(19) DANMARK

DIREKTORATET FOR
PATENT- OG VAREMÆRKEVÆSENET

(12) **FREMLÆGGELSESSKRIFT** (11) **150496 B**

(51) Int.Cl.⁴: **C 12 N 9/88**

(21) Patentansøgning nr.: **4570/85**

(22) Indleveringsdag: **08 okt 1985**

(24) Løbedag: **30 maj 1984**

(41) Alm. tilgængelig: **08 okt 1985**

(44) Fremlagt: **09 mar 1987**

(86) International ansøgning nr.: -

(62) Stamansøgning nr.: **2664/84**

(30) Prioritet: **03 jun 1983 DK 2524/83**

(71) Ansøger: **NOVO INDUSTRI A/S; Patent- og Varemærkeafdelingen, Novo Alle, 2880 Bagsværd, DK.**

(72) Opfinder: **Frank *Olsen; DK, Knud *Aunstrup; DK.**

(74) Fuldmægtig: -

(54) **Alpha-acetolactat-decarboxylase samt fremgangsmåde til fremstilling deraf**

(57) Sammendrag:

4570-85

En hidtil ukendt α-acetolactatdecarboxylase med forbedret stabilitet er tilvejebragt. Det nye enzym kan fremstilles i højt udbytte ved dyrkning af Bacillus licheniformis.

DK 150496 B

Opfindelsen angår en hidtil ukendt α-acetolactatdecarboxylase og en fremgangsmåde til dens fremstilling.

Ved fermenteringen af alkoholiske produkter, f.eks. øl eller vin, dannes der ofte små mængder diacetyl. Dannelsen af diacetyl er højst ufordelagtig p.g.a. dens stærke og ubehagelige lugt, og i tilfælde af øl har selv små mængder diacetyl på ca. 0,10 - 0,15 mg/liter en negativ indflydelse på øllets aroma og smag. Diacetyl i øl forårsages delvist af en infektion med en Pediococeus stamme, der direkte producerer diacetyl (E. Geiger, Diacetyl in Bier, Brauwelt 46, 1680 - 1692, 1980), og delvist af det faktum, at ølgær ud fra pyruvat danner α-acetolactat, der ved en ikke-enzymatisk, men temperaturafhængig reaktion omdannes til diacetyl. Under modningen af øl omdannes diacetyl til acetoin ved hjælp af reduktaser i gærcellerne. Acetoin er med hensyn til smag og aroma acceptabel i øl i meget højere koncentrationer end diacetyl.

En anden mulighed for at reducere diacetylmængden i øl er direkte at omdanne α-acetolactat til acetoin ved hjælp af acetolactatdecarboxylase, jfr. dansk fremlæggelsesskrift nr. 145.502. Acetolactatdecarboxylasen kan tilsættes under hovedfermenteringen af øllet eller under modningsprocessen.

Enzymet, der er et intracellulært enzym, udvindes ifølge den kendte teknik fortrinsvis fra mikroorganismen Klebsiella pneumonia (Juni E., J.Biol.Chem. 195, 715 - 726, 1952). Da Klebsiella pneumonia er en patogen mikroorganisme er den imidlertid ikke velegnet til industriel anvendelse. Den acetolactatdecarboxylase, der produceres af denne mikroorganisme, har desuden en dårlig stabilitet under betingelserne for dens påtænkte anvendelse, hvilket i tilfælde af øl er en pH-værdi på ca. 4,3 og en temperatur på ca. 10°C.

Formålet med den foreliggende opfindelse er at tilvejebringe et hidtil ukendt α-acetolactatdecarboxylaseenzym, der har en bedre stabilitet under de ovennævnte betingelser, og som yderligere kan udvindes fra ikke-patogene mikroorganismer i forbedret udbytte.

Opfindelsen er baseret på den overraskende erkendelse, at en hidtil ukendt acetolactatdecarboxylase med sådanne egenskaber fremstilles i høje udbytter af mikroorganismer, der hører til arten Bacillus licheniformis.

Det er i ovennævnte danske fremlæggelsesskrift nr. 145.502 antydet, at acetolactatspaltende enzymer kan fås fra andre kilder end Klebsiella pneumonia. Dette er imidlertid ikke dokumenteret, og det fremgår ikke af fremlæggelsesskriftet, at en α-acetolactatdecarboxylase med de fordelagtige egenskaber af enzymet ifølge den foreliggende opfindelse kan fremstilles i høje udbytter ud fra Bacillus licheniformis.

