



SUOMI—FINLAND

(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

**[B] (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLÄGGNINGSSKRIFT 58157**

C (45) Patentti myönnetty 10.10.1980
Patent beviljad

(51) Kv.lk.³/Int.Cl.³ C 12 N 9/28, C 07 G 7/00

(21) Patentihakemus — Patentansökan	771240
(22) Hakemispäivä — Ansökningsdag	19.04.77
(23) Alkuperäisyys — Giltighetsdag	19.04.77
(41) Tulut julkaistuihin — Blivit offentlig	20.10.77
(44) Nähtävölkäipanon ja kuul.julkaisun pvm. — Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	29.08.80
(32)(33)(31) Pyydetty etuoikeus — Begärd prioritet	19.04.76

02.02.77 USA(US) 678513, 764923

- (71) CPC International Inc., International Plaza, Englewood Cliffs,
New Jersey 07632, USA(US)
- (72) Masaki Tamura, Yokosuka-shi, Kanagawa Pref., Mutsuo Kanno, Iruma-gun,
Saitama Pref., Yoshiko Ishii, Tokyo, Japani-Japan(JP)
- (74) Oy Kolster Ab
- (54) Lämmön- ja haponkestävä alfa-amylaasi-entsyymi ja menetelmä sen valmistamiseksi - Värme- och syrastabilt alfa-amylasenzym och förfarande för dess framställning

Tämä keksintö koskee uutta lämpöä ja happoja kestäväää alfa-amylaasi-entsyymiä ja menetelmää sen valmistamiseksi.

Alfa-amylaasi-entsyymi-valmisteita käytetään hydrolysoimaan, nesteyttämään ja/tai muuttamaan tärkkelyspitoisia aineita tärkkelys-hydrolysaateiksi; niitä käytetään myös pesuainekoostumuksissa. Alfa-amylaasi-entsyymejä käytetään tärkkelyspitoisten aineiden käsittelyyn monien tärkkelyshydrolysaattien, kuten malto-dekstriinien, maissisiirapin, dekstroosin, levuloosin, ja maltoosin valmistuksessa. Alfa-amylaasi-entsyymi hydrolysoi tärkkelysmolekyyliä pilkkoen ne erilaisiksi molekyylipainoltaan keskikokoisiksi fragmenteiksi, joista käytetään nimitystä malto-dekstriinit. Maltodekstriinejä käsitellään sen jälkeen yhdellä tai useammalla muulla entsyymivalmisteella, esim. glukosamylaasilla, beta-amylaasilla ja/tai glukosiisomeraasilla, halutun lopputuotteen saamiseksi. Vaihtoehtoisesti monia tällaisia entsyymivalmisteita voidaan lisätä samanaikaisesti tärkkelys-raaka-ainelietteeseen, jotta saataisiin suoraan haluttua tärkkelyshydrolysaattia.

Alfa-amylaasi-entsyymejä saadaan hyvin erilaisista lähteistä. Suurin osa alfa-amylaasi-entsyymeistä valmistetaan bakteerien, kuten lajien *Bacillus subtilis*,

Bacillus licheniformis, *Bacillus stearothermophilus* tuottamina, joita viljellään sopivassa viljelyliemessä, minkä jälkeen tuotetut solut hajotetaan ja entsyymi-valmiste erotetaan viljelyliemestä ja puhdistetaan.

Monet nykyisin tuotetuista kaupan olevista alfa-amylaasi-entsyymeistä on saatu *Bacillus subtilis*-mikro-organismiviljelmistä. Kun näitä entsyymejä käytetään muuttamaan tärkkelys tärkkelyshydrolysaatiksi, niin optimilämpötila on yleensä noin 80°-85°C, ja optimi-pH noin 6,0. Entsyymien tehokkaan käytön kannalta näillä lämpötila- ja pH-olosuhteilla on kaksi varjopuolta. Ensimmäkin jos tärkkelys muutetaan entsyymien avulla pH:n ollessa noin 6 ja lämpötilan ollessa noin 80°-85°C, osa tärkkelyksen pelkistävästä pääteryhmistä isomeroituu ja seuraavassa konversioprosessissa muodostuu maltuloosia, joka pienentää halutun tuotteen, esim. dekstroosin, levuloosin tai maltoosin saantoa. Toiseksi konversiossa ja sokeriksi muuttamisprosessissa käytettävän glukoamylaasin optimi-pH on tavallisesti noin 4,5 kun kyseessä ovat *Aspergillus niger*-tyyppiset entsyymit, ja noin 5,0 kun kyseessä ovat *Rhizopus*-tyyppiset entsyymit. Sen vuoksi nesteyttämisvaiheen päätyttyä käytettäessä alfa-amylaasi-entsyymiä, pH on säädettävä välille noin 6-4,5 tai 5,0. Tämä pH:n säätö lisää ionikonsentraatiota ja käytettäessä ionivaihtajahartseja lopputuotteen puhdistuksessa puhdistuskulut kasvavat.

Viime vuosina on kehitetty erilaisia lämpöä kestäviä alfa-amylaasi-entsyymejä. Esimerkkejä tällaisista lämpöä kestävästä alfa-amylaasi-entsyymeistä ovat entsyymit, joita on tuotettu mikro-organismien *Bacillus stearothermophilus* kannoilla [Ōgasawara et al., J. Biol. Chem., 67, 65, 77 ja 83 (1970); G.B. Manning ja L.L. Campbell, J. Biol. Chem., 236, 2952, 2958 ja 2962 (1961); S.L. Pfueffer ja W.H. Elliot, J. Biochem., 244, 48 (1969)]. Äskettäin on markkinoille ilmestynyt tavaramerkillä Thermamyl[®] alfa-amylaasi-entsyymejä, joita valmistaa Novo Industri A/S ja joiden lämmönkestävyys on hyvä neutraaleissa tai heikosti alkalisisissa liuoksissa. Niitä valmistetaan viljelemällä lajia *Bacillus licheniformis*, kuten on selostettu julkaisuissa GB-patenttijulkaisussa n:o 1 296 839, Die Stärke, 25, 304, 305 ja 308 (1973) ja Shigemasa Saito, ABB, 155, 290 (1973). Vaikkakin lajista *Bacillus licheniformis* peräisin olevat alfa-amylaasi-entsyymit ovat suhteellisen hyvin lämpöä kestäviä neutraaleissa ja heikosti alkalisisissa liuoksissa, niin niiden stabiilisuus ei ole käytön taloudellisuuden kannalta riittävä happamissa olosuhteissa.

Keksinnön kohteena on siten alfa-amylaasi-entsyymi, jonka lämmönkestävyys ja stabiilisuus happamissa olosuhteissa on hyvä, ja jota voidaan käyttää olosuhteissa, joita voidaan verrata muiden amylaasien, kuten esimerkiksi glukoamylaasin käyttöolosuhteisiin.

Keksinnön mukaiselle alfa-amylaasi-entsyymille on tunnusomaista, että se on valmistettu viljelemällä mikro-organismien *Bacillus stearothermophilus* kantaa ATCC 31 199 ja että sillä on seuraavat ominaisuudet:

(1) molekyylipaino määritettynä natriumdodekyylisulfaatti-levy-elektroforeesilla on noin 90 000 - 100 000;

(2) sen alkuperäisestä alfa-amylaasi-aktiivisuudesta on jäljellä vähintään n. 70 % 10 minuutin kuumennuksen jälkeen 90°C:ssa pH-arvossa 6,0 ilman kalsiumioni-lisäystä;

(3) sen alkuperäisestä alfa-amylaasi-aktiivisuudesta on jäljellä vähintään noin 50 % 30 minuutin kuumennuksen jälkeen 85°C:ssa pH-arvossa 4,5 väliaineessa, jonka kalsium-ionipitoisuus on 0,005-m ja tärkkelyspitoisuus 22,5 paino-%;

(4) sen alkuperäisestä alfa-amylaasi-aktiivisuudesta on jäljellä vähintään noin 50 % 60 minuutin kuumennuksen jälkeen 90°C:ssa pH-arvossa 6,0 ilman kalsiumionilisäystä; ja

(5) sen alkuperäisestä alfa-amylaasi-aktiivisuudesta on jäljellä vähintään noin 50 % 10 minuutin kuumennuksen jälkeen 80°C:ssa pH-arvossa 4,5 väliaineessa, jonka kalsium-ionipitoisuus on 0,005-m.

Keksinnön mukaiselle alfa-amylaasi-entsyymille on myös ominaista, että sillä ei esiinny oleellista proteaasi-aktiivisuutta, esimerkiksi sen proteaasi/alfa-amylaasi-suhde on pienempi kuin 3, ja lähinnä pienempi kuin 1.

Kuvio 1 esittää keksinnön mukaisen entsyymin ja Thermamyl-alfa-amylaasin optimi pH-alueet.

Kuvio 2 esittää keksinnön mukaisen entsyymin ja Thermamyl-alfa-amylaasin optimilämpötilat.

Kuvio 3 esittää keksinnön mukaisen entsyymin ja Thermamyl-alfa-amylaasin lämpöstabiiliutta 80°C:ssa pH:n ollessa 4,5 kun läsnä on 5 mmoolia Ca^{++} -ioneja.

Kuvio 4 esittää keksinnön mukaisen entsyymin ja Thermamyl-alfa-amylaasin lämpöstabiiliutta 90°C:ssa ja pH:n ollessa 6,0.

Kuvio 5 esittää keksinnön mukaisen entsyymin ja Thermamyl-alfa-amylaasin lämpöstabiiliutta 90°C:ssa pH:n ollessa 6,0 kun läsnä on 1 mmooli Ca^{++} -ioneja.

Kuvio 6 esittää keksinnön mukaisen entsyymin ja Thermamyl-alfa-amylaasin lämpöstabiiliutta 85°C:ssa ja pH:n ollessa 4,5 kun läsnä on 22,5 % tärkkelystä.

Kuvio 7 esittää keksinnön mukaisen entsyymin ja Thermamyl-alfa-amylaasin lämpöstabiiliutta 85°C:ssa pH:n ollessa 4,5 kun läsnä on 22,5 % tärkkelystä ja 5 mmoolia Ca^{++} -ioneja.

Kuvio 8 esittää graafisesti keksinnön mukaisen entsyymin molekyylipainon määrittystä natriumdodekyylisulfaatti-levy-elektroforeesi-menetelmällä.

Kuvio 9 esittää keksinnön mukaisen entsyymin ja Bacillus stearothermophilus-lajista peräisin olevien kahden tunnetun alfa-amylaasin pH:n ja entsyymiaktiivisuuden suhdetta.

Kuvio 10 esittää keksinnön mukaisen entsyymin ja Bacillus stearothermophilus-lajista peräisin olevan tunnetun alfa-amylaasin lämpötilan ja entsyymi-

aktiivisuuden suhdetta.

Kuvio 11 esittää tämän keksinnön mukaisen entsyymin ja lajeista *Bacillus subtilis* ja *Bacillus licheniformis* peräisin olevien aikaisempien alfa-amylaasien deaktivoitumiskäyriä niitä käsiteltäessä 80°C:ssa pH:n ollessa 4,5 kun läsnä on 5 mmoolia kalsium-ioneja.

Kuvio 12 esittää tämän keksinnön mukaisen entsyymin ja lajeista *Bacillus licheniformis* ja *Bacillus stearothermophilus* peräisin olevien aikaisempien alfa-amylaasien deaktivoitumiskäyriä niitä käsiteltäessä 90°C:ssa ja pH:n ollessa 6,0 ja kalsium-ioneja lisäämättä.

Eri mikro-organismien kykyä tuottaa lämmönkestävää alfa-amylaasia tutkittiin viljelmällä niitä kohoavissa lämpötiloissa (37°C, 45°C, 55°C ja 70°C), eri pH-arvoissa (5,0 ja 7,0) ja viljelyliemissä. Todettiin, että eristetyt termofiiliset sädesienet tuottavat 55°C:ssa ja termofiiliset sienet 45°C:ssa suurella saannolla termolabiilia alfa-amylaasia, kun taas termofiiliset bakteerit tuottavat 70°C:ssa alhaisella saannolla termostabiilia alfa-amylaasia. Näiden alkututkimusten perusteella suoritettiin mikro-organismien seulontaa alfa-amylaasin happo- ja lämpöstabiiliuden perusteella suorittamalla viljelyt 55°C:ssa ja 70°C:ssa.

Eri paikoista koottiin kaikkiaan 550 mikrobiologista näytettä, kuten multa-, kuumalähdevesi-, komposti- jne. näytteitä.

Happo- ja lämpöstabiilius saatiin määrittämällä viljelmäsuodosten alfa-amylaasiaktiivisuus ennen 10 minuutin käsittelyä 80°C:ssa, pH-arvossa 5,0 Ca-ionien läsnäollessa (10 mmoolia), ja käsittelyn jälkeen.

