25 ce qu'elle comprend le gène de la pullulanase de Bacillus deramificans T 89.117D.

11 - Vecteur d'expression contenant la molécule d'ADN selon la revendication 9.

12 - Vecteur d'expression pUBDEBRA1.

13 - Souche transformée de *Bacillus licheniformis* comprenant la molécule d'ADN selon la revendication 9.

14 - Souche transformée de *Bacillus licheniformis* comprenant le vecteur d'expression selon la revendication 12.

15 - Pullulanase produite par la souche transformée de *Bacillus licheniformis* selon la revendication 13 ou 14.

16 - Une culture isolée et purifiée de *Bacillus deramificans* T 89.117D et culture dérivée ou mutée de celle-ci.

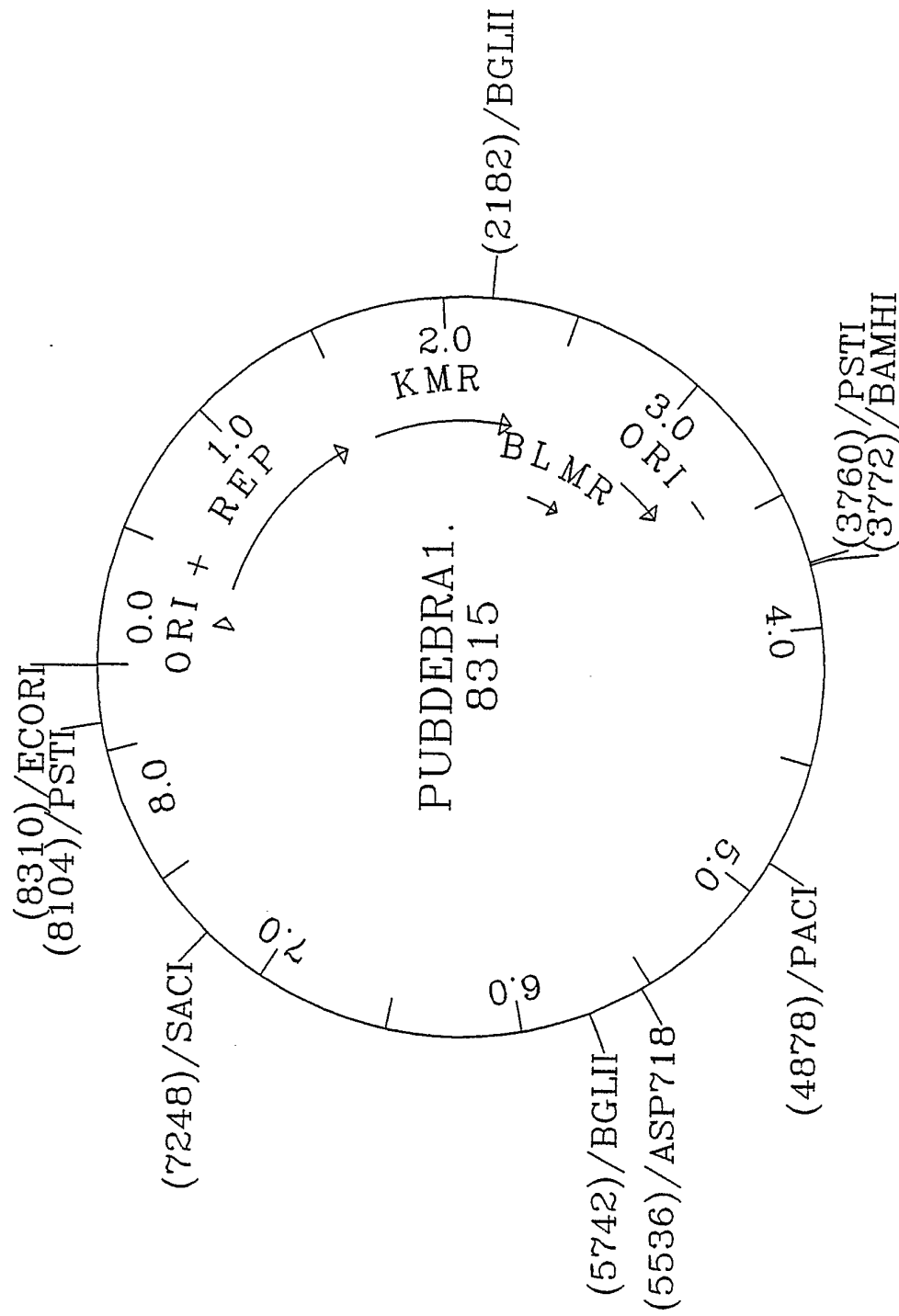


FIG. 1

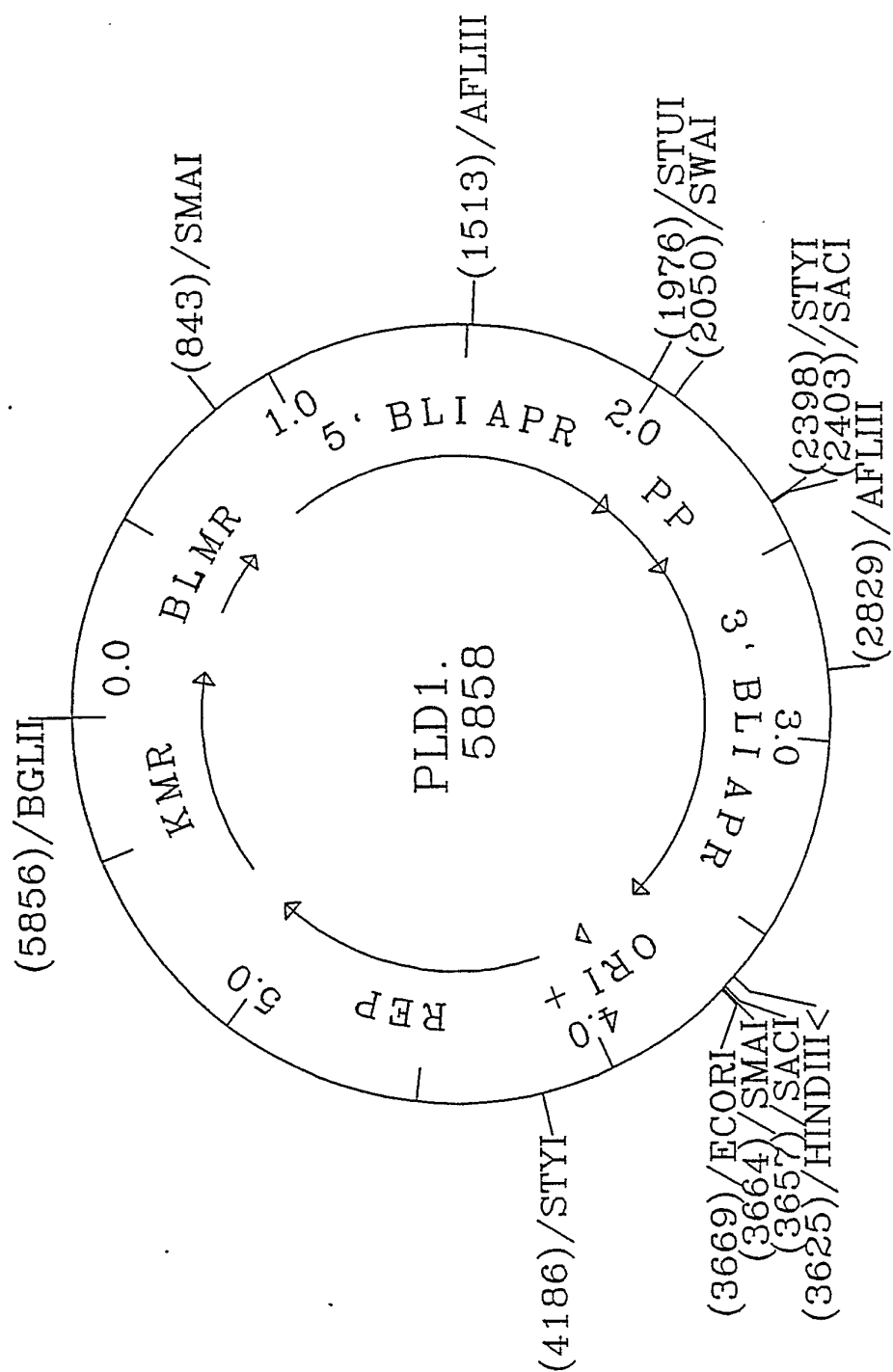


FIG. 2