Ifølge sit første aspekt tilvejebringer den foreliggende opfindelse en hidtil ukendt, stabil α-acetolactatdecarboxylase, der er ejendommelig ved, at den har et pH-optimum i området fra 5 til 6 og er identisk med den α-acetolactatdecarboxylase, der dannes ved dyrkning af Bacillus licheniformis ATCC 12759, ATCC 12713, ATCC 11946, ATCC 27326, NRRL B-3751, NCTC 2120, NCTC 8721, NCIB 6816, NCIB 8537 eller NCIB 11868 i et egnet næringsmedium, der indeholder carbon- og nitrogenkilder og uorganiske salte.

Alpha-acetolactatdecarboxylasen kan være i fast eller flydende form og har sædvanligvis i fast form en aktivitet i området fra 0,1 til 10 NE (som defineret i det følgende) per mg protein.

Ifølge et yderligere aspekt tilvejebringer den foreliggende opfindelse en fremgangsmåde til fremstillingen af denne α-acetolactatdecarboxylase, hvilken fremgangsmåde er ejendommelig ved, at den omfatter dyrkning af en α-acetolactatdecarboxylase-producerende Bacillus licheniformis-stamme i et egnet næringsmedium, der indeholder carbon- og nitrogenkilder og uorganiske salte, hvorpå α-acetolactatdecarboxylasen udvindes fra cellerne i kulturvæsken.

Ifølge en foretrukket udførelsesform for fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse vælges Bacillus licheniformis-stamme fra gruppen bestående af ATCC 12759, ATCC 12713, ATCC 11946, ATCC 27326, NRRL B-3751, NCTC 2120, NCTC 8721, NCIB 6816, NCIB 8537 og NCIB 11868 eller

mutanter og varianter heraf med væsentligt de samme egenskaber.

Ifølge en yderligere foretrukket udførelsesform for fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse omfatter næringsmediet en nitrogenkilde, hvis indhold af frie aminosyrer ikke undertrykker dannelsen af α-acetolactatdecarboxylasen, og der anvendes fortrinsvis en uorganisk nitrogenkilde.

Mikroorganismer, der er i stand til at producere α-acetolactatdecarboxylaseenzymet ifølge opfindelsen, blev udvalgt på grundlag af deres evne til at omdanne α-acetolactat til acetoin, som derpå påvises.

Mere end 300 Bacillus stammer er blevet undersøgt ifølge den følgende procedure:

Stammerne blev dyrket i rystekolber ved 30°C og 37°C i 24 timer på følgende BCM-substrat:

K_2HPO_4	1	g
$NaH_2PO_4, 2H_2O$	1	g
$(NH_4)_2SO_4$	2,5	g
NaCl	0,25	g
$MgSO_4,7H_2O$	0,2	g
$FeCl_3,6H_2O$	0,04	g
$MnSO_4,H_2O$	0,25	mg
Glucose	10	g
Gærekstrakt	3	g
Vand op til	1000	g

Efter dyrkning blev cellerne høstet ved centrifugering, vasket i 0,03 M phosphat/citratpuffer (pH 6,0) og resuspenderet i samme puffer indtil OD(450)~40. Prøver på 2 ml blev derpå underkastet en ultralydbehandling eller en behandling med 1 mg lysozym per ml ved 37°C i 30 min. og blev derpå centrifugeret.

Alpha-acetolactatdecarboxylaseaktiviteten af supernatanterne blev bestemt ifølge proceduren beskrevet i det følgende.

Screeningsproceduren afslørede, at kun et fåtal af de ca. 300 undersøgte mikroorganismer producerer α-acetolactatdecarboxylase i målelige mængder. Disse mikroorganismer

er opstillet i den følgende tabel I sammen med enzymaktiviteten bestemt ifølge ovennævnte procedure.