Alfa-amylaasi-aktiivisuus määritettiin seuraavasti:

Viikottain valmistettiin 0,2-painoprosenttista liukoisen tärkkelyksen liuosta seuraavalla tavalla: 200 mg liukoista tärkkelystä 50 ml:ssa 0,2-masettaattipuskuria (pH 4,5), jossa oli 0,013 moolia $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:ta, lämmitettiin 100°C:een kiehuvaan vedessä, ja saatu liuos laimennettiin samalla puskurilla 100 ml:ksi. Putkea, jossa oli 0,1 ml entsyymiliuosta ja 0,3 ml 0,2-painoprosenttista liukoisen tärkkelyksen liuosta inkuboitiin 5 minuuttia 60°C:ssa. Reaktio pysäytettiin lisäämällä 1,0 ml 0,5-n etikkahappoa. Lisättiin 3,0 ml 0,015-painoprosenttista jodiliuosta, sekoitettiin ja optinen tiheys luettiin H_2O :ta vasten aaltopituudella 700 μm . Entsyymiä sisältämätön putki toimi sokeakokeena ja sen optinen tiheys 700 μm :n kohdalla merkittiin merkillä OD_b . Yksi entsyymiyksikkö oli se määrä, joka katalysoi sinisen värin 10 %:n laskun minuuttia kohden edellä selostetuissa olosuhteissa.

$$\text{NML-yksiköt} = \frac{(\text{OD}_b - \text{OD}) \times 100}{\text{OD}_b \times 5 \times 10}$$

Ellei toisin ole mainittu, ilmoitettu alfa-amylaasi-aktiivisuus on määritetty edellä esitetyllä menetelmällä (NML-yksikköinä). Milloin alfa-amylaasi-

aktiivisuus on merkitty CPC-alfa-amylaasi-yksikköinä, CPC-yksikkö on suunnilleen 1/140 NML-yksiköstä.

CPC-alfa-amylaasi-aktiivisuusyksiköt on määritetty seuraavalla menetelmällä:

Yksi millilitra sopivasti laimennettua entsyymiliuosta lisätään 10 ml:aan 1-prosenttista liukoisen tärkkelyksen liuosta 0,03-molaarisessa etikkahappopuskuriliuoksessa (pH 6,0) ja reaktio suoritetaan 10 minuutin kuluessa 60°C:ssa. Yksi millilitra reaktioliuosta pannaan 100 ml:n asteikolla varustettuun pulloon, jossa on 50 ml 0,02-n suolahappoliuosta, lisätään 3 ml 0,05-prosenttista jodiliuosta, ja kokonaistilavuus säädetään vettä lisäämällä 100 ml:ksi. Mitataan kehittyvä sinisen värin absorbanssi aaltopituudella 620 μm . Entsyymimäärä, joka tarvitaan hajottamaan 10 mg tärkkelystä minuutin aikana määritetään 1 CPC-yksiköksi.

$$1 \text{ CPC-yksikkö} = \frac{D_o - D_s}{D_o} \times \frac{50}{10 \times 10} \times (\text{laimennuskerroin})$$

jossa

D_o = kontrolliliuoksen absorbanssi (entsyymiliuoksen asemesta on lisätty vettä)

D_s = reaktioliuoksen absorbanssi

Seulontatutkimuksessa käytetyt olosuhteet ja ravintoliuokset on koottu taulukkoon 1.

Ensimmäisen ja toisen seulontatutkimuksen tulokset on ilmoitettu taulukossa 2.

Taulukko 1

Viljely-olosuhteet ja ravintoliuokset

Olosuhteet

	Maljaviljelys ⁽¹⁾	Viistopintaviljelys ⁽²⁾	Pulloviljelys ⁽³⁾
a)	55°C pH 5	55°C, pH 5	50°C, pH 6
b)	55°C, pH 7	55°C, pH 7	50°C, pH 7
c)	70°C, pH 5	70°C, pH 5	60°C, pH 6
d)	70°C, pH 7	70°C, pH 7	60°C, pH 7

(1) Maljaviljelyksen
ravintoliuos
(B-B)

(2) Viistopinta-
viljelyksen
ravintoliuos
(B-D)

(3) Pullovilje-
lyksen ravinto-
liuos
(B-M)

Amylopektiini	0,02 %	Liukoinen tärkkelys	1,0 %	3,0 %
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0,025 %	Bacto-tryptoni (Difco)	0,5 %	0,5 %
Hiivauute	0,025 %	Hiivauute	0,5 %	1,0 %
Na-sitraatti	0,01 %	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,05 %	0,05 %
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,05 %	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,05 %	-
KCl	0,15 %	MgSO ₄ · 7H ₂ O	-	0,05
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,05 %	KH ₂ PO ₄	0,1 %	0,1 %
Agar	2,0 %	Agar	2,0 %	-

T a u l u k k o 2

Seulonnan tulokset

<u>1. seulonta</u>		<u>2. seulonta</u>					
Eristys olosuhteet	Eristetyt kannat	α-amylaasin tuottajien jakauma					
		RA*	100~200 yks./ml	~500 yks./ml	~1,000 yks./ml	~2,000 yks./ml	~2,500 yks./ml
55°C, pH 5,0	Sädesienet 503 kantaa	- +	16 0	43 0	46 0	34 0	1 0
	Bakteerit 292 kantaa	- +	9 0	4 1	2 2	0 0	0 0
	Sädesienet 629 kantaa	- +	16 0	50 0	34 0	27 0	5 0
	Bakteerit 769 kantaa	- +	5 4	3 3	2 0	0 0	0 0
70°C, pH 5,0	Bakteerit 841 kantaa	- +	0 7	1 1	0 1	0 3	0 0
	Bakteerit 1 326 kantaa	- +	0 15	0 2	0 0	0 0	0 0

* RA: Jäljellä oleva aktiivisuus 10 min. käsittelyn jälkeen 80°C:ssa pH:n ollessa 5,0. Kaikilla RA-positiivisilla kannoilla aktiivisuudesta oli jällellä noin 100 %.

58157

Noin 25 %:lla termofiilisistä 55°C:ssa eristetyistä sädesienistä alfa-amylaasi-tuotanto oli 100-2 500 yksikköä viljelyliemen millilitraa kohden, mutta aktiivisuutta ei ollut jäljellä lainkaan lämpökäsittelyn jälkeen (80°C, 10 minuuttia, pH 5,0).

55°C:ssa eristetyistä 1061 termofiilisestä bakteerikannasta yhteensä 35 kannan alfa-amylaasi-tuotanto oli 100-1000 yksikköä, ja näistä kannoista 10 tuotti termostabiilia alfa-amylaasia. Lähes kaikki 70°C:ssa eristettyjen termofiilisten bakteerien tuottamista alfa-amylaaseista olivat happo- ja lämpöstabii-leja; parhaiten tuottavat saatiin pH 5,0:ssä eristetyistä.

70°C:ssa pH-arvossa 5,0 eristettyjen 219 kannan aktiivisuuden ja kirkkaan alueen koon suhdetta tutkittiin. Tulokset on esitetty taulukossa 3, josta voidaan nähdä, että 90 %:lla näistä kannoista kirkkaan alueen läpimitta oli pienempi kuin 3 cm ja että ne tuottivat 0-200 yksikköä alfa-amylaasia. Suurin tuotanto saatiin kannoilla, joilla kirkkaan alueen läpimitta oli suurempi kuin 3 cm, mutta näiden määrä oli vain 10 % kokeilluista kannoista.

Taulukko 3

Eristetyn kannan aktiivisuuden ja kirkkaan alueen koon välinen suhde

Kirkkaan alueen koko eristyslevyltä
(läpimitta senttimetreinä)

Aktiivisuus pullossa (yks./ml)	< 2	2-3	3-4	4	yhteensä
0 - 100	153	40	15	0	208
- 200	3	2	1	0	6
- 500	0	0	2	0	2
- 1000	0	0	1	0	1
- 1500	0	0	1	1	2
Yhteensä	156	42	20	1	219

Voidaan todeta, että erinomainen seulontamenetelmä sellaisten mikro-organismien löytämiseksi, jotka pystyvät suurella saannolla tuottamaan hapon- ja lämmönkestävää alfa-amylaasia, käsittää bakteerien eristämisen edellä olevissa kokeissa pesäkkeistä, joiden kirkkaan alueen läpimitta on yli 3 cm.

Tämän seulonnan tuloksena hapon- ja lämmönkestäviä alfa-amylaasi-entsyymejä tuottavista kannoista valittiin parhaiten tuottava.

Tämä kanta on talletettu American Type Culture Collection (ATCC):n vakinaiseen kokoelmaan, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, josta se on vapaasti saatavissa.

Talletettu organismiNML-kanta n:oATCC n:o

Bacillus stearothermophilus B-968

31 199

ATCC:ssä talletetun kannan bakteriologiset ominaisuudet ovat seuraavat:

(1) Morfologiset ominaisuudet:

- A. Solujen muoto ja koko: 0,6 x 2-3 μ m; sauvabakteeriyksilöitä harvoin ketjuissa
- B. Pleomorfisuus: negatiivinen
- C. Liikkuvuus: liikkuvia ja niissä on flagelloja
- D. Itiö: 0,6 x 1,5 μ m, munan muotoinen: tennismailan muotoinen itiörunko
- E. Gram-värjäys: positiivinen
- F. Haponkestävyys: negatiivinen

(2) Kasvu erilaisissa ravintoalustoissa:

- A. Ravinto-agar-levy: aktiivisesti leviäviä yhdyskuntia, joiden pinta karkea ja reuna epätasainen
- B. Ravinto-agar-viisto-pinta: hyvä kasvu, samean valkea, aktiivista leviämistä, kampamaisia kasvannaisia
- C. Ravintoliemi-viljelmä: läpinäkyvän ruskea, valkea himmeä pinta
- D. Ravintogelatiini-pistoviljelmä: nesteytyminen
- E. Ravinto-gelatiini-agar-levy: leveä kirkas alue
- F. Suola-ravinto-nesteviljelmä: kasvun estyminen kun suolaa 2 %
- G. Maito-agar-levy: kirkas alue kaseiinin hydrolysoituessa
- H. Glukoosi-agar-viisto-pinta: hyvä kasvu, samanlaisia yhdyskuntia kuin ravinto-agarilla
- I. Proteosi-peptoni-agar-viistopinta: Ei kasvua

(3) Fysiologiset ominaisuudet:

- A. Nitraatin pelkistyminen: positiivinen
- B. Katalaasi-koe: positiivinen
- C. Voges-Proskauer-reaktio: positiivinen
- D. Sitruunahapon hyväksikäyttö: positiivinen
- E. Rikkivedyn muodostuminen: positiivinen
- F. Tärkkelyksen hydrolysoituminen: voimakasta hydrolysoitumista
- G. Hapon ja kaasun muodostuminen: glukoosista, ksyloosista, arabinoosista, mannitolista muodostuu happoa mutta ei kaasua

H. Lämpötilan ja pH:n vaikutus kasvuun:

	ATCC n:o 31 199 <u>(B-968)</u>
50-70°C	hyvä kasvu
Kasvulle edullinen pH-alue	5-8
Optimi-pH	6-7

Edellä mainitut kokeet suoritettiin julkaisujen "Laboratory Methods'in Microbiology", W.F. Harrigan ym., ja "Manual of Microbiological Methods", julkaisija American Bacteriological Association, mukaisesti.

Edellämainitut ominaisuudet omaava kanta identifioitiin *Bacillus stearothermophilus*-kannaksi Bergey'n teoksen Manual of Determinative Bacteriology, 8.painos, mukaisesti.

Tämä kanta puhdistettiin edelleen levyviljelmällä. Valitun kannan eristys-, viljely- ja puhdistusolosuhteet on koottu taulukkoon 4. Kuten taulukosta 4 voidaan nähdä, puhdistettu kanta ATCC n:o 31 199 (B-968) tuottaa 2111 NML-yksikköä alfa-amylaasi-aktiivisuussyksikköä millilitraa kohden viljelylientä (noin 15 CPC-yksikköä).

Taulukko 4

Yhteenveto valitusta kannasta

1. seulonta			2. seulonta			Puhdistus		
ATCC n:o	Eristys- olosuhteet	pH Lähde	Aktiivisuus (U/ml)	Viljelyaika (t)	Viljely- olosuhteet	Aktiivisuus (U/ml)	Viljely- aika (t)	Viljely- olosuhteet
	Lämpötila (°C)							
31 199	70	5,0 komposti	1 098	40	60°C, pH 6	2 111	42	55°C, pH 6

Keksinnön mukaista alfa-amylaasi-entsyymiä tuotetaan viljelemällä *Bacillus stearothermophilus*-kantaa ATCC n:o 31 199 sen viljelyyn sopivassa ravintoalustassa, joka sisältää assimiloituvaa hiili- ja typpilähdettä sekä muita tarvittavia ravinteita.

Sopivia assimiloituvia hiililähteitä ovat hiilihydraatit kuten tärkkelykset, maissijauho, vehnä jauho. Ravintoalustassa käytettävän hiilihydraatin määrä voi vaihdella laajoissa rajoissa, sen määrä voi olla esim. noin 1 % (paino/til.) - 25 % (paino/til), ja edullisesti se on noin 10 % (paino/til.) - 20 % (paino/til.), (prosentit on laskettu dekstroosina). Edullisia assimiloituvia hiilihydraatteja ovat tärkkelys ja osittain hydrolysoitu tärkkelys (painoprosentteina niiden käyttömäärä on 1-5 paino-%).

Ravintoalustan typpilähde voi olla epäorgaaninen ja/tai orgaaninen. Sopivia epäorgaanisia typpilähteitä ovat ammoniumsuolat ja epäorgaaniset nitraatit. Sopivia orgaanisia typpilähteitä ovat peptoni, lihauute, entsyymiuute, kaseini, maissinliotusneste, mallasuute, soijapapujauho, kuorittu maito.

