



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 282 028 A5

5(51) C 12 N 15/56

PATENTAMT der DDR

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 N / 325 800 0

(22) 16.02.89

(44) 29.08.90

(71) siehe (73)

(72) Borriss, Rainer, Dr. sc. nat., DD; Hofemeister, Jürgen, Dr. sc. nat., DD; Thomsen, Karl K., Lic. scient. Ph. D., DK; Olsen, Ole, Cand. scient., DK; von Wettstein, Dietrich, Prof. Dr., DK

(73) Akademie der Wissenschaften der DDR, Otto-Nuschke-Straße 22-23, Berlin, 1080, DD

(54) Verfahren zur Herstellung einer thermostabilen, hybriden *Bacillus*-beta-1,3-1,4-Glukanase

(55) hybride Glukanase; thermostabil; Brauindustrie; Viskosität; Braumaische; Chimaeres Gen; *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus macerans*

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung thermostabiler, hybrider *Bacillus*-beta-1,3-1,4-Glukanase. Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren, das eine beta-Glukanase herzustellen erlaubt, die in der Brauindustrie zur Verarbeitung großer Rohfruchtmengen eingesetzt werden kann, um die Viskosität der Braumaische erhöhende Glukan-Verbindungen hydrolytisch zu spalten; diese Glukanase muß aber auch oberhalb von 60 °C ihre Funktionswirksamkeit beibehalten. Dazu wird ohne die Verwendung von Antibiotika eine stabile Expression durch ein chimaeres Gen erreicht, das aus den glukanasekodierenden DNS-Sequenzen von *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus macerans* fusioniert wird, dem die Signalsequenz der Glukanase aus *Bacillus amyloliquefaciens* vorhergeht. Die so gewonnene Glukanase ist auch oberhalb 70 °C ausreichend stabil, insbesondere bei den brauereitypischen pH-Werten. Fig. 1

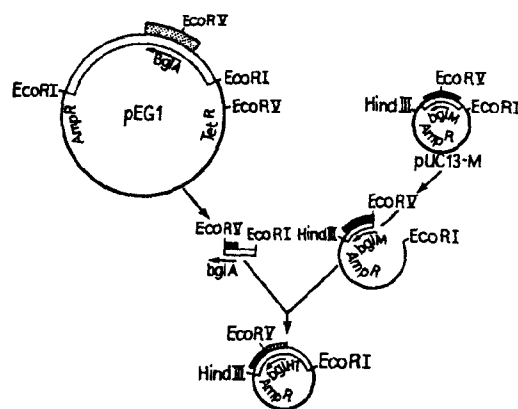


FIG.1

Patentansprüche:

1. Verfahren zur Herstellung einer thermostabilen, hybriden *Bacillus*-beta-1,3-1,4-Glukanase, wobei ein geeignetes Gen für diese Glukanase isoliert und mittels eines Vektors in einem Mikroorganismus-Stamm exprimiert wird und wobei ferner eine stabile Expression dieses Gens gewährleistet ist, ohne daß Zusätze von Antibiotika gebraucht werden, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Glukanase aus
 - einem Signalpeptid S von *Bacillus amyloliquefaciens*,
 - einem N-terminalen Polypeptid A von 50 bis 150 Aminosäuren, das zu mehr als 90% dem N-terminalen Teil der beta-1,3-1,4-Glukanase aus *Bacillus amyloliquefaciens* homolog ist, und
 - einem C-terminalen Polypeptid M besteht, das zu mehr als 90% dem C-terminalen Teil der beta-1,3-1,4-Glukanase aus *Bacillus macerans* homolog ist, und daß sie nach der allgemeinen Formel

