

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGESESSKRIFT



(11) 158522 B

- (21) Patentansøgning nr.: 2264/86 (51) Int.Cl.⁵ C 12 N 9/26
(22) Indleveringsdag: 15 maj 1986 C 12 P 7/06
(24) Løbedag: 13 sep 1985 C 12 P 19/22
(41) Alm. tilgængelig: 15 maj 1986
(44) Fremlagt: 28 maj 1990
(86) International ansøgning nr.: PCT/US85/01774
(86) International indleveringsdag: 13 sep 1985
(85) Videreførelsesdag: 15 maj 1986
(83) Deponering af mikroorganismer
(30) Prioritet: 18 sep 1984 US 652585
- (71) Ansøger: *MICHIGAN BIOTECHNOLOGY INSTITUTE; 276 Bessey Hall; Michigan State University; East Lansing; Michigan 48824, US
(72) Opfinder: Joseph Gregory *Zeikus; US, Hyung-Hwan *Hyun; US

(74) Fuldmægtig: Larsen & Birkeholm A/S Skandinavisk Patentbureau

(54) **Beta-amylase, samt fremstilling og anvendelse deraf**

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

2264-86

En termostabil og termoaktiv, ekstracellulær β -amylase bliver frembragt af Clostridium thermosulfurogenes. Fremgangsmåder til fremstilling af β -amylasen og anvendelse af den ved omdannelse af stivelse til maltose er også gjort kendt.

DK 158522 B

Opfindelsen angår en β -amylase, dennes fremstilling samt anvendelse deraf.

5 I fødevare- og drikkevareindustrierne bliver enzymet β -amylase (EC 3.2.1.41) hovedsageligt benyttet til at omdanne stivelse til opløsninger af maltose. β -amylase hydrolyserer α -1,4-glucosidbindingerne på en ekstern måde, idet hydrolysen påbegyndes i den ikke reducerende ende af substrater af stivelsestype og frembringer både maltose med den β -anomere konfiguration og β -grænsedekstriner ud fra stivelse. Den β -amylase, der bliver benyttet ved de fleste industrielle anvendelser, får man fra planter. Der er blevet 15 gjort forsøg på at få et mere aktivt, termostabilt og ekstracellulært enzym ud fra mikroorganismer. Imidlertid er de kendte mikrobielle β -amylaser ikke aktive eller termostabile nok til at kunne tjene som erstatning for planteenzymet. Man bliver derfor ved med 20 at bruge plante- β -amylaser til fremstilling af maltose, selvom de er dyre og forholdsvis ustabile.

Kun få enzymer, der er af industriel interesse i øjeblikket, er blevet isoleret og karakteriseret ud fra 25 termoanaerober. De termostabile og aktive enzymer, der til dato er karakteriseret og hidrører fra termoanaerober, inkluderer en endoglucanase fra *Clostridium thermocellum*, en alkoholdehydrogenase fra *Thermoanaerobium brockii* og *C. thermohydrosulfuricum* og 30 en polygalacturonathydrolyase fra *C. termosulfurogenes*. Det er åbenbart, at det ville være ønskeligt at have en β -amylase, der er mere termostabil end de, der i øjeblikket er tilgængelige.

Formålet med den nærværende opfindelse er at beskrive β -amylase og en fremgangsmåde til fremstilling deraf.

5 Dette formål opnås ved at lade organismen *Clostridium thermosulfurogenes* producere en β -amylase. Denne β -amylase ifølge opfindelsen er ekstracellulær og den er ejendommelig ved, at den har temperaturoptimum på ca. 75°C, er stabil op til 70°C i fravær af substrat
10 og op til 80°C ved tilstedeværelse af 5% stivelse, har pH-optimum i området ca. 5,5 til 6,0, er stabil ved pH ca. 3,5 til ca. 6,5, og kan fremstilles ved dyrkning af *Clostridium thermosulfurogenes* ATCC 33743 (DSM 2229) i et passende næringsmedium og påfølgende
15 isolering af den dannede β -amylase med de ovennævnte egenskaber fra kulturvæsken.

β -amylasen ifølge den nærværende opfindelse synes at være særligt egnet til brug ved industrielle anvendelser, idet β -amylasen er termostabil i langt højere grad end de i øjeblikket tilgængelige.
20

β -amylasen kan fremstilles ved at dyrke *C. thermosulfurogenes* anaerobt på et substrat bestående af stivelse i et næringsmedium, der indeholder essentielle vitaminer, mineraler og vækstfaktorer, indtil der kan påvises en væsentlig enzymatisk aktivitet, hvorefter β -amylasen bliver isoleret. β -amylasen fremstilles ekstracellulært og kan derfor let adskilles fra cellerne og isoleres på en rensset form, der i
25
30 alt væsentligt er fri for enzymatisk aktivitet, der griber forstyrrende ind.

Opfindelsen angår også en fremgangsmåde til at frem-

stille β -amylasen, hvilken fremgangsmåde er særegen ved, at en stamme af arten *Clostridium thermosulfurogenes* dyrkes anaerobt i et passende næringsmedium, hvorpå β -amylasen isoleres fra kulturvæsken.

5

β -amylasen får man fra den cellefri supernatant, der i alt væsentligt er fri for enzymatisk aktivitet, der griber forstyrrende ind.

10

En fordelagtig anvendelse af β -amylasen ifølge opfindelsen er at anvende den til fremstilling af maltose ud fra stivelse.

15

Ligeledes er det fordelagtigt at anvende β -amylasen ifølge opfindelsen til fremstilling af alkohol ud fra stivelse.

En detaljeret beskrivelse af fremstillingen og karakteriseringen af β -amylasen er givet i det følgende:

20

Organisme og dyrkning.