Lisäksi ravintoalustan tulee sisältää tavanomaisia hivenaineita kuten epäorgaanisia suoloja, joita ovat kalsiumkloridi, magnesiumsulfaatti, fosfaatit, natriumkloridi, kaliumkloridi.

Näitä hiililähteitä, typpilähteitä ja epäorgaanisia suoloja voidaan käyttää yksin tai sopivina seoksina. Lisäksi kasvun ja bakteerien tuottavuuden lisäämiseksi voidaan käyttää pieniä määriä metallisuoloja, vitamiineja, aminohappoja.

Tämän keksinnön alfa-amylaasi-entsyymin valmistuksessa käytettävät viljelyolosuhteet ovat samoja, joita normaalisti käytetään termofiilisiä bakteereja viljeltäessä. Lähinnä kantaa viljellään submersisti viljelyliemessä sekoittamalla ja ilmastoimalla 1-5 vuorokautta 50°C-70°C:ssa pH:n ollessa 5-9. Entsyymi kertyy viljeltyyn ravintoliuokseen.

Keksinnön mukaisen alfa-amylaasi-entsyymin valmistuksen jälkeen mikrobisolut poistetaan tavanomaisin keinoin kuten esim. sentrifugoimalla. Sitten entsyymin saostamiseksi ja konsentroimiseksi suodoksesta lisätään epäorgaanisia suoloja kuten ammoniumsulfaattia, natriumsulfaattia tai magnesiumsulfaattia, ja/tai veteen sekoitettavia orgaanisia liuottimia kuten asetonia, etanolia, 2-propanolia. Alfa-amylaasi voidaan saada talteen myös lisäämällä tärkkelystä suodokseen siten, että alfa-amylaasi absorboituu tärkkelykseen.

Entsyymin puhdistamiseksi entsyymiä sisältävästä suodoksesta suodosta käsitellään kylmällä asetonilla, jota käytetään suodokseen verrattuna kaksinkertainen tilavuus, jolloin entsyymi saostuu. Saostunut entsyymi liuotetaan 0,05-molaariseen tris-suolahappo-puskuriliuokseen (pH 8,5) ja liuos saa valua DEAE-selluloosakolonniin läpi, joka on tasapainoitettu samalla puskuriliuoksella (pH 8,5). Suurin osa alfa-amylaasista jää liuokseen. Muut proteiinit, pigmentit jne. absorboituvat DEAE-selluloosaan. Alfa-amylaasi-entsyymiä sisältävästä suodoksesta käyt-

tetään tässä nimitystä "osittain puhdistettu entsyymi". Osittain puhdistettu entsyymi voidaan puhdistaa edelleen dialysoimalla 0,01 tris-suolahappo-puskuriliuosta (pH 7,9) vastaan ja laskea sen jälkeen hydroksiapatiitti-kolonnin läpi, joka on tasapainoitettu samalla puskuriliuksella. Entsyymi absorboituu tässä vaiheessa kolonniin. Absorboitunut entsyymi eluoidaan lisäämällä ammoniumsulfaatin konsentraatiota lineaarisesti 0-molaarisesta 0,5-molaariseksi.

Näin saatu osittain puhdistettu entsyymi johdetaan konsentroinnin jälkeen Sephadex G-150-kolonnin läpi. Entsyymi absorboituu heikosti Sephadex'iin ja se uutetaan fraktioon, jonka molekyylipaino on pienempi kuin 100 000. Tällä tavalla saadun puhdistetun entsyymin aktiivisuus on kasvanut alkuperäiseen suodokseen verrattuna 100-kertaiseksi, mutta levyelektroforeesissa alfa-amylaasi-entsyyminauhan ohella on havaittavissa myös muutamien muiden proteiinien nauhoja, eikä entsyymi ole vielä kiteinen.

Seuraavan esimerkin tarkoituksena on kuvata täydellisemmin edellä selostettua menetelmää ja esittää parhaaksi katsottu tapa keksinnön eri kohteiden toteuttamiseksi.

Esimerkki

Viljelyväliaineeseen, jossa oli 3 % maissitärkkelystä, 0,5 % peptonia, 1 % maissinliotusnestettä, 0,05 % kalsiumkloridia, 0,05 % mangaanikloridia, 0,05 % magnesiumkloridia ja 0,05 % kaliumkloridia, pH säädettiin 7,5:ksi. 50 ml:n näyte tästä viljelmäravintoliuoksesta pantiin 500 ml:n erlenmeyer-pulloon ja steriloitiin 15 minuuttia 121°C:ssa. Steriloituun ravintoliemeen ympättiin *Bacillus stearothermophilus*-kantaa ATCC n:o 31 199 (B-968) ja sekoitettiin 4 vuorokautta 55°C:ssa. Viljelyn jälkeen mikrobisolot poistettiin sentrifugoimalla. Suodoksen alfa-amylaasi aktiivisuus oli 14 CPC-yksikköä/ml. Alfa-amylaasi saostettiin lisäämällä suodoksen määrään nähden kaksinkertainen tilavuus 2-propanolia. Sakka lyofilisoitiin kuivaksi jauheeksi. Raaka entsyymijauhe liuotettiin 0,05-mooliseen tris-HCl-puskuriin (pH 8,5), ja liuos johdettiin DEAE-selluloosakolonnin läpi, joka oli tasapainoitettu samalla puskuriliuksella. Alfa-amylaasi-entsyymi ei absorboitunut DEAE-selluloosaan, kun taas useimmat muut proteiinit, pigmentit jne. absorboituivat DEAE-selluloosaan ja saatiin näin poistetuiksi. Näin saatu osittain puhdistettu entsyymi konsentroitiin, minkä jälkeen se johdettiin Sephadex-G-150-kolonnin läpi. Entsyymi absorboitui heikosti Sephadex'iin ja se eluoiitiin siitä fraktioksi, jonka molekyylipaino oli pienempi kuin 100 000. Näin saatu puhdistettu entsyymi lyofilisoitiin, ja sen suhteellinen aktiivisuus oli 230 CPC-yksikköä/mg proteiinia.

Eristetyllä kannalla kokeiltiin lämpötilan ja pH:n vaikutusta alfa-amylaasin muodostumiseen. Alfa-amylaasi-aktiivisuus ilmoitettiin kolmen kokeen huippuaktiivisuuksien keskiarvona. Sekä esiviljelyssä että pääviljelyssä käytetty ravintoliuoksen koostumus oli sama kuin taulukossa 1 esitetty (B-M-ravintoliuos). Näiden kokeiden tulokset on koottu taulukkoon 5.

Taulukko 5

Lämpötilan ja pH:n vaikutus α -amylaasin muodostumiseen.

ATCC n:o	Lämpötila (°C)	Aktiivisuus yks./ml viljelyaika					
		pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5	pH 7,0	pH 7,5	pH 8,0
31 199	45	143 (139)	133 (139)	113 (139)	115 (139)	86 (139)	
	50	686 (139)	663 (139)	543 (139)	493 (139)	491 (139)	
	55	1 608 (43)	1 365 (43)	1 267 (43)	1 025 (43)	946 (43)	
	60	1 485 (43)	1 457 (43)	1 295 (43)	1 154 (43)	1 117 (43)	
	65		0 (65)	0 (65)	0 (65)	0 (65)	0 (65)

Taulukosta 5 voidaan nähdä, että kannan ATCC n:o 31 199 viljelyssä ravintoliuoksen optimi-pH-arvo on 5,5 lämpötilassa 55-60°C.

Taulukossa 6 on yhteenveto eristetyn kannan alfa-amylaasi-tuotannosta.

Kokeissa käytettiin ensin viistopinta-alustoja, ja kantaa siirrettiin 9-11 kertaa kahden tyyppiselle viistopinta-alustalle, minkä jälkeen viljely tapahtui nesteessä. Näin löydettiin sopiva viistopinta-ravintoliuos, joka pystyi ylläpitämään jatkuvaa alfa-amylaasin tuotantoa. Taulukossa 7 on määriteltä ravintoliuoksen tilavuuden vaikutus alfa-amylaasin muodostumiseen. Ilmastuksen vaikutusta alfa-amylaasin muodostumiseen tutkittiin vaihtelemalla ravintoliuoksen tilavuutta 500 ml:n pulloissa.

Taulukko 6

α -amylaasin muodostuminen käytettäessä useita siirroksia viistopinta-alustoille.

ATCC n:o	Ravintoliuos ja siirrosten lukumäärä		Pulloviljelmä		
			Aktiivisuus, yks./ml (viljelyaika, t)	Olosuhteet lämpötila (°C)	pH
31 199	BD*1	2	1 163 (44)	55	5,5
	BD,	9	1 013 (68)	55	5,5
	NA*2	9	775 (68)	55	5,5

*1 Viistopinta-ravintoliuos
seulontaa varten
Liukoinen tärkkelys 1,0 %
Bacto-tryptoni (Difco) 0,5 %
Hiivauute 0,5 %
CaCl₂ · 2 H₂O 0,05 %
MnCl₂ · 4 H₂O 0,05 %
KH₂PO₄ 0,1 %
Agar 2,0 %
pH 5,0

*2 Ravinto-agar-viistopinta
Bacto-peptoni (Difco) 0,5 %
Bacto-häränlihaute
(Difco) 0,3 %
Agar 2,0 %
pH 7,2 %

Taulukko 7

Ravintoliuoksen tilavuuden vaikutus amylaasin muodostumiseen

ATCC n:o	Viistopinta- siirrost lukumäärä	Olosuhteet Lämpötila (°C)	pH	<u>Pulloviljelmä</u>		Aktiivisuus, yks./ml (viljelyaika, t)
				Ravintoliuoksen tilavuus ml/500 pullo	ml:n	
				30		1 131 (44)
				40		1 240 (44)
31 199	ED-2	55	5,5	50		1 163 (44)
				60		1 054 (68)
				70		1 224 (68)

Tämän keksinnön kanta (ATCC numero 31 199) puhdistettiin ja sen tuottaman alfa-amylaasin ominaisuuksia verrattiin puhdistetun Thermamyl Liquid 60, Batch AN 1005:n ominaisuuksiin alla selostetulla menetelmällä.

Alfa-amylaasi-entsyymi saostettiin ATCC 31 199:n viljelysuodoksesta tai Thermamyl-alfa-amylaasista (laimennettu kahdesti) lisäämällä kaksi tilavuusosaa kylmää asetonia. Sakka koottiin talteen sentrifugoimalla ja liuotettiin 0,025-mooliiseen kalsiumasetaattiliuokseen. Liuokseen lisättiin liukoista tärkkelystä siten, että saatiin 20-prosenttista tärkkelyssuspensiota. Tätä suspensiota lämmitettiin 30 minuuttia 85°C:ssa ja sakka poistettiin sentrifugoimalla. Sitten liuos dialysoitiin 0,05-m tris-HCl-puskuria (pH 8,5) vastaan, jossa oli 10 mmoolia Ca⁺⁺-ioneja, vaihtamalla puskuri kahdesti. Dialyssaattia käsiteltiin DEAE-selluloosa-kolonnissa, joka oli tasapainoitettu dialyysipuskurilla. Alfa-amylaasi ei absorboitunut kolonniin ja eluoitiin samalla puskurilla. Fraktiot, joilla oli alfa-amylaasi-aktiivisuutta, koottiin ja alfa-amylaasi-entsyymi konsentroitiin saostamalla asetonilla. Alfa-amylaasi-aktiivisuus määritettiin edellä selostetulla CPC-menetelmällä. Puhdistusmenetelmästä on yhteenveto taulukossa 8.

Taulukko 8

<u>α-amylaasin puhdistus</u>					
α -amylaasi	Puhdistus- menetelmä	Viljelyliemi tai raaka- entsyymi- valmiste	Asetoni- saostus	Lämpö- käsittely	DEAE- selluloosa
ATCC n:o 31 199					
Kokonaisaktiivisuus (CPC-yksikköä)		9 910	8 210	7 214	2 310
Kokonaisproteiinimäärä (mg)		4914	1969	1206	33
Ominaisaktiivisuus (yks./mg)		2,0	4,2	6,0	70
Saanto (%)		100	82,8	72,8	23,3
Thermamyl [®] (valmistaja Novo Industri A/S)					
Kokonaisaktiivisuus (CPC-yks.)		12 100	9 400	9 540	2 410
Kokonaisproteiini- määrä (mg)		684	286	183	24
Ominaisaktiivisuus (yks./mg)		17,7	32,9	52,1	100,4
Saanto (%)		100	77,7	78,8	19,9

Kannan ATCC n:o 31 199 tuottaman osittain puhdistetun alfa-amylaasi-valmisteen ja Thermamyl-alfa-amylaasin (jossa oli 7 yks./ml) hapon- ja lämmönkestävyydet määritettiin inkuboimalla 60 minuuttia seuraavissa olosuhteissa:

- (a) 90°C, pH 6,0, Ca⁺⁺ 0 tai 1 mmoolia;
- (b) 80°C, pH 4,5 Ca⁺⁺ 5 mmoolia; ja
- (c) 85°C, pH 4,5, Ca⁺⁺ 1 mmoolia tai 5 mmoolia, 22,5 % liukoista tärkkelystä.

*5 ml alfa-amylaasi-valmistetta dialysoitiin Visking 8/32 selluloosaputkessa 0,05-moolista kalsiumasettaatti-puskuria (pH 4,5-6,0) vastaan, jossa oli 0-5 mmoolia kalsiumasettaattia, kolmen tunnin ajan 4°C:ssa, vaihtaen puskuria kahdesti. Sitteen 4 ml dialysoitua pantiin pieniin koeputkiin ja inkuboitiin ilmoitetussa lämpötilassa vesihauteessa. Putket jäähdytettiin nopeasti jäävesihauteessa ja määritettiin jäljellä oleva alfa-amylaasi-aktiivisuus.