S – A – M

zusammengesetzt ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Glukanase die Aminosäuresequenz¹_{Met}-Lys-Arg-Val-Leu-Leu-Ile-Leu-Val-Thr-Gly-Leu-Phe-Met-Ser-Leu-Cys-Gly-Ile-Thr-Ser-Ser-Val-Ser-²⁵_{Ala}-²⁶_{Gln}-Thr-Gly-Gly-Ser-Phe-Phe-Glu-Pro-Phe-Asn-Ser-Tyr-Asn-Ser-Gly-Leu-Trp-Gln-Lys-Ala-Asp-Gly-Tyr-Ser-Asn-Gly-Asp-Met-Phe-Asn-Cys-Thr-Trp-Arg-Ala-Asn-Asn-Val-Ser-Met-Thr-Ser-Leu-Gly-Glu-Met-Arg-Leu-Ala-Leu-Thr-Ser-Pro-Ser-Tyr-Asn-Lys-Phe-Asp-Cys-Gly-Glu-Asn-Arg-Ser-Val-Gln-Thr-Tyr-Gly-Tyr-Gly-Leu-Tyr-Glu-Val-Arg-Met-Lys-Pro-Ala-Lys-Asn-Thr-Gly-Ile-Val-Ser-Ser-Phe-Phe-Thr-Tyr-Thr-Gly-Pro-Thr-Glu-Gly-Thr-Pro-Trp-Asp-Glu-Ile-¹³²_{Asp}-¹³³_{Ile}-Glu-Phe-Leu-Gly-Lys-Asp-Thr-Thr-Lys-Val-Gln-Phe-Asn-Tyr-Tyr-Thr-Asn-Gly-Val-Gly-Gly-His-Glu-Lys-Val-Ile-Ser-Leu-Gly-Phe-Asp-Ala-Ser-Lys-Gly-Phe-His-Thr-Tyr-Ala-Phe-Asp-Trp-Gln-Pro-Gly-Tyr-Ile-Lys-Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Leu-Lys-His-Thr-Ala-Thr-Ala-Asn-Ile-Pro-Ser-Thr-Pro-Gly-Lys-Ile-Met-Met-Asn-Leu-Trp-Asn-Gly-Thr-Gly-Val-Asp-Asp-Trp-Leu-Gly-Ser-Tyr-Asn-Gly-Ala-Asn-Pro-Leu-Tyr-Ala-Glu-Tyr-Asp-Trp-Val-Lys-Tyr-Thr-Ser-239 Asn aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß ein für die Glukanase kodierendes hybrides Gen erzeugt wird, indem
 - aus einem ersten Gen für beta-1,3-1,4-Glukanase aus *Bacillus amyloliquefaciens* mittels eines Restriktionsenzym ein – das C-terminale Polypeptid M kodierendes – DNS-Fragment entfernt,
 - aus einem zweiten Gen für beta-1,3-1,4-Glukanase aus *Bacillus macerans* mittels vorzugsweise des gleichen Restriktionsenzym ein – das C-terminale Polypeptid M kodierendes – DNS-Fragment isoliert und
 - mittels Ligase das DNS-Fragment des zweiten Gens an die Stelle des in dem ersten Gen entfernten DNS-Fragmentes in das erste Gen eingebaut wird.
4. Verfahren nach Anspruch 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das hybride Gen aus
 - einer regulatorischen DNS-Sequenz stromaufwärts des Gens für die beta-Glukanase aus *Bacillus amyloliquefaciens*,
 - einer Signal-DNS-Sequenz dieser Glukanase bis zur Position 25,
 - der DNS-Sequenz für die N-terminalen Aminosäuren dieser Glukanase von der Position 26 bis zur Position 132,
 - der DNS-Sequenz für die C-terminalen Aminosäuren der beta-Glukanase aus *Bacillus macerans* von der Position 133 bis zur Position 239 und
 - einem Stopkodon und terminatorischen DNS-Sequenzen stromabwärts von Position 239 ab besteht.
5. Verfahren nach Anspruch 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß
 - das erste DNS-Fragment ein EcoRI-EcoRV-DNS-Fragment aus einem Plasmid pEG1 ist,
 - aus einem Plasmid pUC19/34 ein EcoRV-EcoRI-DNS-Fragment entfernt und
 - an dessen Stelle das erste DNS-Fragment einliert wird.

Hierzu 4 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer thermostabilen, hybriden *Bacillus*-beta-1,3-1,4-Glukanase nach dem Oberbegriff des Patentanspruches 1.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

Glukanasen dieser Art werden für die Herstellung verschiedener Nahrungs-, Genuß- und Futtermittel sowie als Hilfsstoffe in der biologischen Forschung eingesetzt, wenn die hydrolytische Spaltung der beta-glykosidischen Bindungen von beta-1,3-1,4-Glukanen beabsichtigt ist. Vor allem in der Brauindustrie wird durch den Einsatz solcher pflanzenglukan-hydrolysierender Enzyme die Verarbeitung größerer Rohfruchtmengen, zum Beispiel von Gerste anstelle von Malz, möglich, ohne daß dabei Schwierigkeiten bei der Filtration und Läuterung der Braumaische infolge ungenügend abgebauter, viskositätserhöhender Glukan-Verbindungen zu befürchten wären.