Tabel I

Resultat af screeningsproceduren

Stamme	Stamme (NOVOsamling nr.)	Aktivitet (NE) pr. mg protein	Protein mg/ml
B. brevis	A 303	0,13	4
B. coagulans	A 345	0,007	3
B. pumilus	A 185	0,008	2
B. pumilus	A 328	0,011	3
B. pumilus	A 329	0,004	2
B. subtilis	A 518	0,005	3
B. subtilis	C 601	0,06	1
B. licheniformis	A 446	0,11	3
B. licheniformis	C 600	0,19	2
B. licheniformis	A 88	0,15	2
B. licheniformis	A 105	0,13	2
B. licheniformis	A 106	0,15	2
B. licheniformis	A 200	0,15	2
B. licheniformis	A 203	0,25	2
B. licheniformis	A 244	0,11	2
B. licheniformis	A 248	0,14	2
B. licheniformis	A 1240	0,13	2

Stammerne C 600 og C 601 er blevet deponeret af ansøgerne ved National Collection of Industrial Bacteria, Torry Research Station, Aberdeen, Scotland den 27. maj 1983 og fik referencenumrene NCIB 11868 og NCIB 11869.

De resterende stammer blev opnået fra forskellige kultursamlinger, som det fremgår af følgende liste:

NOVO nr.	Deponeringsnr.		
A 303	ATCC	11031	
A 345	NRS	83	
A 185	ATCC	71	
A 328	ATCC	4520	(B. Mesentericus var flavus)
A 329	ATCC	7065	
A 518	IAM	1109	(B. natto)
A 446	NRRL	B-3751	(Bestemt af ansøgerne til at være en B. licheniformis)
A 88	ATCC	12759	
A 105	ATCC	12713	= NRRL B-1001
A 106	ATCC	11946	
A 200	NCIB	6816	
A 203	NCIB	8537	
A 244	NCTC	2120	
A 248	NCTC	8721	
A 1240	ATCC	27326	

Ifølge den kendte teknik (Juni E., ibid.) er cellefri ekstrakter af Bacillus subtilis i stand til at decarboxylere α-acetolactat til dannelse af acetoin. Den kendte teknik beskriver imidlertid ikke anvendelsen af sådanne ekstrakter. Opfinderne har undersøgt 69 forskellige Bacillus subtilis-stammer. Af disse udviste kun 5 α-acetolactatdecarboxylaseaktivitet, og disse 5 stammer var desuden meget dårlige enzymproducenter. Bacillus coagulans og Bacillus pumilus-stammer viste sig også at være for dårlige enzymproducenter til industriel anvendelse.

Af de undersøgte Bacillus licheniformis-stammer producerede 13 ikke α-acetolactatdecarboxylase i målelige mængder, 21 stammer producerede enzymet i meget lave mængder, og 11 stammer producerede enzymet i høje mængder. Ved tandemkrydset immunoelektroforese viste det sig, at alle de nævnte Bacillus licheniformis-stammer producerer et α-acetolactatdecarboxylaseenzym, der er immunologisk identisk med det enzym, der produceres af Bacillus licheniformis-stamme C 600.

Bacillus brevis-stammerne blev dyrket på tre forskellige medier i rystekolber. Kun én stamme, A 303 (ATCC 11031) udviste α-acetolactatdecarboxylaseaktivitet på alle tre medier. De resterende 11 stammer udviste ikke α-acetolactatdecarboxylaseaktivitet i målelige mængder på nogen af de tre anvendte medier. α-acetolactatdecarboxylaseenzymet

produceret af Bacillus brevis A 303 viste sig, m.h.t. immumokemiske egenskaber, at være ikke-identisk med det enzym, der produceres af Bacillus licheniformis-stammen C 600. Det faktum, at α-acetolactatdecarboxylaseenzymerne fra de forskellige Bacillus licheniformis-stammer udviser immunokemisk identitet, giver imidlertid grund til at tro, at andre α-acetolactatdecarboxylase-producerende Bacillus brevis-stammer end de undersøgte vil producere essentielt det samme enzym som Bacillus brevis A 303. Med hensyn til "immunokemisk identitet" henvises der til N.H. Axelsen et al., "A Manual of Quantitative Immunoelectrophoresis" (Oslo 1973) kapitel 10.

Bacillus brevis-stammen adskiller sig fra Bacillus licheniformis, idet α-acetolactatdecarboxylasen fra Bacillus brevis dannes uden uønskede bi-aktiviteter, især ferrulinsyredecarboxylaseaktivitet, der produceres af alle de undersøgte Bacillus licheniformis-stammer. Ferrulinsyredecarboxylase decarboxylerer ferrulinsyre, som findes i gærende øl, til den meget ilde smagende forbindelse 4-vinylguajacol. Ferrulinsyredecarboxylase må derfor fjernes fra dyrkningsmediet fra Bacillus licheniformis under oparbejdningsproceduren.