**0,3 ml dialysoitua alfa-amylaasin entsyymiliuosta, 0,5 ml 1-mool. kalsiumasettaatti-puskuria, 0,2 ml 0,5-mool. CaCl₂:a ja 3,0 ml 30-%:sta liukoisen tärkkelyksen lietettä pipetoitiin koeputkeen. Seosta inkuboitiin sen jälkeen 85°C:ssa 30 minuuttia jatkuvasti sekoittaen. Sitten koeputket jäähdytettiin nopeasti jäävesi-

hauteessa ja jäljellä oleva alfa-amylaasi-aktiivisuus määritettiin.

Jäljellä olevat alfa-amylaasi-aktiivisuudet määritettiin kun inkuboinnista oli kulunut 5, 10, 20, 30 ja 60 minuuttia.

ATCC 31 199:n alfa-amylaasin ja Thermamyl'in alfa-amylaasin pH-optimi ja optimi-lämpötila määritettiin muuten edellä selostetuissa CPC-koeolosuhteissa paitsi että reaktioseoksen pH:ta tai lämpötilaa muutettiin. Kokeiden tulokset on esitetty piirroksissa 1 ja 2. ATCC n:o 31 199:n alfa-amylaasin pH-optimi oli välillä 4,0-5,2 ja Thermamyl'in alfa-amylaasin 4,5. Thermamyl'in alfa-amylaasin todettiin säilyttävän suuren entsymaattisen aktiivisuuden neutraalissa ja alkalisisä pH-alueessa.

ATCC n:o 31 199:n alfa-amylaasin optimilämpötila oli 75°C ja Thermamyl'in alfa-amylaasilla 85°C. Entsymaattisen aktiivisuuden ja reaktiolämpötilan suhde oli ATCC n:o 31 199:n alfa-amylaasilla ja Thermamyl'in alfa-amylaasilla hyvin erilainen. Todettiin, että Thermamyl-alfa-amylaasin alfa-amylaasiaktiivisuus lisääntyi 20-30 %:lla kun sitä inkuboitii 85°C:ssa ja pH:n ollessa 6,0 tärkkelyksen ja Ca⁺⁺-ionien läsnäollessa. Tämä tosiasia voi selittää eroavuuden entsymaattisen aktiivisuuden ja reaktiolämpötilan suhteessa ATCC n:o 31 199:n alfa-amylaasin ja Thermamyl'in alfa-amylaasin välillä.

Piirros 3 kuvaa ATCC n:o 31 199:n alfa-amylaasin ja Thermamyl'in alfa-amylaasin inaktivoitumiskäyriä kun niitä on inkuboitu 80°C:ssa pH:n ollessa 4,5 ja läsnä on ollut 5 mmoolia CaCl₂:a. ATCC n:o 31 199:n alfa-amylaasin lämpöstabiilisuus oli suurempi kuin Thermamyl'in alfa-amylaasin lämpöstabiilisuus näissä olosuhteissa.

Piirros 4 kuvaa ATCC n:o 31 199:n alfa-amylaasin, Thermamyl'in alfa-amylaasin ja Bacillus stearothermophilus'in tuottaman alfa-amylaasin (selostaneet Ogasawara ym., J. Biochem., 67, 65, 77, 83 (1970)) inaktivoitumiskäyriä kun niitä inkuboitii 90°C:ssa pH:n ollessa 6,0 Ca⁺⁺-ionien poissaollessa (Ogasawara'n ym:n selostamat) inkubointiolosuhteet olivat samanlaiset kuin ne, joita on käytetty tässä kokeessa).

Kuten piirroksista 4 voidaan nähdä, tämän keksinnön alfa-amylaasin lämpöstabiilisuus oli paljon suurempi kuin sekä Thermamyl'in alfa-amylaasin että Ogasawara'n et. al. alfa-amylaasin (vaikka myös keksinnön mukainen alfa-amylaasi kuuluu Bacillus stearothermophilus-lajin tuottamaan).

Piirros 5 kuvaa ATCC n:o 31 199:n alfa-amylaasin ja Thermamyl'in alfa-amylaasin inaktivoitumiskäyriä muuten samoissa olosuhteissa kuin edellä piirroksen 4 yhteydessä on selostettu (esim. 90°C ja pH 6,0), mutta ravintoliuoksessa oli 1 mmooli Ca⁺⁺-ioneja. Tämän keksinnön alfa-amylaasin lämpöstabiilisuus oli yhä suurempi kuin Thermamyl'in alfa-amylaasin, mutta ero ei ollut yhtä suuri kuin inkuboitessa ilman Ca⁺⁺-ioneja. Nämä tosiasiat ovat omiaan osoittamaan, että ATCC n:o 31 199 alfa-amylaasi sitoo Ca⁺⁺-ionit lujemmin kuin Thermamyl'in alfa-amylaasi, ja sen vuoksi ne tarvitsevat vähemmän Ca⁺⁺-ioneja proteiinimolekyylin stabiloimiseen kuin Thermamyl'in alfa-amylaasi.

Piirroksset 6 ja 7 kuvaavat ATCC n:o 31 199:n alfa-amylaasin ja Thermamyl'in alfa-amylaasin inaktivoitumiskäyriä kun niitä inkuboitiin 85°C:ssa pH:n ollessa 4,5 liukoisen tärkkelyksen (22,5 % kuiva-ainetta) ja Ca^{++} -ionien (1 mmooli Ca^{++} -ioneja, kuten on kuvattu piirroksessa 6 ja 5 mmoolia Ca^{++} -ioneja, kuten on kuvattu piirroksessa 7) läsnäollessa. ATCC n:o 31 199:n alfa-amylaasin lämpöstabiilisuus oli parempi kuin Thermamyl'in alfa-amylaasin sekä piirroksen 6 että piirroksen 7 olosuhteissa. Koska piirroksissa 6 ja 7 kuvatut edellä esitettyjen kokeiden olosuhteet ovat samanlaisia kuin monissa teollisissa tärkkelyksen nesteyttämisolosuhteissa, on odotettavissa, että tämän keksinnön alfa-amylaasin lämpöstabiilisuus osoitautuu paremmaksi happamalla pH-alueella teollisessa tärkkelyksen nesteyttämisessä ja konversiossa.

ATCC n:o 31 199:n alfa-amylaasin molekyylipainoiksi määritettiin 96 000 mitattuna Weber'in ja Osborn'in menetelmällä, J. Biol. Chem., 244, 4406 (1969) natriumdodekyylisulfaatti-levyelektroforeesilla. Merkki-proteiineina olivat albumiini (mp. 67 000), ovalbumiini (mp. 45 000), kymotrypsiini (mp. 25 000) ja sytokromi c (mp. 12 500). Tämän keksinnön alfa-amylaasin asema polyakryyliamidi-geelillä määritettiin panemalla geeliä amyloosi-Azure-agar-levylle ja inkuboimalla sitä 37°C:ssa. Tämän kokeen tulokset on kuvattu piirroksessa 8.

Tämän keksinnön alfa-amylaasin molekyylipainoksi saatu arvo 96 000 on paljon suurempi kuin niiden *Bacillus stearothermophilus*'in tuottamien alfa-amylaasien molekyylipainoarvot, joita ovat ilmoittaneet Ogasawara ym., J. Biochem., 67, 65, 77, 83 (1970) (molekyylipainoksi ilmoitettu 48 000) ja Manning ym., J. Biol. Chem., 236, 2952, 2958, 2962 (1961) (molekyylipainoksi ilmoitettu 15 600).

Eristetyn kannan proteaasi-aktiivisuus tutkittiin koska proteaasin tai proteolyttisen entsyymin ollessa läsnä alfa-amylaasin joukossa entsyymit pyrkivät reagoimaan monissa tärkkelysraaka-aineissa olevien erilaisten proteiinien kanssa muodostaen vesiliukoisia proteiinihydrolysaatteja kuten aminohappoja. Tästä syystä proteaasi-entsyymin läsnäolo epäpuhtautena alfa-amylaasi-entsyymin joukossa on haitallinen tärkkelysraaka-aineiden tehokkaan hydrolysoitumisen kannalta. Eristetyn kannan tuottaman alfa-amylaasi-entsyymin proteaasi-aktiivisuus määritettiin viljelysuodosten asetonisakoista vaiheessa, jolloin alfa-amylaasin muodostuminen oli huipussaan, käyttämällä modifioitua Anson-Hagiwara-menetelmää.

Saatuja tuloksia verrattiin Thermamyl'in alfa-amylaasin ja CPC-bakteeri-alfa-amylaasin entsyymivalmisteisiin. Kuten seuraavassa on esitetty, Thermamyl'in viljelysuodokset sisälsivät suuria määriä proteaasia. Toisaalta tämän keksinnön termostabiilia alfa-amylaasia tuottavat kannat eivät muodostaneet merkittäviä proteaasimääriä.

Alfa-amylaasin proteaasi-aktiivisuus

<u>Entsyymi</u>	<u>Proteaasi/alfa-amylaasi suhde</u>
ATCC n:o 31 199	0,06
CPC-BLA	6,2
Thermamyl 60	36,5

Kuten edellä olevista tuloksista voidaan nähdä, tämän keksinnön alfa-amylaasissa ei ole merkittäviä määriä proteaasi-aktiivisuutta. Tämä on merkittävä etu käytettäessä entsyymiä tärkkelysraaka-aineiden hydrolysointiin.

Keksinnön mukaisen alfa-amylaasin käyttökoe

Seuraavassa käyttökokeessa kuvataan keksinnön mukaisen alfa-amylaasi-entsyymin käyttöä tärkkelyksen nesteyttämiseen.

Kolmekymmentä grammaa perunatärkkelystä suspendoitiin 70 ml:aan vettä, lisättiin 75 mg kalsiumklorididihydraattia ja pH säädettiin 4,5:ksi. Tähän lietteeseen lisättiin 50 CPC-yksikköä puhdistettua, jauhattua, esimerkissä saatua entsyymiä tärkkelyksen nesteyttämiseksi 85°C:ssa 30 minuutin kuluessa. Nesteytetyn liuoksen hydrolysoitumisnopeus (D.E.) oli noin 21 ja pH oli 4,3. Kun lämpötila oli laskettu 60°C:een, lisättiin *Aspergillus niger*'in tuottamaa glukoamylaasi-entsyymiä ja liuosta sokeroitiin ja konvertoitiin 60°C:ssa 48 tuntia. Sokeriksi muutetun ja konvertoidun liuoksen D.E. oli 97,5 ja sen dekstroosipitoisuus oli 96,0 %.

Kuten edellä olevasta ilmenee, tämän keksinnön alfa-amylaasi-entsyymi hydrolysoi ja nesteyttää tärkkelystä. Sitä voidaan käyttää konvertoimaan liukoista tärkkelystä, amyloosia, amylopektiiniä, glykogeeniä, jne., alentamaan nopeasti näiden substraattien viskositeettia. Tämän keksinnön entsyymin reagoidessa liukoisen tärkkelyksen kanssa pH:n ollessa 4,5 60°C:ssa, tärkkelys-jodi-reaktio häviää hydrolysoitumisnopeuden (D.E.) ollessa noin 15 ja lopullinen D.E.-nopeus on 32-36. Hydrolysoituneen tuotteen sokerit analysoitiin ja siinä oli maltoosia, maltotrioosia, maltotetroosia ja muita malto-oligosakkarideja pienen glukoosimäärän kera. Pelkistetyn sokerituotteen mutarotaation on todettu olevan negatiivinen. Tämän mukaisesti tämän keksinnön entsyymi on tyypiltään nesteyttävä alfa-amylaasi-entsyymi ja se hydrolysoi esteettömästi tärkkelyksen alfa-1,4-sidoksia.

Tämän keksinnön entsyymiä käyttäen tapahtuvan nesteytymisen (suhteellinen arvo) ja suorituksessa käytettävän pH:n suhde on esitetty piirroksessa 9 ja sitä on verrattu vastaavaan suhteeseen *Bacillus stearothermophilus*'in tuottamien tunnettujen alfa-amylaasi-entsyymien osalta.

Kuten piirroksessa 9 on esitetty, tämän keksinnön entsyymin osalta optimi-pH on 4,2-5,2. Tämän keksinnön entsyymi ei menetä aktiivisuuttaan vaikka se jätetään 24 tunniksi huoneen lämpötilaan pH:n ollessa välillä 3-11.

Tämän keksinnön entsyymiä käytettäessä tapahtuvan nesteytymisen (suhteellinen arvo) ja suorituksessa käytettävän pH:n suhde on esitetty piirroksessa 10 ja sitä on verrattu vastaavaan suhteeseen *Bacillus stearothermophilus*'in tuottaman alfa-amylaasin osalta, jota ovat selostaneet Ogasawara ym. Kuten piirroksessa 10 on esitetty, tämän keksinnön entsyymin osalta ensisijainen käyttölämpötila on noin 80°C.

Kuten edellä olevasta ilmenee, tämän keksinnön alfa-amylaasi-entsyymiä

voidaan käyttää tärkkelyksen nesteytykseen ja konversioon tärkkelystä sokeriksi muuttavassa teollisuudessa, tekstiiliteollisuudessa liisterin poistamiseen ja lisäaineina pesuainekoostumuksissa samalla tavalla kuin tavallisesti käytetään bakteeri-alfa-amylaasi-entsyymejä.