Es ist seit langem bekannt, die Viskosität der Brauwürze mit Hilfe von beta-Glukanasen mesophiler *Bacillus*-Stämme, etwa von *Bacillus amyloliquefaciens* oder von *Bacillus subtilis*, herabzusetzen [1]. Auch die Verwendung gentechnisch manipulierter *Bacillus*-Stämme, die das beta-Glukanase-Gen von *Bacillus amyloliquefaciens* in amplifizierter Form auf einem Vektorplasmid enthalten, ist zur Verbesserung der Ausbeute von mesophiler Glukanase entsprechend einem älteren Vorschlag der Anmelderin bereits ins Auge gefaßt [2].

Der Nachteil dieser vorbekannten Glukanasen liegt in ihrer Temperaturempfindlichkeit; sie werden nur in einer frühen Phase des Maischprozesses wirksam, oberhalb 60°C aber sind sie nicht mehr oder nicht mehr ausreichend aktiv.

So ist es beispielsweise bekannt, daß die beta-Glukanase von *Bacillus amyloliquefaciens* oberhalb von 65°C schnell inaktiviert wird und so ihre Wirkung am Ende des Maischprozesses stark reduziert ist [3]. Man hat versucht, diesem Nachteil durch screening von beta-Glukanasen mit erhöhter Thermostabilität zu begegnen. Die beta-Glukanase von *Bacillus macerans* ist beispielsweise gegenüber anderen *Bacillus*-beta-Glukanasen deutlich thermostabiler [4]. Die bei ihrer wirtschaftlichen Verwertung auftretenden Schwierigkeiten können gemäß einem weiteren Vorschlag der Anmelderin [5] behoben werden, wenn das für diese Glukanase kodierende Gen aus einem Donorstamm von *Bacillus macerans* gewonnen und unter Verwendung eines Bakterien-Stammes zur Expression gebracht wird, der der Art *Bacillus subtilis* nahesteht oder angehört.

Bei 70°C wird jedoch auch diese Glukanase schnell irreversibel denaturiert. Speziell im Brauprozess ist es störend, daß diese Glukanasen in dem für Braumaischen typischen pH-Bereich zwischen 4 und 5 nur einen geringen Teil ihrer vollen Aktivität aufweisen. So wurden für *Bacillus*-beta-Glukanase nur 20% oder weniger ihrer im pH-Bereich zwischen 6 und 7 vollen Aktivität nachgewiesen, wenn sie bei pH = 4,6 bestimmt wurde. Gleichzeitig ist die pH-Stabilität reduziert, wenn diese Glukanasen bei pH = 4 inkubiert werden.

Weil derzeit der Zusammenhang zwischen Proteinstruktur und der Aktivität der Glukanasen nicht sicher bekannt ist, lassen sich theoretische Vorhersagen nicht machen, die auf solche Aminosäuresequenzen abheben, welche die Thermostabilität eines Enzyms erhöhen.

Es ist deshalb fachüblich, die Aminosäuresequenzen gleicher Enzyme, die aus verschiedenen Bakterien-Stämmen herrühren und unterschiedlich thermostabil sind, miteinander zu vergleichen unter der Voraussetzung, daß sich diese Enzyme nur durch relativ wenige, am gleichen Ort der Aminosäuresequenz befindliche, aber von Enzym zu Enzym verschiedene Aminosäuren voneinander unterscheiden, also hochgradig homolog sind. Einige der nicht gleichen Aminosäuren sollten dabei essentiell für die zu messenden Stabilitäts-Unterschiede sein. Durch ortsgerichtete Mutagenese ist es dann möglich, eine oder mehrere solcher Aminosäuren zu ersetzen, um auf diese Weise die Thermostabilität zu verbessern.