Bacillus brevis-stamen adskiller sig desuden Bacillus licheniformis, fordi Bacillus brevis producerer et enzym, der omdanner de normale precursorer for 2,3-pentandion i øl til 3-hydroxy-2-pentanon, hvorved mængden af dårligt smagende pentandioner formindskes til et akceptabelt lavt niveau. Bacillus licheniformis-stammer producerer ikke et sådant enzym.

En NOVO enhed (NE) er defineret som den mængde enzym, der producerer et µmol acetoin pr. minut ved 20°C og pH 6.0 (0.03 molær citrat/phosphatpuffer) ved inkubering af en enzymholdig forsøgsprøve med et α-acetolactatsubstrat i følgende assay:

Substrat

Alpha-acetolactatsubstratet blev fremstillet umiddelbart før anvendelsen ved hydrolyse af α-acetoxy-α-methyl-aceto-eddikesyreethylester. 30 µl af diesteren (0,165

m mol), 240 µl vand og 330 µl 1 M NaOH blev blandet og opbevaret på is i 15 minutter. Derpå blev der tilsat 5,4 ml vand, og det opnåede hydrolysat blev anvendt til prøven.

Assay

Puffer og forsøgsprøve med en enzymaktivitet på ca. 0,006 - 0,3 NE blev blandet og tempereret ved 20°C i nogle få minutter (rumfang 10,0 ml). Ved t = 0 blev der tilsat 400 µl hydrolysat, og prøver på 1 ml blev udtaget ved t = 3, 6, 9, 20 og 50 minutter. Enzymreaktionen blev stoppet ved at anbringe prøverne på is og tilsætning af 200 µl 1M NaOH.

Den dannede mængde acetoin måles ifølge W.W. Westerfeld (A Colorimetric Determination of Blood Acetoin, J.Biol.Chem. 161, 495 - 502, 1945) ved tilsætning af 0,2 ml 0,5% creatin og 0,2 ml 5% α-naphthol i 2,5 N NaOH (frisk fremstillet) til 1,2 ml af de ovennævnte prøver. Efter 60 minutters reaktionstid blev E(524) målt. Som blindprøve blev der anvendt puffer i stedet for celleekstrakt. En standardkurve aftegnes med 0, 0,5, 2 og 4 µg/ml acetoin.

En Bacillus-stamme, der er i stand til at fremstille α-acetolactatdecarboxylaseenzymet ifølge den foreliggende opfindelse, propageres sædvanligvis i et egnet fast næringsmedium ved ca. 30°C, før den dyrkes under aerobe betingelser i et egnet dyrkningsmedium. Dyrkningsmediet indeholder assimilerbare carbonkilder (f.eks. glucose) og en basal saltblanding omfattende f.eks. ammoniumsulphat som nitrogenkilde. Det er essentielt for at opnå høje udbytter, at dyrkningsmediet, når der anvendes Bacillus licheniformis-stammer, ikke indeholder overskud af frie aminosyrer, der kan undertrykke α-acetolactatdecarboxylaseproduktionen. Dyrkningen udføres ved ca. 30°C og ved pH ca. 7, der holdes omtrent konstant ved hjælp af automatiske hjælpemidler. Beluftning og omrøring justeres til opnåelse af et positivt oxygentryk. Efter dyrkningen høstes cellerne ved centrifugering og vask i en egnet puffer. Cellerne lyseres ved ultralydbehandling, behandling med en French presse, lysozymbehandling, Manton-Gaulin-behandling eller en kombination heraf.

Efter centrifugering opnås en rå ekstrakt, der kan underkastes et yderligere oprensningstrin som beskrevet i det følgende.

Alpha-acetolactatdecarboxylaseenzymet ifølge den foreliggende opfindelse kan oprenses fra den rå ekstrakt ved en kombination af et eller flere af følgende trin:

a) ammoniumsulphatudfældning
b) polyethylenglycoludfældning
c) DE 52-anionbytterchromatografi og dialyse,
d) syrefældning og dialyse,
e) hydroxyapatitchromatografi og dialyse
f) lyophilisering.
g) phenyl-sepharose chromatografi
h) chromatofocusering

Oprensningen af α-acetolactatdecarboxylasen fremstillet ved dyrkning af en Bacillus licheniformis-stamme C 600 dyrket som beskrevet i eksempel 1, blev udført på følgende måde:

94 g celler (våd vægt) blev suspenderet i 20 mM K-phosphatpuffer pH 6,8 og lysozymbehandlet i 30 minutter med 1 mg/ml lysozym ved 37°C og derpå behandlet med ultralyd i en Branson sonifier B 12. Efter centrifugering blev supernatanten påført en DE 52 anionbytterkolonne, hvorved enzymet blev fuldstændig adsorberet. Kolonnen blev vasket med 20 mM kaliumphosphatpuffer (pH 6,8) og elueret med en kaliumphosphatgradient (20 mM - 500 mM) pH 6,8. Fraktionerne blev analyseret for enzymaktivitet som beskrevet ovenfor. De aktivitetsholdige fraktioner blev samlet.