Tämän keksinnön alfa-amylaasi-entsyymi soveltuu erityisesti tärkkelyksen nesteytykseen ja konversioon tuottaessa maltodekstriinejä myöhemmää dekstroosin valmistusta varten käyttäen glukooamylaasia, sillä molekyylien pääteryhmän isomeroituminen voidaan välttää, koska entsyymiä voidaan käyttää tehokkaasti pH:n ollessa happamalla puolella (so. pH:n ollessa 4,5-5,0), mikä lisää täten dekstroosin saantoa. Tämän uuden entsyymin käyttäminen pienentää myös puhdistusprosessin ioninvaihtokuormitusta, koska pH:ta ei tarvitse säätää ennen glukooamylaasi-entsyymillä suoritettavaa sokeriksi muuttamista ja konversiota.

Eräässä tämän keksinnön alfa-amylaasi-entsyymin edullisessa käyttötavassa entsyymiä käytetään konvertoimaan tärkkelys tärkkelyshydrolysaatiksi, jolloin jäljelle jäänyt konvertoitumaton tärkkelys pysyy rakeisessa muodossaan. Näitä prosesseja on selostettu US-patenteissa 3 922 196; 3 922 197; 3 922 198; 3 922 199; 3 922 200 ja 3 922 201, jotka kaikki on julkaistu marraskuun 25. p:nä 1975. Näissä rakeista tärkkelystä käyttäen suoritettavissa menetelmissä tärkkelystä käsitellään suhteellisen alhaisissa lämpötiloissa, so. lämpötilassa, joka on tärkkelyksen gelatinoitumisen alkamislämpötilan alapuolelta tärkkelyksen todelliseen gelatinoitumislämpötilaan. Näissä prosesseissa glukooamylaasi-entsyymiä käytetään edullisesti yhdessä alfa-amylaasi-entsyymin kanssa. Tämän keksinnön entsyymi soveltuu erityisesti käytettäväksi tässä menetelmässä, koska sillä on sama optimaalinen pH-alue kuin glukooamylaasilla.

Keksinnön mukaista alfa-amylaasi-entsyymiä voidaan myös edullisesti käyttää US-patentissa n:o 3 912 590 esitetyssä menetelmässä vähintään 25 paino-% tärkkelystä sisältävän tärkkelyslietteen, kuten maissitärkkelyslietteen, nesteyttämiseen käsittelemällä noin 100°C-115°C:ssa, edullisesti 105°C-110°C:ssa 1-60 minuuttia, edullisesti 5-10 minuuttia, ja sitten 80-100°C:ssa, edullisesti 90-100°C:ssa, jolloin ohennetun liuoksen viskositeetti on pienempi kuin 300 cP. mitattuna 95°C:ssa. Verrattomana etuna keksinnön alfa-amylaasi-entsyymin käytöllä tässä menetelmässä on se, että voidaan käyttää alhaisempaa pH:ta, joten seuraavassa glukooamylaasilla suoritettavassa sokeroimisessa pH:ta tarvitsee muuttaa vain vähän tai ei lainkaan.

Tämän keksinnön alfa-amylaasi-entsyymin ensisijaisessa käytössä tärkkelyslietettä käsitellään tärkkelyksen nesteyttämiseksi, entsyymillä, pH-alueella noin 3,5-6,5, edullisesti 4-5, lämpötilavälillä noin 50°C-100°C, edullisesti 60°C-95°C. Kun kyseessä on rakeisen tärkkelyksen edellä selostetut hydrolysointimenetelmät, lämpötila-alue ulottuu normaalista gelatinoitumisen alkamislämpötilasta tärkkelyksen todelliseen gelatinoitumisen alkamislämpötilaan, joka maissitärkkelyksellä on noin 60°C. Kun on kysymyksessä suora nesteyttämismenettely, entsyymiä sisältävää

tärkkelyslietettä lämmitetään tärkkelyksen nesteyttämiseksi esim. suihkukuumentimella, lämpötilavälillä noin 85°C - noin 95°C ja edullisesti noin 90°C - 92°C :ssa. Alkuliuotuksen (kuten rakeisen tärkkelyksen hydrolyysissä) tai nesteytyksen jälkeen lietettä käsitellään edullisesti "lämpöisku"-käsittelyllä yli 100°C :n lämpötilassa, edullisesti noin 110°C - noin 150°C :ssa, mahdollisten jäljellä olevien tärkkelysrakeiden nesteyttämiseksi. Sen jälkeen nesteytetty tärkkelysliete jäädytetään ja sitä käsitellään lisäämällä lisää alfa-amylaasia, yksinään tai muiden entsyymien, kuten esim. glukoamylaasin, beta-amylaasin, pullulanaasin, glukoosi-isomeraasin kera peräkkäin tai samanaikaisesti. Jos alfa-amylaasia käytetään yksinään, toisessa entsyymikäsittelyvaiheessa lämpötila on lähinnä välillä noin 80°C - noin 90°C ja mieluummin noin 85°C , mikä on tämän keksinnön entsyymien osalta optimilämpötila. Jos läsnä on muita entsyymejä kuten glukoamylaasia ja/tai glukoosi-isomeraasia, lämpötila on hiukan alhaisempi, so. $55-75^{\circ}\text{C}$ ja lähinnä noin 60°C .

Johtopäätös

Tämän keksinnön alfa-amylaasi-entsyymi voidaan erottaa selvästi aikaisemmin tunnetuista alfa-amylaaseista, joita on saatu eläimistä, kasveista, hiivoista, Fungi imperfekti-sienistä ja homeista, koska näiden aikaisemmin tunnettujen entsyymien lämpöstabiilisuus on niin alhainen, että ne menettävät aktiivisuutensa täydellisesti kun niitä käsitellään 5 minuuttia 70°C :ssa pH:n ollessa 6,0. Piirroksessa 12 on verrattu keksinnön mukaisen alfa-amylaasin lämpöstabiilisuutta (käytetyt arvot ovat pääasiallisesti samat kuin piirroksessa 6) tunnettujen alfa-amylaasien lämpöstabiilisuuteen. Voidaan havaita, että keksinnön mukaisella alfa-amylaasi-entsyymillä on paljon parempi hapon- ja lämmönkestävyys kuin aikaisemmillä alfa-amylaasi-entsyymeillä. Piirroksessa 12 ilmenee myös, että tämän keksinnön mukainen alfa-amylaasi säilyttää ainakin 90 % alkuperäisestä aktiivisuudestaan sitä kuumennettaessa 90°C :ssa, pH:n ollessa 6,0, 10 minuutin ajan ilman Ca-ioneja ja ainakin noin 50 % alkuperäisestä alfa-amylaasi-aktiivisuudestaan sitä kuumennettaessa 90°C :ssa, pH:n ollessa 6,0, 60 minuutin ajan. Piirroksessa 11 nähdään, että keksinnön mukainen alfa-amylaasi säilyttää ainakin noin 50 % alkuperäisestä alfa-amylaasi-aktiivisuudestaan sitä kuumennettaessa 10 minuuttia 80°C :ssa pH:n ollessa 4,5, kun läsnä on 5 mmoolia kalsium-ioneja.

Taulukossa 9 esittää tämän keksinnön alfa-amylaasin ja teollisesti käytettyjen *Bacillus subtilis*'in ja *Bacillus licheniformis*'in tuottamien alfa-amylaasi-entsyymien, sekä kirjallisuudesta tunnetun *Bacillus stearothermophilus*'in tuottamien alfa-amylaasi-entsyymien aktiivisuuden riippuvuutta pH:sta ja lämpötilasta.

Taulukko 9

Testatut entsyymit	Optimaalinen työskentely- pH	Sopiva työskentely- lämpötila	Molekyyli- paino
ATCC n:o 31 199	4,0-5,2	80°C	96 000
B. subtilis'in tuottama alfa-amylaasi	4,5-6,5	45-60°C	49 000 ⁵
B. licheniformis'in tuottama alfa-amylaasi	5,0-9,0	76-78°C	22 500 ⁵
B. stearothermo- philus'in tuottama alfa-amylaasi			
a) Ogasawara ym. ¹	5,0-6,0	65-70°C	48 000
b) Campbell ym. ³	4,8	55-70°C	15 600 ⁴

¹Ogasawara ym., J. Biochem., 67, (1970).

²Shigemasa Saito ABB, 155, 290 (1973).

³Campbell ym., J. Biol. Chem. 236, 2952 (1961).

⁴Campbell ym., J. Biol. Chem., 236, 2958 (1961).

⁵GB-patentissa n:o 1 296 839 ilmoitetaan B. licheniformis'in tuottaman alfa-amylaasin molekyylipainoksi 18 000-20 000 ja B. subtilis'in tuottaman alfa-amylaasin molekyylipainoksi 96 000.

Kuten eräät muut tunnetut alfa-amylaasi-entsyymit, tämän keksinnön entsyymi inhiboituu elohopean ja EDTA:n vaikutuksesta, mutta kalsium stabiloi sitä.

Patenttivaatimukset:

1. Lämmön- ja haponkestävä alfa-amylaasi-entsyymi, t u n n e t t u siitä, että se on valmistettu viljelemällä mikro-organismin *Bacillus stearothermophilus* kantaa ATCC 31 199 ja että sillä on seuraavat ominaisuudet:

(1) molekyylipaino määritettynä natriumdodekyylisulfaatti-levy-elektroforeesilla on noin 90 000-100 000;

(2) sen alkuperäisestä alfa-amylaasi-aktiivisuudesta on jäljellä vähintään noin 70 % 10 minuutin kuumennuksen jälkeen 90°C:ssa pH-arvossa 6,0 ilman kalsium-ionilisäystä;

(3) sen alkuperäisestä alfa-amylaasi-aktiivisuudesta on jäljellä vähintään noin 50 % 30 minuutin kuumennuksen jälkeen 85°C:ssa pH-arvossa 4,5 väliaineessa, jonka kalsium-ionipitoisuus on 0,005-m ja tärkkelyspitoisuus 22,5 paino-%;

(4) sen alkuperäisestä alfa-amylaasi-aktiivisuudesta on jäljellä vähintään noin 50 % 60 minuutin kuumennuksen jälkeen 90°C:ssa pH-arvossa 6,0 ilman kalsium-ionilisäystä; ja

(5) sen alkuperäisestä alfa-amylaasi-aktiivisuudesta on jäljellä vähintään noin 50 % 10 minuutin kuumennuksen jälkeen 80°C:ssa pH-arvossa 4,5 väliaineessa, jonka kalsium-ionipitoisuus on 0,005-m.

2. Menetelmä patenttivaatimuksen 1 mukaisen lämmön- ja haponkestävän alfa-amylaasi-entsyymin valmistamiseksi, t u n n e t t u siitä, että viljellään mikro-organismin *Bacillus stearothermophilus* kantaa ATCC 31 199 viljelyliemessä, joka sisältää assimiloituvaa hiili- ja typpilähdettä, pH-arvossa 5-9 lämpötila-alueella noin 50-70°C 1-5 vrk.

Patentkrav:

1. Värme- och syrastabilt alfa-amylasenzym, k ä n n e t e c k n a t därav, att det är framställt genom odling av mikroorganismens *Bacillus stearothermophilus* stam ATCC 31 199 och att det har följande egenskaper:

(1) molekyylvikten bestämd med natriumdodecylsulfatskivelektrofores är ca 90 000-100 000;

(2) det har efter 10 minuters upphettning vid 90°C i pH-värdet 6,0 utan kalciumiontillsats kvar minst ca 70 % av sin ursprungliga alfa-amylasaktivitet;

(3) det har efter 30 minuters upphettning vid 85°C i pH-värdet 4,5 i ett medium med en kalciumionhalt av 0,005-m och en stärkelsehalt av 22,5 vikt-% kvar minst ca 50 % av sin ursprungliga alfa-amylasaktivitet;

(4) det har efter 60 minuters upphettning vid 90°C i pH-värdet 6,0 utan kalciumiontillsats kvar minst ca 50 % av sin ursprungliga alfa-amylasaktivitet;

(5) det har efter 10 minuters upphettning vid 80°C i pH-värdet 4,5 i ett medium med en kalciumionhalt av 0,005-m kvar ca 50 % av sin ursprungliga alfa-amylasaktivitet.

2. Förfarande för framställning av värme- och syrastabilt alfa-amylasenzym enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att man i 1-5 dygn odlar mikroorganismens *Bacillus stearothermophilus* stam ATCC 31 199 i ett odlingsmedium, som innehåller kol- och kvävekällor som kan assimileras, vid pH-värdet 5-9 i temperaturområdet ca 50-70°C.