Eine solche Verfahrensweise ist jedoch sehr unsicher, auch wenn sie in einigen wenigen Fällen den gewünschten Erfolg hatte; das Gegenteil ist jedoch ebenfalls bekannt geworden. So wurde ermittelt [6], daß der Austausch einzelner Aminosäuren, der in diese vorgeschriebenen Weise [7] vorgenommen wurde, bei der neutralen Protease von *Bacillus stearothermophilus*, deren dreidimensionale Struktur bekannt ist, durchaus nicht regelmäßig die Thermostabilität des Enzyms verbessert.

Damit verbleibt derzeit als am meisten aussichtsreich, ein derartiges Enzym durch screening innerhalb einer großen Gruppe von Organismen, besonders innerhalb von thermophilen Mikroorganismen, zu gewinnen, eine solche Vorgehensweise ist aber umständlich, langwierig und teuer.

Generell ist festzustellen, daß die Eigenschaften von natürlichen Enzymen unterschiedlichster Art oft heutigen Ansprüchen in der Industrie nur mangelhaft genügen. In einem bekannten Vorschlag [8] wird stattdessen beschrieben, wie durch die Fusion des N-terminalen Teiles der alpha-Amylase von *Bacillus amyloliquefaciens* mit der alpha-Amylase von *Bacillus licheniformis* die vorteilhaften Eigenschaften beider Enzyme – darunter eben auch die gute Thermostabilität der alpha-Amylase aus *Bacillus licheniformis* – miteinander verbunden werden können.

In ähnlicher Weise können auch verschiedene Gene des humanen Interleukins in vitro [9]; [10] oder in vivo [11] rekombiniert werden, um Hybride mit veränderter antiviraler Aktivität zu erhalten.

Die Thermostabilität der in dieser Weise gewonnenen hybriden Enzyme ist dabei höchstens so gut wie die beste der für die Hybridkonstruktion verwendeten ursprünglichen Enzyme.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, eine thermostabile, hybride Glukanase der eingangs näher bezeichneten Art in wirtschaftlicher industrieller Herstellung zu gewinnen, die insbesondere der Brauerei besser als die bisher beschriebenen Glukanasen angepaßt, jedoch auch für andere Zwecke wie etwa die Herstellung von Kaffee-Surrogaten geeignet ist.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt deshalb die Aufgabe zugrunde, die oben ausführlich beschriebenen Nachteile des Standes der Technik zu vermeiden und eine gentechnisch manipulierte Glukanase zu erzeugen, die ein sicher thermostabiles Verhalten oberhalb 60°C mit unverminderter Aktivität im pH-Bereich zwischen 4 und 5 verbindet.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch die Verwendung einer *Bacillus*-beta-1,3-1,4-Glukanase mit den im kennzeichnenden Teil des Patentanspruches 1 angegebenen Merkmalen gelöst. Nähere Einzelheiten der Erfindung sind in den Unteransprüchen aufgeführt.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann – vor allem in der Brauerei – sehr effizient eingesetzt werden. Die Nachteile der bisher verwendeten Glukanasen, auch der gentechnisch veränderten Glukanasen, sind weitgehend beseitigt; wie im Ausführungsbeispiel noch zu zeigen ist, ist mit einer hohen Enzym-Aktivität gerade bei dem wirtschaftlich wichtigen Wert von pH = 4,6 zu rechnen, und ganz besonders überraschend ist es, daß die Thermostabilität des hybriden Enzyms deutlich besser ist als diejenige der beiden für die Hybridkonstruktion verwendeten ursprünglichen, natürlichen Enzyme, wie ebenfalls weiter unten dargelegt ist. Damit ist die erfindungsgemäß hergestellte Glukanase, die zudem im Gegensatz zu den bekannten hybriden Enzymen auch durch In-vitro-Rekombination hergestellt werden kann, sowohl den bisher bekannten, sowohl natürlichen als auch genetisch manipulierten Glukanasen überlegen. Selbstverständlich kann die In-vivo-Rekombination für die Herstellung der erfindungsgemäßen Glukanase ebenfalls verwendet werden.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend, unter anderem auch an Hand der Zeichnung, an einem Ausführungsbeispiel näher erläutert, in welchem die Herstellung einer neuen, chimären *Bacillus*-beta-1,3-1,4-Glukanase H 1 und deren Eigenschaften beschrieben werden.