De samlede fraktioner blev syrefældet ved tilsætning af phosphorsyre indtil en pH-værdi på 4,5. Efter centrifugering blev supernatanten dialyseret mod 20 mM kaliumphosphat pH 6,8. Dialysatet blev påført en hydroxyapatit (HA)kolonne, der efter vask med kaliumphosphatpuffer pH 6,8 blev elueret med en kaliumphosphatgradient som ovenfor.

De fraktioner, der udviste enzymaktivitet, blev samlet og dialyseret natten over mod 20 mM kaliumphosphat pH 6,8. Derpå blev dialysatet lyophiliseret. Enzymaktivitet og udbytte fremgår af følgende tabel:

Tabel II

Oprensning af 94 g (våd vægt) celler fra dyrkning af stamme C 600

Fraktion	Volumen ml	Protein mg	NE pr ml	NE total	NE pr mg protein	Oprens-nings-faktor	Udbytte %
Rå ekstrakt	360	12168	0,838	302	0,025	1	100
Pool efter DE 52	270	3510	1,43	386	0,110	4,4	128
Pool efter syrefældning	300	810	1,450	435	0,537	21,5	144
Efter dialyse	300	660	1,236	371	0,562	22,5	123
Pool efter HA-chromatografi	225	491	1,226	276	0,562	22,5	91
Efter dialyse	245	488	1,184	290	0,594	23,8	96
Pulver	1,08 g	389		315	0,810	32,4	104

150496

Sammenhængen mellem aktivitet af Bacillus licheniformis-α-acetolactatdecarboxylaseenzymet ifølge opfindelsen og pH blev bestemt på ekstrakter af Bacillus licheniformis-stammer A 446 og C 600 ved forskellige pH-værdier i 0,03 M citrat/phosphatpuffer ved 20°C ved hjælp af metoden til bestemmelse af α-acetolactatdecarboxylaseaktivitet beskrevet ovenfor.

Opfindelsen skal beskrives nærmere under henvisning til tegningen, på hvilken fig. 1 og fig. 2 grafisk illustrerer den relative aktivitet afbildet mod pH for α-acetolactatdecarboxylaseenzymet fremstillet henholdsvis fra stammerne A 446 og C 600. pH-optimet blev fundet til at ligge i området fra 5 til 6.

Stabiliteten af de rå ekstrakter af Bacillus licheniformis-enzymet blev undersøgt under anvendelsesbetingelserne, d.v.s. ved 10°C og i fermenteret, men ikke modnet øl. Stabiliteten fremgår af følgende tabel.

Tabel III

Stabilitetstest

Stamme	Halveringstid i dage
A 446	21
C 600	15
A 446	11,5 (bestemt i fermenterende øl)

Da Klebsiella pneumonia-enzymet har en halveringstid på kun 2 - 3 timer udviser enzymet ifølge den foreliggende opfindelse en betydelig forbedret stabilitet under anvendelsesbetingelserne for ølbrygning i forhold til det kendte enzym.

pI-bestemmelse

pI blev bestemt på en rå ekstrakt af stammen A 446 ved tyndtlagsgelelektroforese til at være ca. 4,7.

Immunologiske egenskaber

En oprenset fraktion af α-acetolactatdecarboxylasen fra Bacillus licheniformis stamme C 600 blev anvendt til at immunisere kaniner ifølge proceduren beskrevet af Harboe og Ingild i: N.H. Axelsen: Handbook of Immunoprecipitation-in-Gel Techniques, Blackwell Scientific Publications. London 1983.

Det antistof, der blev produceret på denne måde imod Bacillus licheniformis-enzymet, blev anvendt til at udføre krydset immunoelektroforese og tandemkrydset immunoelektroforese som beskrevet af A.O. Grubb og J. Krøll, i den ovennævnte publikation.