Viitejulkaisuja-Anförda publikationer

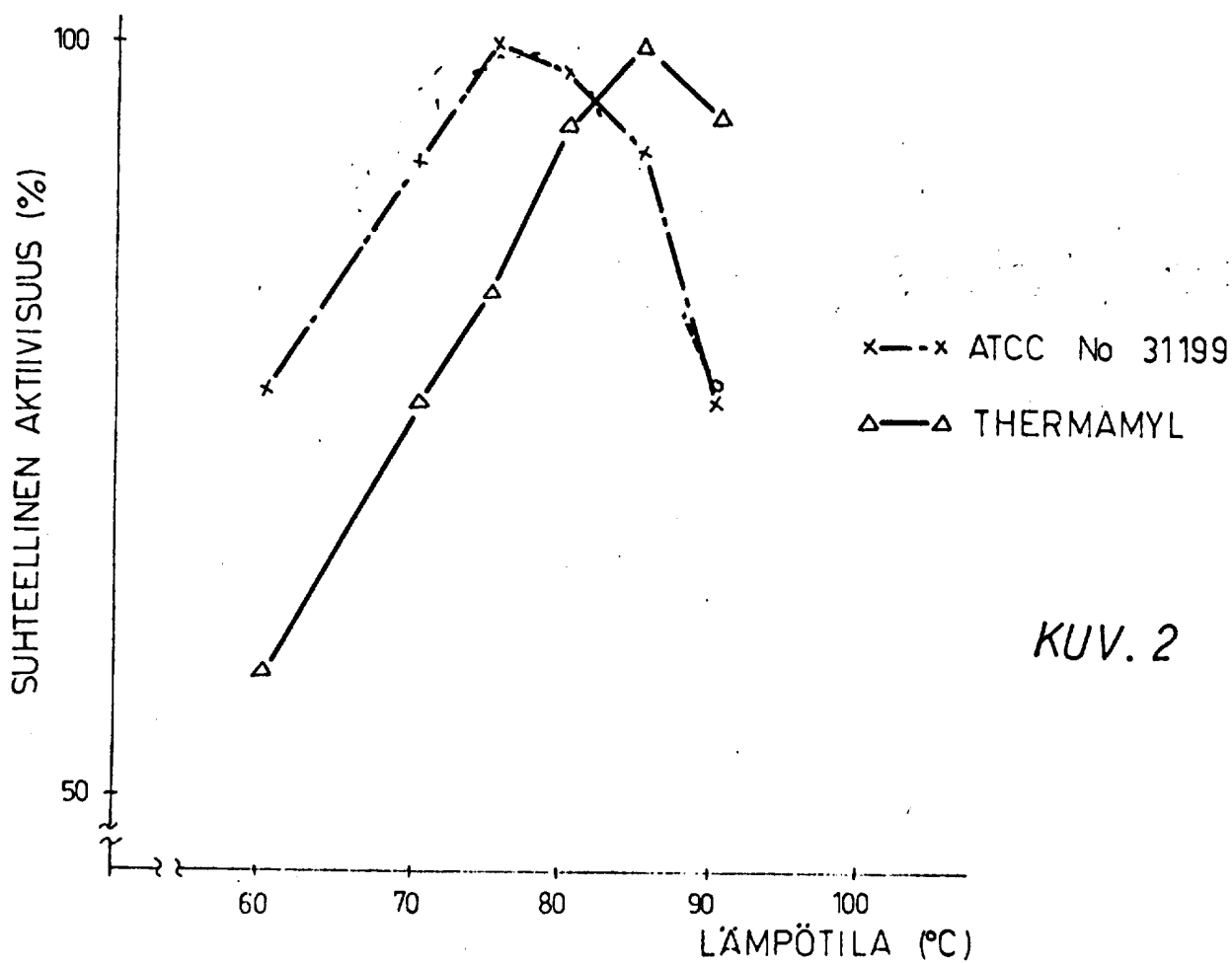
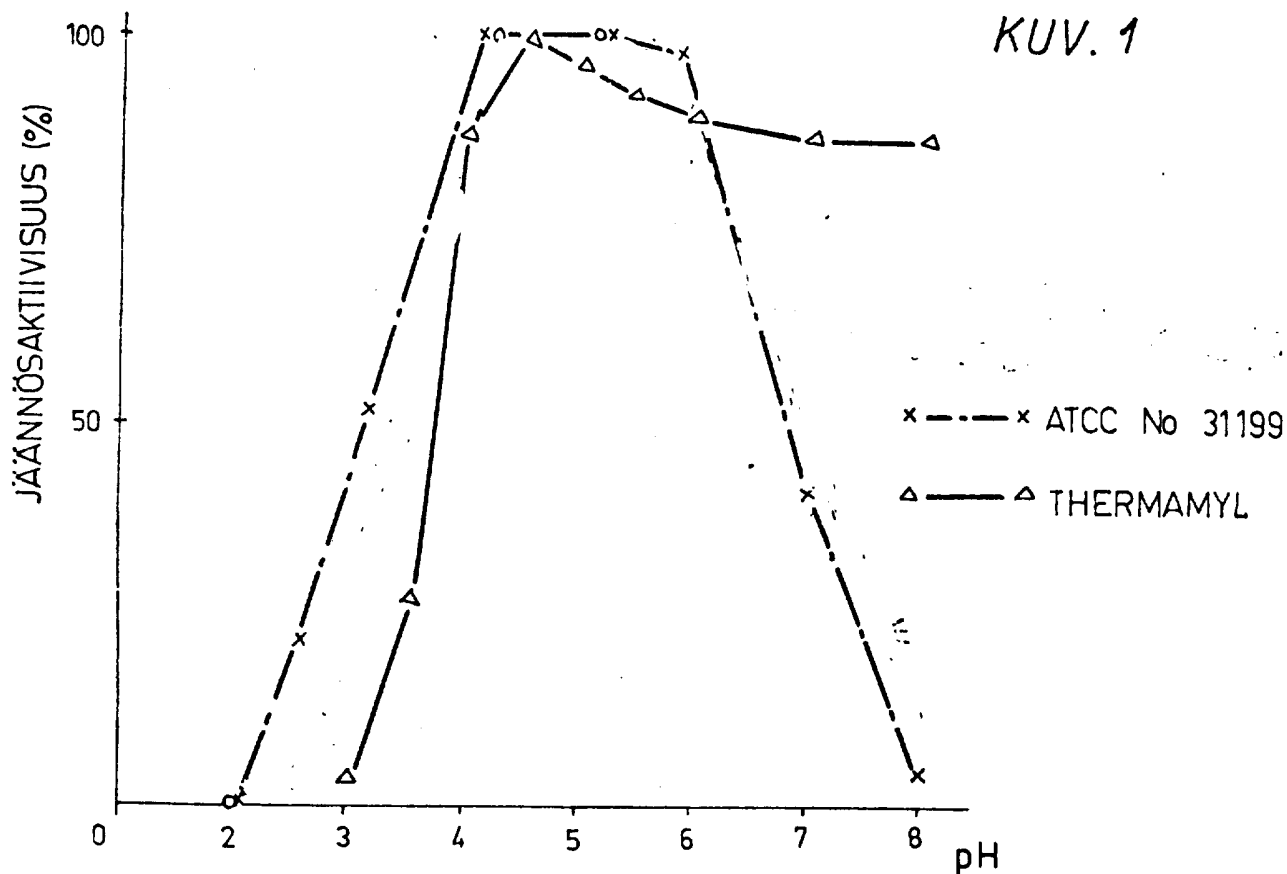
CA 80 (1974) 142154 d

83 (1975) 3107 g

Keksinnön mukaisen α -amylaasin ja tunnetun α -amylaasin (Thermamyl[®]) optimi-pH (kuvio 1) ja optimilämpötila (kuvio 2)

58157

KUV. 1

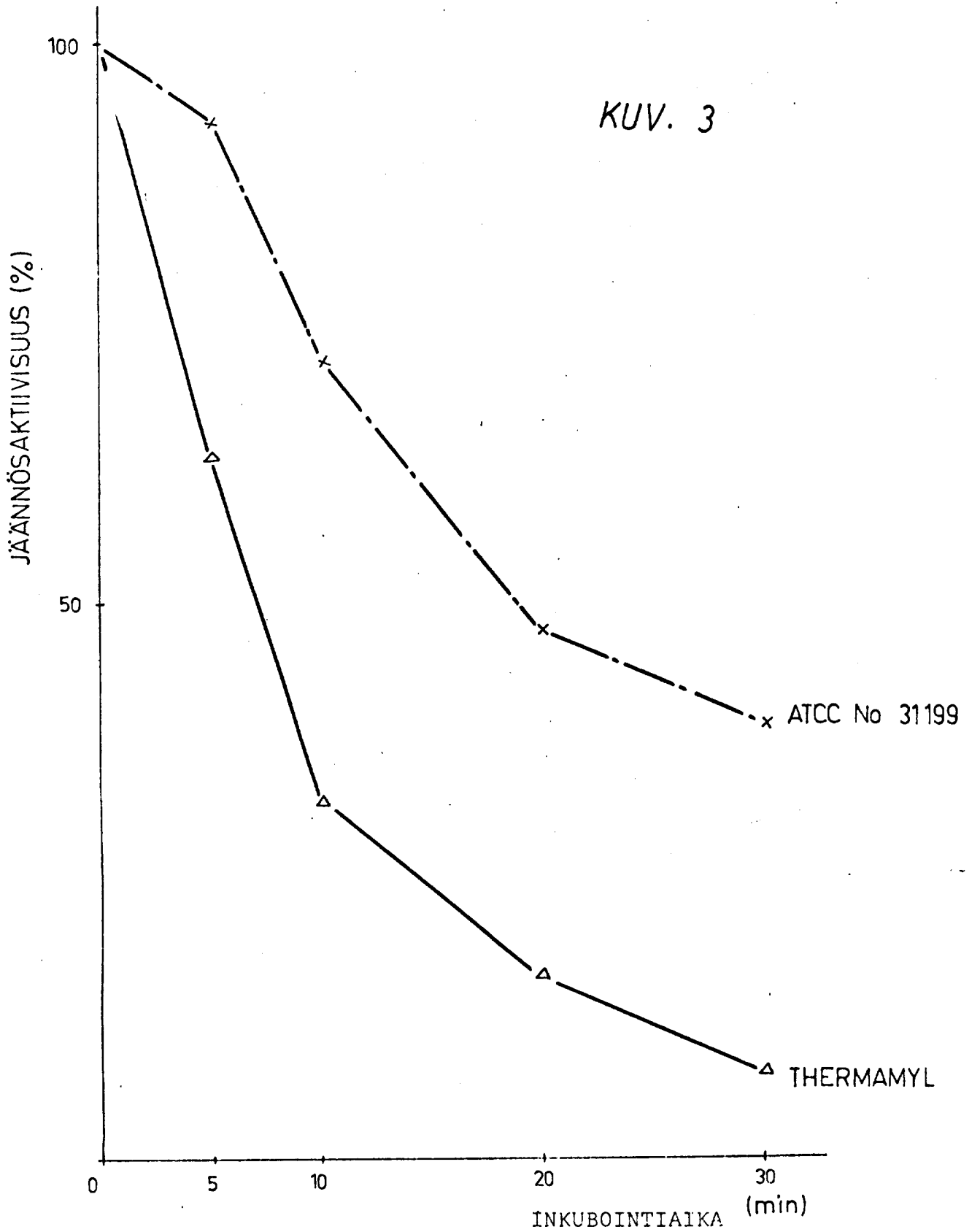


KUV. 2

Keksinnön mukaisen α -amylaasin ja tunnetun α -amylaasin (Thermamyl[®])
inkativoituminen 80°C:ssa pH 4,5:ssä