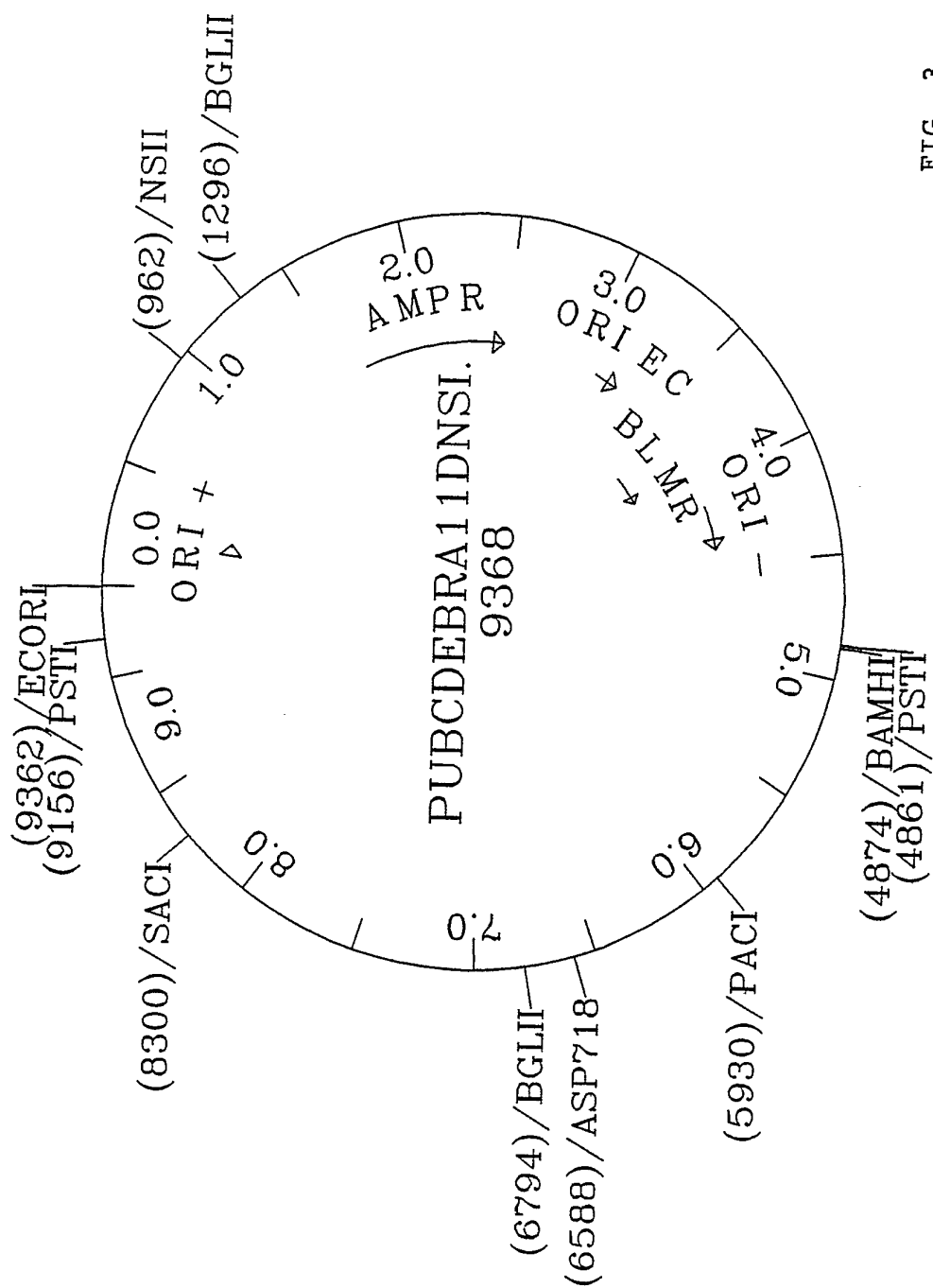


FIG. 3



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BO 4699
BE 9300744

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int.Cl.5)
A	WO-A-92 16617 (NOVO NORDISK A/S) * page 1, ligne 15 - page 2, ligne 11 * * page 4, ligne 4 - ligne 14 * * page 5, ligne 8 - page 6, ligne 9 * ---	1,3,4, 6-16	C12N15/56 C12N9/44 C12P19/16 C12N1/21 C12N1/20 //(C12N1/21, C12R1:10), (C12N1/20, C12R1:07)
A	JOURNAL OF BACTERIOLOGY vol. 170, no. 4, Avril 1988 pages 1554 - 1559 TAKASHI KURIKI ET AL. 'New type of pullulanase from Bacillus stearothermophilus and molecular cloning and expression of hte gene in Bacillus subtilis' * abrégé * * page 1555, colonne de droite, dernier alinéa - page 1557, colonne de gauche, alinéa 1 * ---	1,3,4,6, 7,9-11, 13,15	
A	EP-A-0 405 283 (ENZYME BIO-SYSTEMS LTD.) * page 3, ligne 16 - ligne 28 * -----	1,3,6,8, 16	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int.Cl.5)
D,A	& US-A-5 055 403 (TOMIMURA E.) -----		C12N C12R C12P
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
7 Mars 1994		Montero Lopez, B	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BO 4699
BE 9300744

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

07-03-1994

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9216617	01-10-92	EP-A- 0578672	19-01-94

EP-A-0405283	02-01-91	CA-A- 2019756	26-12-90
		JP-A- 3030672	08-02-91
		US-A- 5055403	08-10-91

US-A-5055403	08-10-91	CA-A- 2019756	26-12-90
		EP-A- 0405283	02-01-91
		JP-A- 3030672	08-02-91