Da antigenet er inhomogent, er det dannede antistof polyspecifikt og producerer op til 15 bånd ved krydset immunoelektrophorese, af hvilket ét er α-acetolactatdecarboxylaseudfældningsbåndet. For at identificere dette bånd blev der anvendt en overlægningsteknik baseret på enzymaktiviteten: efter immunoelektroforesen blev pladen ikke fikseret og farvet som sædvanlig, men blev inkuberet i 5 minutter i 30 ml af den følgende blanding i låget af en petriskål med en diameter på 14 cm:
150 µl ethyl-2-acetoxy-2-methyl-acetoacetat, 1200 µl H_2O og 1650 µl 1N NaOH blev blandet og inkuberet ved stuetemperatur i 15 minutter. Derpå blev der fyldt op med vand til 30 ml.

Efter inkubering fik blandingen lov til at dryppe af fra pladen, som blev vredet i en Vita-Wrap plastfolie og i aluminiumfolie og inkuberet i 30 minutter ved stuetemperatur.

Pladen blev derpå anbragt i låget af en petriskål med en diameter på 14 cm og dækket med følgende blanding:

30 ml 2% LSA-agarose (H_2O)
3 ml 1% kreatin (H_2O)
6 ml 5% naphten i 2,5 N NaOH
(blandet ved 55°C)

Den overdækkede plade blev inkuberet ved stuetemperatur i ca. 1 time. Båndet med α-acetolactatdecarboxylaseudfældningen viste en rød farve og kunne identificeres.

Som nævnt ovenfor viste tandemkrydset immunoelektroforese af enzymet fra alle de omtalte Bacillus licheniformis-stammer mod C 600 α-acetolactatdecarboxylase-antistof, at Bacillus licheniformisenzymerne er immunokemisk identiske, medens α-acetolactatdecarboxylasen fra Bacillus brevis ikke krydsbinder med C 600 α-acetolactatdecarboxylaseantistoffet, hvilket viser, at Bacillus licheniformis- og Bacillus brevis-stammerne producerer forskellige typer af α-acetolactatdecarboxylaseenzymet.

Opfindelsen skal forklares nærmere ved hjælp af de efterfølgende eksempler.

Eksempel 1

Stammen A 446 (B. licheniformis, NRRL B-3751) blev propageret på et TY-medium i rystekolber ved 30°C indtil OD(450) 6.

TY-medium:

Trypticase	20 g
Gærekstrakt	5 g
$FeCl_3,6H_2O$	7 mg
$MnCl_2,4H_2O$	1 mg
$MgSO_4,7H_2O$	15 mg

Destilleret vand op til 1000 ml

100 ml af rystekolbekulturen blev overført til en 1,5 liter Kieler-gæringstank indeholdende et uorganisk saltmedium, der pr liter indeholder:

$CaCl_2,2H_2O$	0,5 g
$MgSO_4,7H_2O$	0,5 g
KH_2PO_4	4,0 g
$(NH_4)_2SO_4$	22 g
Spormetalopl.*	3 ml
Pluronic	1 ml
Glucose	150 g

*Spormetalopl.:

H_3BO_3	500 mg/100 ml
$CuSO_4$, $5H_2O$	63 mg/100 ml
KI	100 mg/100 ml
$FeCl_3,6H_2O$	333 mg/100 ml
$MnSO_4,H_2O$	448 mg/100 ml
$NaMoO_4,2H_2O$	200 mg/100 ml
$ZnSO_4,7H_2O$	712 mg/100 ml

Under dyrkningen blev pH-værdien holdt ved 7,0 ved tilsætning af NaOH. Temperaturen var 30°C, og beluftningen og omrøring blev indstillet til opnåelse af et positivt oxygentryk.

Cellerne blev høstet ved centrifugering efter en celletæthed svarende til OD(450) på 34 var nået.

Gæringsforløbet fremgår af følgende tabel VI.

Tabel VI

Aktivitet målt under gæringen

Gæringstid i timer	NE/ml kultur	OD(450)
0	0	1,35
5	0	1,69
21	0,022	19
24	0,076	28
28	0,440	34

Eksempel 2

Bacillus licheniformis-stamme A 446 blev propageret og dyrket som beskrevet i eksempel 1 med den undtagelse, at gæringsmediet indeholdt 180 g glucose, og at cellerne blev høstet, når der var nået en celletæthed svarende til OD(450) på 47.