58157

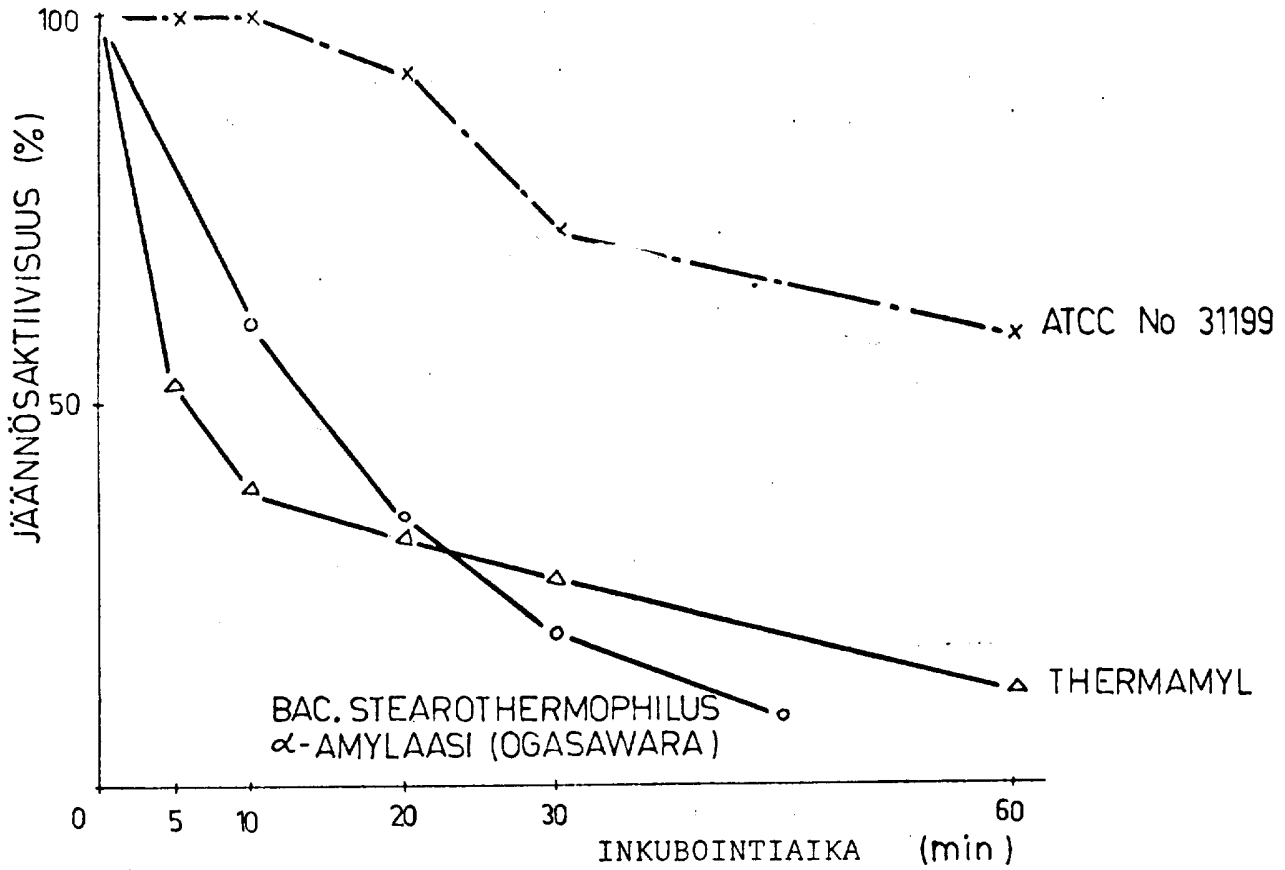
KUV. 3



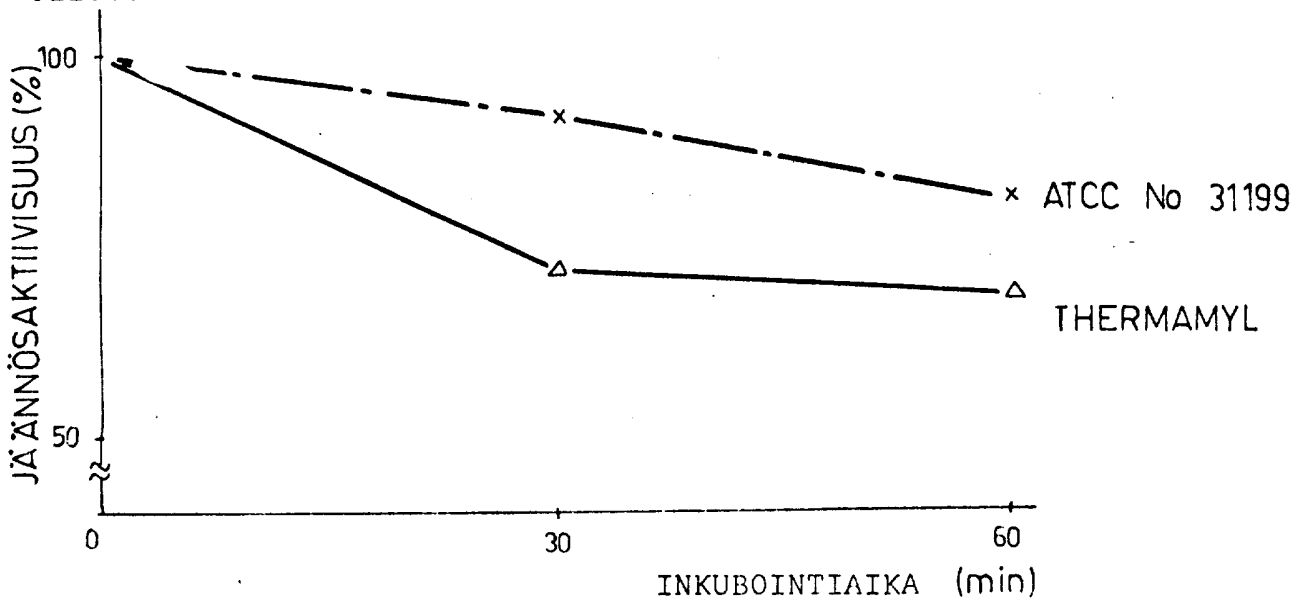
Keksinnön mukaisen α -amylaasin ja tunnettujen α -amylaasien (Thermamyl[®]) ja *Bacillus stearothermophilus*-lajin (Ogasawa et al) tuottama α -amylaasi) inaktivoituminen 90°C:ssa pH 6,0:ssa ilman Ca⁺⁺-ioneja

58157

KUV. 4



Keksinnön mukaisen α -amylaasin ja tunnetun α -amylaasin (Thermamyl[®]) inaktivoituminen 90°C:ssa pH 6,0:ssa ja Ca⁺⁺-ionien (1 mmooli) läsnäollessa

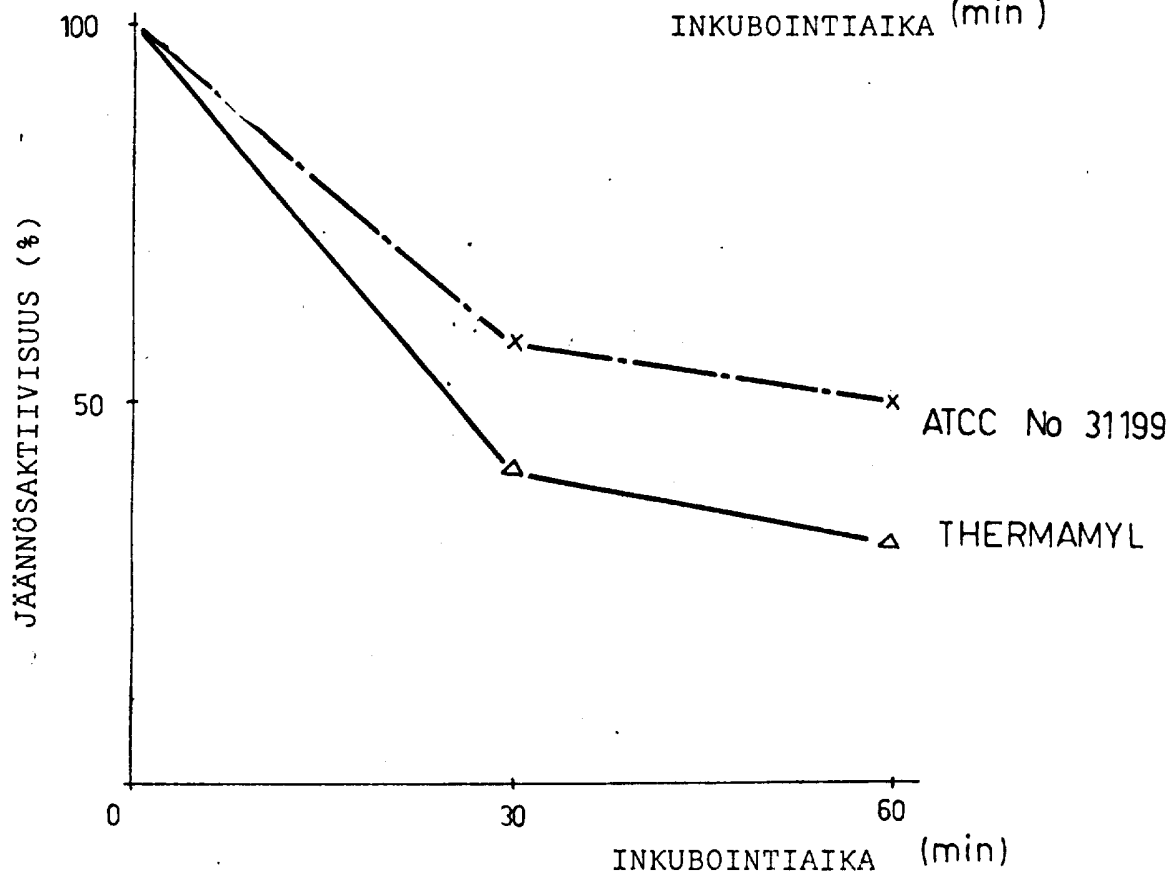
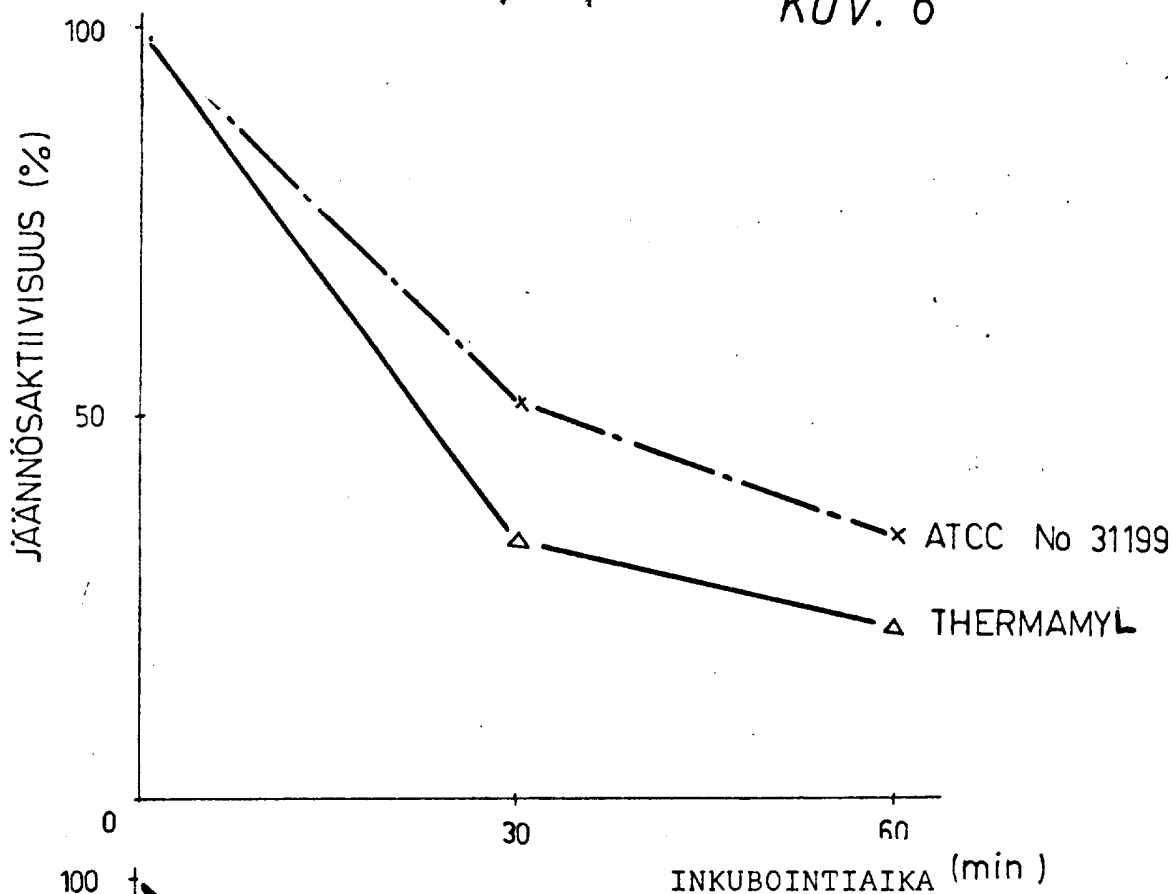


KUV. 5

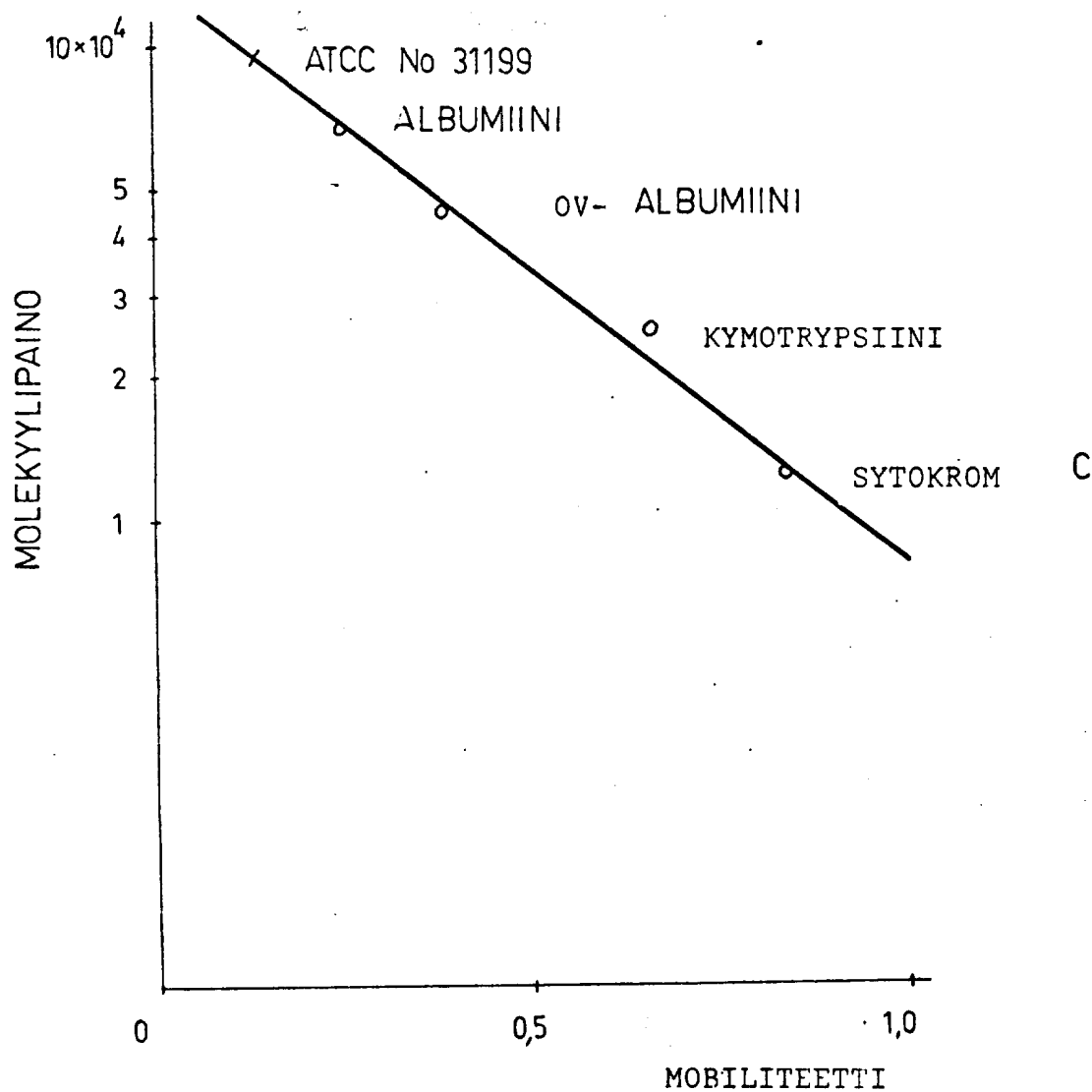
Keksinnön mukaisen α -amylaasin ja tunnetun α -amylaasin (Thermamyl[®]) inaktivoituminen 85°C:ssa pH 4,5:ssä liukoisen tärkkelyksen (22,5 % k.a.) ja Ca^{++} -ionien läsnäollessa (kuv. 6 Ca^{++} -konsentraatio 1 mmooli, kuv. 7 Ca^{++} -konsentraatio 5 mmoolia)