Es zeigen

- Fig. 1: die Konstruktion eines rekombinanten Plasmids, das für eine solche Glukanase kodiert, und
 Fig. 2 bis 4: die Aktivitäten von Glukanasen aus *Bacillus amyloliquefaciens*, aus *Bacillus macerans* und der erfindungsgemäßen hybriden Glukanase H 1 bei verschiedenen Temperaturen und Aziditäten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Die Gene der beta-Glukanasen von *Bacillus amyloliquefaciens* und *Bacillus macerans* werden zunächst in bereits bekannter und vorbeschriebener Weise kloniert [12]; [13] und sequenziert [14]. Beide Glukanasen haben eine Homologie von etwa 70% auf der Ebene der deduzierten Aminosäuresequenz. Beide Gene sind in ihrem zentralen Teil sehr stark konserviert und haben in der gleichen Position eine unikale EcoRV-Schnittstelle.

Die Konstruktion eines zugehörigen rekombinanten Plasmids pUC-bglH1 ist in Fig. 1 erläutert. Aus einem rekombinanten Plasmid pEG 1 [12] wird zunächst ein EcoRI-EcoRV-DNS-Fragment isoliert, das regulatorische DNS-Sequenzen stromaufwärts von dem (Struktur-)Gen für die beta-Glukanase von *Bacillus amyloliquefaciens* enthält sowie weitere DNS-Sequenzen, die das Signalpeptid und die ersten 107 Aminosäuren am N-terminalen Ende der reifen (prozessierten) beta-Glukanase von *Bacillus amyloliquefaciens* kodieren.

Gleichzeitig wird aus einem Plasmid pUC13-Mac, das einem bekannten Plasmid pUC19/34 [13] analog ist und die gesamte genetische Information für das Gen der beta-Glukanase von *Bacillus macerans* enthält, ein EcoRV-EcoRI-DNS-Fragment entfernt, das neben regulatorischen DNS-Sequenzen stromaufwärts von dem Startkodon die genetische Information für das Signalpeptid und den N-terminalen Teil der prozessierten beta-Glukanase von *Bacillus macerans* besitzt. Daher verbleibt nur der C-terminale Teil des Gens der beta-Glukanase von *Bacillus macerans* auf dem nunmehr linearisierten Plasmid pUC-bglH1.

Beide DNS-Fragmente werden zusammen ligiert; danach werden ampicillinresistente Transformanten auf Licheninagar mit $50 \cdot 10^{-6} \text{ g/10}^{-3} \text{ l}$ Ampicillin selektiert. Es werden nur solche Transformanten ausgewählt, die auf Licheninagar Aktivität in der Bildung von beta-Glukanase aufweisen. Die Struktur des in dieser Weise gewonnenen hybriden Gens läßt sich durch Restriktions- und Sequenzanalyse bestätigen. Eine von einem derartigen hybriden Gen kodierte beta-Glukanase hat die erfindungsgemäß beanspruchte Aminosäuresequenz.

Das hybride Gen setzt sich im einzelnen aus den folgenden Bestandteilen zusammen:

- 1) einer regulatorischen DNS-Sequenz stromaufwärts von dem (Struktur-)Gen für die beta-Glukanase aus *Bacillus amyloliquefaciens*,
- 2) einer Signal-DNS-Sequenz dieser beta-Glukanase,
- 3) den N-terminalen Aminosäuren dieser beta-Glukanase bis zur Position 132,
- 4) den C-terminalen Aminosäuren der beta-Glukanase aus *Bacillus macerans* und
- 5) einem Stopkodon und terminatorischen DNS-Sequenzen stromabwärts dieser beta-Glukanase.

Die Bestimmung der Thermostabilität der *Bacillus*-beta-1,3-1,4-Glukanase H 1, isoliert aus den Zellextrakten von DH5-Zellen von *Escherichia coli*, die mit dem rekombinanten Plasmid pUC-bglH1 transformiert wurden, kann in der folgenden Weise durchgeführt werden.

Beta-Glukanase-haltige Zellextrakte werden in 50 mM Azetat-Puffer mit pH = 4,0 oder pH = 6,0 aufgenommen, dem 10 mM CaCl₂ zugeführt worden sind, und bei 65°C oder 70°C im Wasserbad inkubiert. Die Proben werden in zeitlichen Intervallen von 5 bis 10 min entnommen und sofort auf Eis gelagert. Dann kann die Aktivität aller Proben einschließlich einer nicht behandelten „Null“-Probe in bekannter Weise mit Azo-Barley-Glukan als Substrat bei 30°C bestimmt werden [15].