112 g celler (våd vægt) blev suspenderet i 20 mM K-phosphatpuffer pH 6,8, og blev lysozymbehandlet i 30 minutter med 1 mg/ml lysozym ved 37°C. De lyserede celler blev underkastet en ultralydbehandling i en Branson sonifier B 12. Ammoniumsulfat blev tilsat til den opnåede rå ekstrakt indtil en mætning på 25%, og blandingen blev anbragt på is i 30 minutter.

Efter centrifugering fandtes aktiviteten i supernatanten.

Ammoniumsulphat blev sat til supernatanten indtil 70%'mætning, og blandingen blev anbragt på is i 30 minutter. Efter centrifugering fandtes aktiviteten i bundfaldet.

Bundfaldet blev suspenderet i 20 mM K-phosphat pH 6,8, og derpå blev der tilsat 200 mg/ml polyethylenglycol (MW 6000). Blandingen blev henstillet i 30 minutter ved stuetemperatur. Aktiviteten fandtes i supernatanten efter centrifugering.

Proteinindholdet i supernatanten blev adsorberet på en Whatman DE 52 anionbytter, der var blevet vasket med 20 mM K-phosphatpuffer pH 6,8, og blev derpå elueret med en K-phosphatpuffer gradient (20 mM - 500 mM) pH 6,8. De fraktioner, der indeholdt enzymaktivitet, blev blandet og dialyseret mod 20 mM K-phosphatpuffer pH 6,8. Til slut blev dialysatet lyophiliseret. Forløbet af oprensningsproceduren fremgår af den efterfølgende tabel VII.

Tabel VII

Fraktion	Volumen ml	Protein mg	NE pr. ml	NE total	NE pr. mg protein	Oprens-nings-faktor	Udbytte % (til-syneladende)
Rå ekstrakt før centri-fugering	460	14536	0,496	228	0,016	1	100
Supernatant efter første ammoniumsul-phat-udfæld-ning	460	12190	1,053	484	0,040	2,5	212
Resuspenderet bundfald efter anden ammonium-sulfat-udfæld-ning	460	11638	1,487	684	0,059	3,7	300
Supernatant efter PEG-6000 fældning	550	5753	1,301	716	0,124	7,8	315
Pool efter DE 52 chrom.	240	1392	0,955	229	0,165	10,3	100
Pool efter dialyse	250	1275	0,934	234	0,183	11,4	103
Pulver	2,1	1218		176	0,144	9,0	77

PATENTKRAV

1. Alpha-acetolactatdecarboxylase k e n d e t e g n e t ved, at den har et pH-optimum i området fra 5 til 6 og er identisk med den alpha-acetolactatdecarboxylase, der dannes ved dyrkning af Bacillus licheniformis ATCC 12759, ATCC 12713, ATCC 11946, ATCC 27326, NRRL B-3751, NCTC 2120, NCTC 8721, NCIB 6816, NCIB 8537 eller NCIB 11868 i et egnet næringsmedium, der indeholder carbon- og nitrogenkilder og uorganiske salte.

2. Fremgangsmåde til fremstilling af alpha-acetolactatdecarboxylasen ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at en α-acetolactatdecarboxylaseproducerende Bacillus licheniformis-stamme dyrkes i et egnet næringsmedium, der indeholder carbon- og nitrogenkilder og uorganiske salte, hvorpå alpha-acetolactatdecarboxylasen udvindes fra cellerne i kulturvæsken.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at Bacillus licheniformis-stammen vælges fra gruppen bestående af ATCC 12759, ATCC 12713, ATCC 11946, ATCC 27326, NRRL B-3751, NCTC 2120, NCTC 8721, NCIB 6816, NCIB 8537 og NCIB 11868 eller mutanter og varianter heraf med væsentlig de samme egenskaber.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 2-3, k e n d e t e g n e t ved, at næringsmediet omfatter en nitrogenkilde, hvis indhold af frie aminosyrer ikke undertrykker dannelsen af alpha-acetolactatdecarboxylasen.

5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t ved, at nitrogenkilden er en uorganisk nitrogenkilde.