58157

KUV. 6

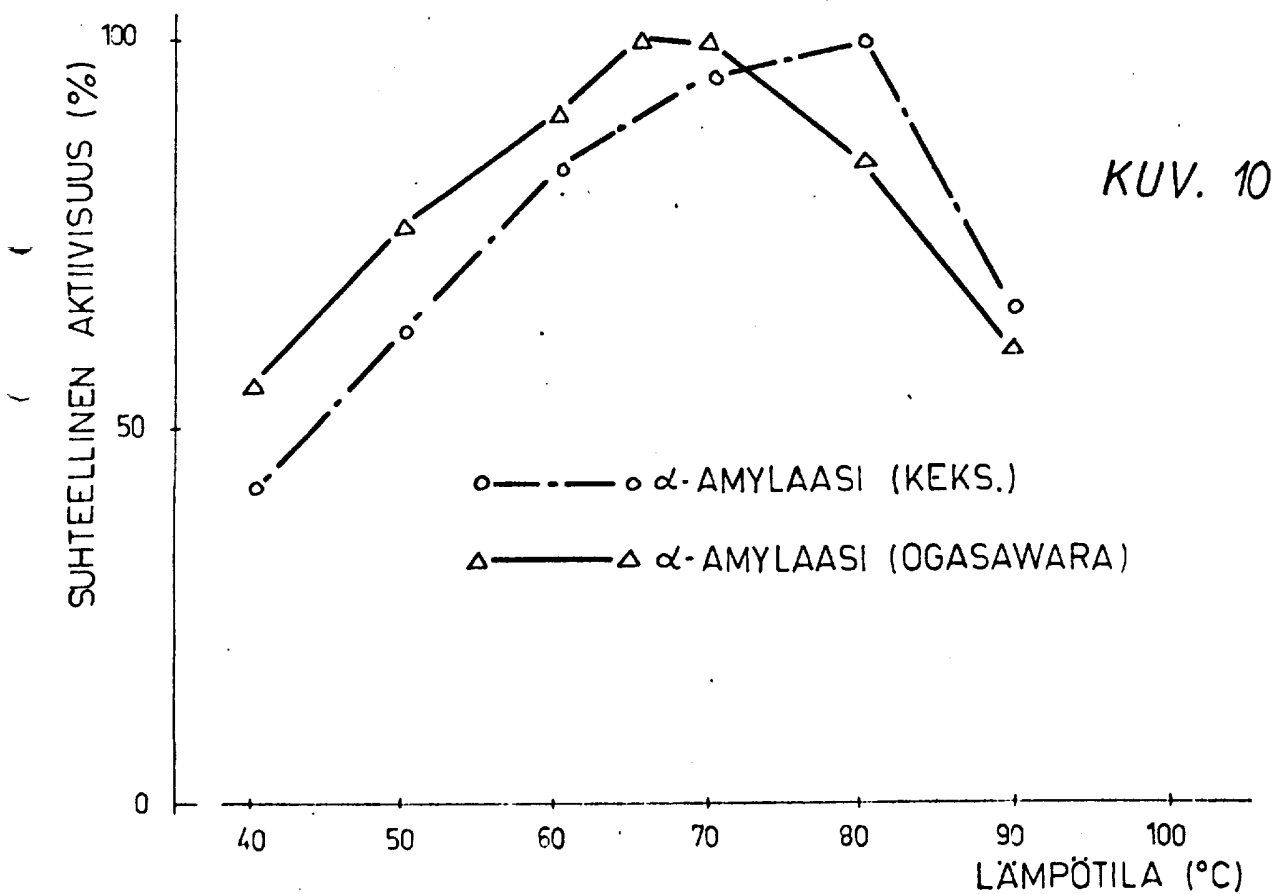
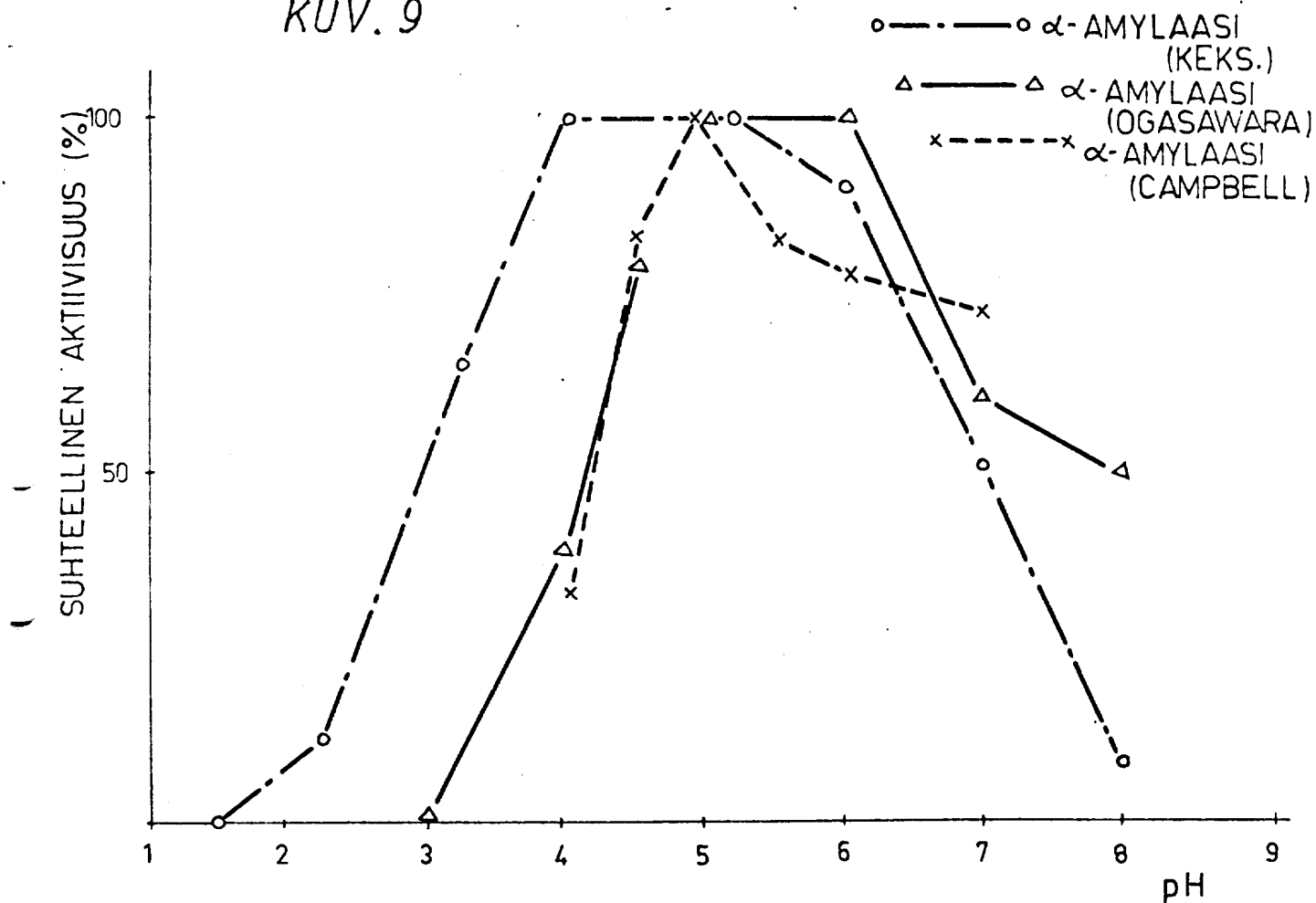


KUV. 7



KUV. 8

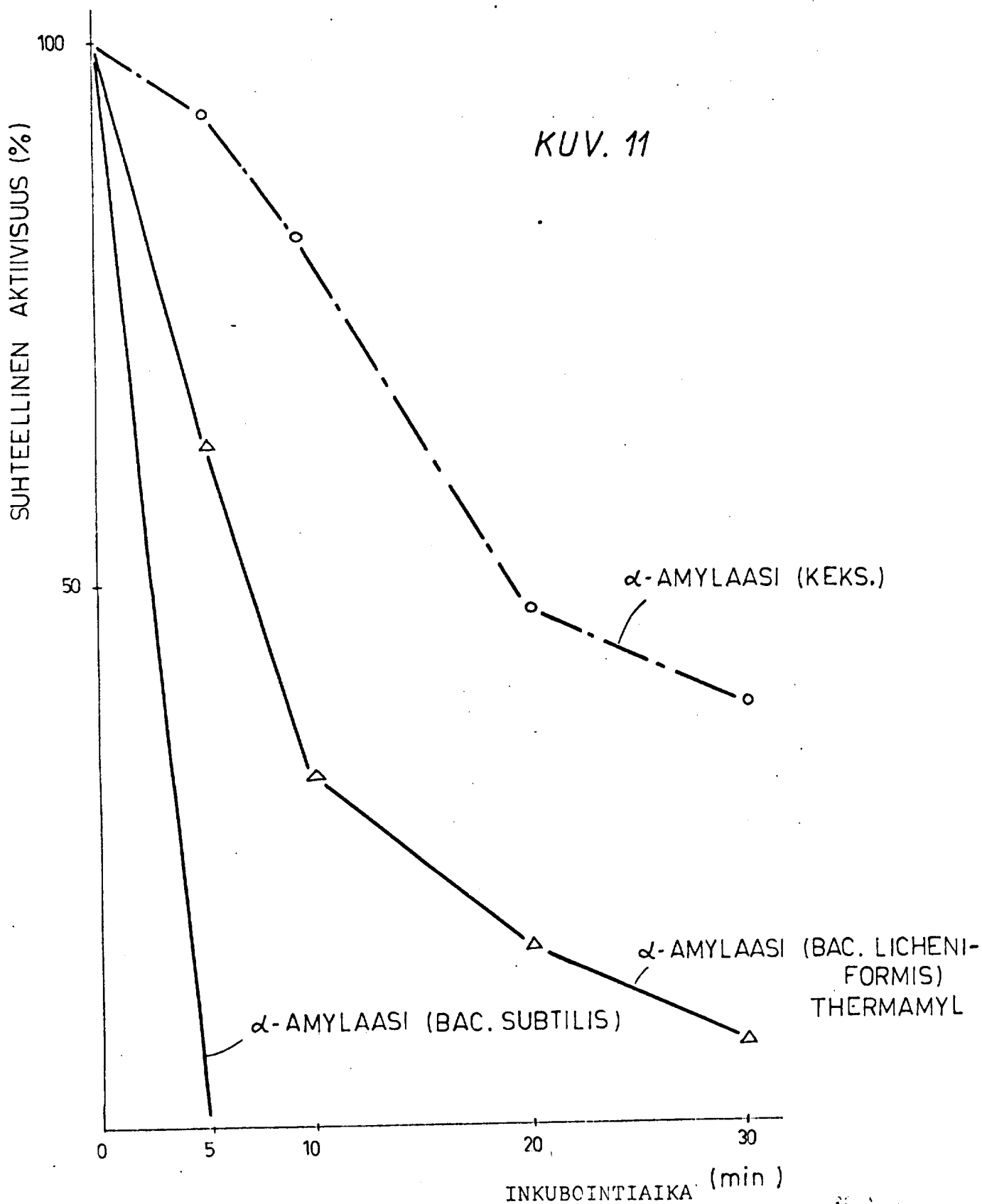
KUV. 9



Keksinnön mukaisen α -amylaasin ja tunnettujen α -amylaasien lämmönkestävyyden vertailu 80°C:ssa pH 4,5:ssä Ca^{++} - ionien läsnäollessa (5 mmoolia)

58157

KUV. 11



KUV. 12