Die Ergebnisse eines Kontrollversuches sind in Fig. 2 bis 4 dargestellt. Es läßt sich zeigen, daß die erfindungsgemäße *Bacillus*-beta-1,3-1,4-Glukanase H 1 unter allen zu erwartenden und experimentell realisierbaren Bedingungen eine höhere Thermostabilität hat, als sie den beiden ursprünglichen Enzymen immanent ist.

Um die Aktivitäten der beta-Glukanasen bei den verschiedenen Aziditäten $pH = 4,6$ und $pH = 6,0$ miteinander zu vergleichen, wurden in einem weiteren Kontrollversuch die Zellextrakte in je 50 mM Azetat-Puffer mit den beiden pH -Werten aufgenommen und die Aktivität in gleicher Weise wie oben bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 1 zusammengefaßt; sie bedürfen keiner weiteren Erläuterung.

Tab. 1: Aktivität der beta-Glukanasen im Kontrollversuch in %

beta-Glukanase	$pH = 4,6$	$pH = 6,0$
beta-Glukanase aus <i>B. macerans</i>	10	100
beta-Glukanase aus <i>B. amyloliquefaciens</i>	12	100
hybride beta-Glukanase H 1	32	100

Literatur

- [1] Borriß, R./Schröder, K.-L., Zbl. Bakt. II. Abt. **136** (1981), S. 324–329
- [2] DD-Patentschrift 226012
- [3] Borriß, R./Zemek, J., Zbl. Bakt. II. Abt. **136** (1981), S. 63–69
- [4] Borriß, R., Biotechnology Weinheim **7 a**, S. 35–62
- [5] DD-Patentanmeldung WP C12 N/3157061
- [6] Imanaka, T. et al., Nature **324** (1986), S. 695
- [7] Argos, P. et al., Biochemistry **18** (1979), S. 5698
- [8] Europäische Patentanmeldung 252666
- [9] Streuli, M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **78** (1981), S. 2848–2852
- [10] Weck, P.K. et al., Nucl. Acids Res. **9** (1981), S. 6153
- [11] Weber, H./Weissmann, C., Nucl. Acids Res. **11** (1983), S. 5661
- [12] Borriß, R. et al., J. Appl. Microbiol. Biotechnol. **22** (1985), S. 63–71
- [13] Borriß, R. et al., J. Basic Microbiol. **28** (1988), S. 3–10
- [14] Hofemeister, J. et al., Gene **49** (1986), S. 177–187
- [15] McCleary, B.V., Proceedings of the 19th Convention of the Institute of Brewing (Australien and New Zealand Section), Hobart (1986)