Fremdragne publikationer:

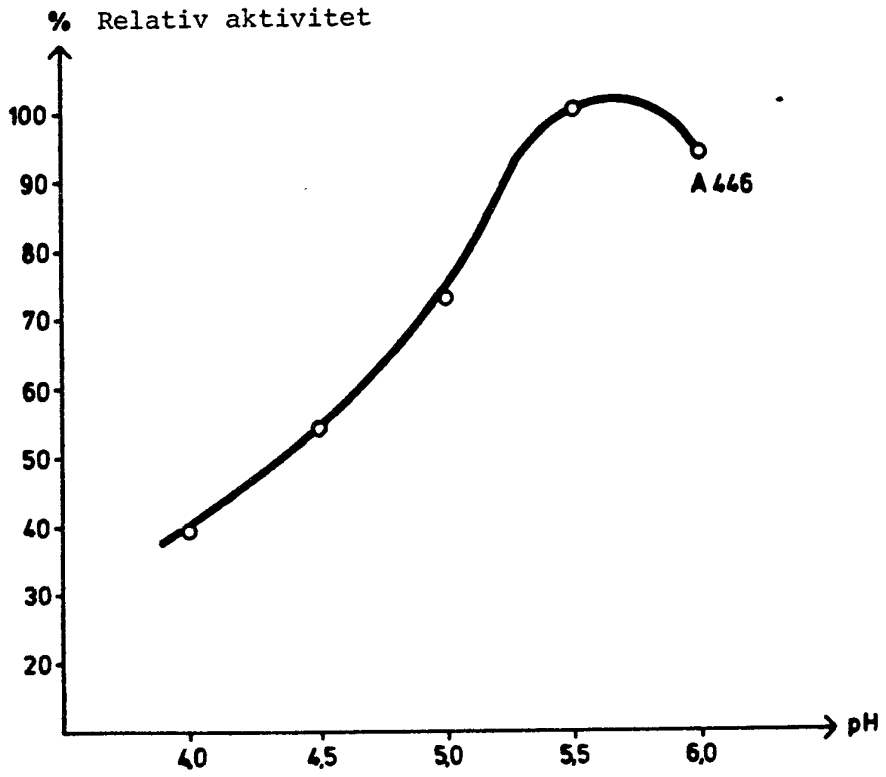

% Relativ aktivitet
100
90
80
70
60
50
40
30
20
A 446
pH
4,0
4,5
5,0
5,5
6,0

Fig. 1

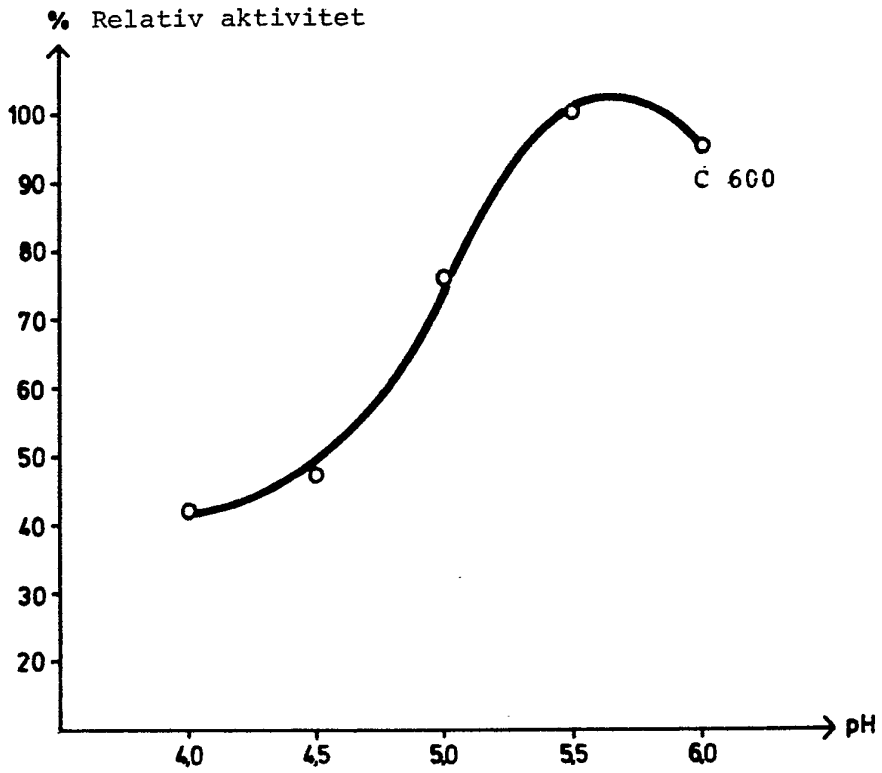

% Relativ aktivitet
100
90
80
70
60
50
40
30
20
C 600
pH
4,0
4,5
5,0
5,5
6,0

Fig. 2