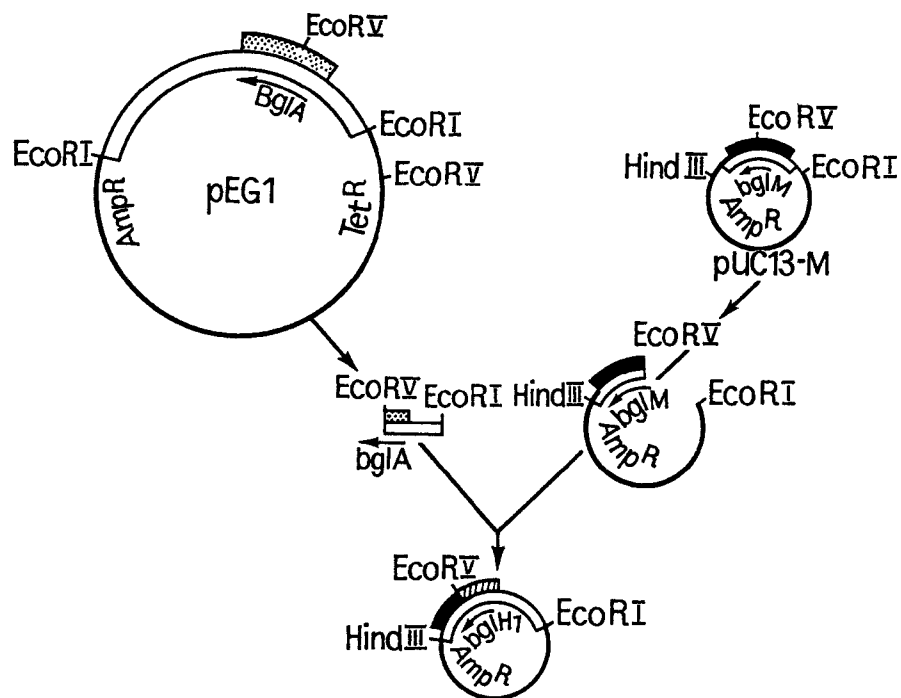


FIG.1

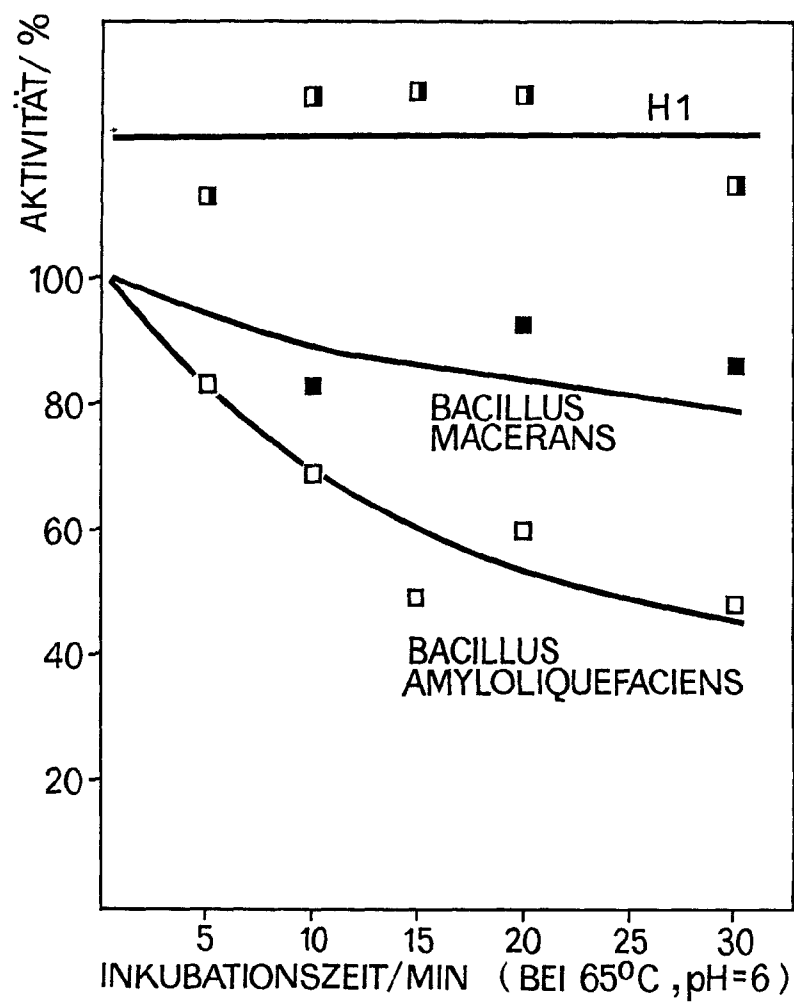


FIG. 2

-7-

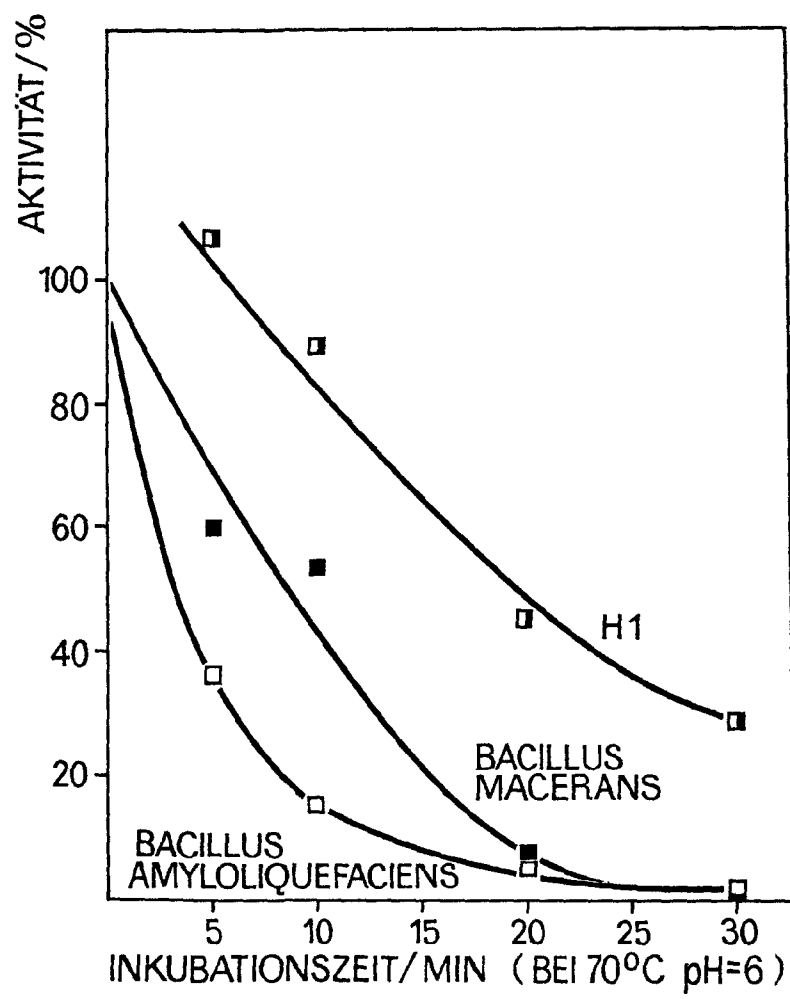


FIG. 3

-2-

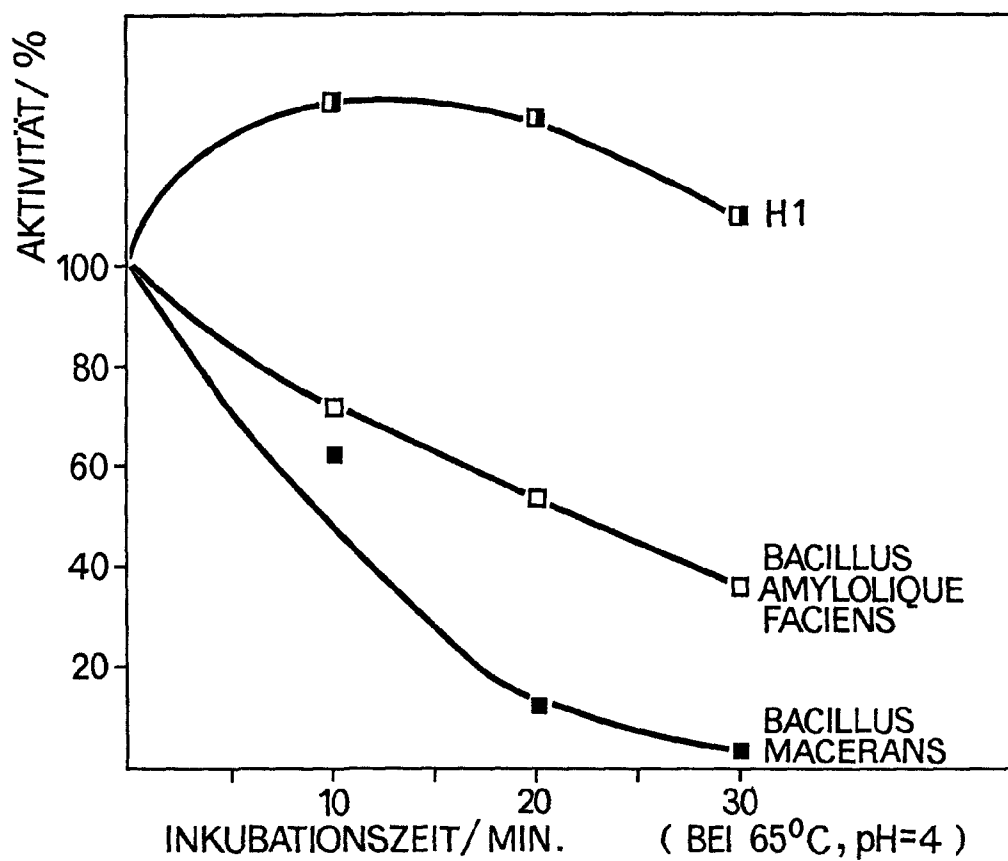


FIG. 4