25

C. thermosulfurogenes stamme 4B blev isoleret fra måtten af alger og bakterier i Octopus Spring i Yellowstone National Park. Den blev deponeret i både Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (DSM 2229) og American Type Culture Collection, Rockville, Maryland (ATCC 33743), og deponeringerne er foretaget i henhold til Budapesttraktaten. Strengt anaerobe dyrkningsteknikker blev benyttet ved mediefremstilling og dyrkning. Organismen blev rutinemæssigt dyrket ved 60°C i 26 ml anaerobe trykrør, der indeholdt 10 ml TYE medium (24) med 0,5% glucose eller opløselig stivelse og N_2 - CO_2 (95:5) gas i rummet oven over væsken.

30

Dyrkningsmediet blev autoklaveret i 45 minutter for at opnå sikkerhed for, at man opnåede destruktion af ekstremt varmebestandige sporer af termoanaeroberne.

- 5 Til bestemmelse af stivelseshydrolysereaktionen på Petri skåle, blev der lavet stregkulturer i et anaerobt kammer på plader af TYE medium, der indeholdt 1,0% opløselig stivelse og 3,0% rensset agar. Pladerne blev anbragt i en anoxisk lukket beholder under nitrogen og inkuberet ved 60°C i 4 døgn. Pladerne blev fjernet fra beholderen og overhældt med iodopløsning (1% I₂ og 2% KI i H₂O) og hydrolysezonerne blev iagttaget visuelt.
- 10
- 15 Fremstilling af enzym.
- Vaskede celler og cellefri supernatant som kilder til amylasen blev fremstillet ved dyrkning af stammen i hætteflasker, der indeholdt 50 ml TYE medium med et indhold på 0,5% opløselig stivelse. Kulturer med stationær fase blev derpå centrifugeret ved 12.000 x g i 10 minutter. Cellesuspensioner blev fremstillet ved at vaske to gange med 20 mM natriumacetatbuffer (pH 6,0) og derpå suspendere cellerne i buffer. Dyrkning i stor skala til fremstilling af koncentreret ekstracellulær amylase blev udført i et fermenteringskar på 14 liter, hvilket fermenteringskar indeholdt 10 liter LPBB medium med 1,0% maltose og 0,02% gærekstrakt under N₂-CO₂ (95:5). En cellefri supernatant fik man ud fra kulturer dyrket ved 60°C indtil den sene eksponentielle fase, idet der blev brugt et centrifugesystem med kontinuerlig gennemstrømning. Supernatanten (10 liter) blev koncentreret ved først at udfælde proteiner med 2 rumfang kold ethanol (20 liter), der-
- 20
- 25
- 30

på filtrere gennem trækulspulver for at opsamle udfældningen, derefter suspendere udfældningen i 300 ml 20 mM natriumacetatbuffer (pH 6,0) og dernæst til-
5 sætte ammoniumsulfat op til 70%. De udfældede proteiner blev centrifugeret ved 15.000 x g og derpå suspenderet i 100 ml af den samme buffer som ovenfor. Denne suspension blev atter centrifugeret for at fjerne uopløselige materialer og derpå udfældet med 2 rumfang kold acetone. Denne sidste udfældning blev
10 suspenderet i 100 ml af den samme buffer, og derpå blev 100 ml af enzymopløsningen dialyseret mod 4 liter dobbelt destilleret vand i 24 timer.

15 Den specifikke aktivitet for den koncentrerede amylasesupernatant var 60 enheder pr. mg protein.

20 Celler blev dyrket og indhøstet til fremstilling af celleekstrakter ved den samme metode som beskrevet ovenfor, med den undtagelse, at der blev benyttet TYE medium suppleret med 0,5% opløselig stivelse. Celleekstrakter blev fremstillet anaerobt ved at suspendere 3 g våd cellepasta i 12,5 ml 20 mM natriumacetatbuffer (pH 6,0). Denne suspension blev behandlet ved 37°C i 1 time med 5 mg lysozym fra kyllingeæggehvide
25 og afbrudt ved passage gennem en fransk trykcelle ved 20.000 lb/in². Supernatanten blev opsamlet ved centrifugering ved 30.000 x g i 30 minutter ved 4°C. Proteinkoncentration blev bestemt.

30 Enzymstyrkebestemmelser.

Styrken af amylase- eller β -amylaseaktiviteten blev bestemt ved måling af mængden af reducerende sukkerarter frigjort ved den reaktion, hvori stivelse ind-

gik. Reaktionsblandingerne (4 ml) indeholdt 10% opløselig stivelse, 1 ml 0,5 M natriumacetatbuffer (pH 6,0) og 3 ml enzymopløsning, der var blevet fortyndet med vand. Reaktionen blev standset ved afkøling på is
5 efter 30 minutters inkubation ved 60°C. Den reducerende evne blev målt ved hjælp af dinitrosalicylsyremetoden.

Til styrkebestemmelse af pullulanaseaktiviteten bestod reaktionsblandingen af 0,5 ml 2% pullulan i en
10 0,2 M natriumacetatbuffer (pH 6,0) og 0,5 ml enzymopløsning. Efter inkubation ved 60°C i 30 minutter, blev reaktionen standset ved afkøling på is og ved tilsætning af 4 ml 3,5-dinitrosalicylsyre.

15 En enhed af amylase, β -amylase eller pullulanase er defineret som den mængde enzym, der frembragte 1 μ mol reducerende sukkerart i form af en glucosestandard pr. minut under de ovenfor angivne betingelser.

20 Styrken af glucoamylaseaktiviteten blev bestemt ved inkubering af 1 ml reaktionsblanding, der indeholdt 1% opløselig stivelse, 0,1 M natriumacetatbuffer (pH 4,8) og fortyndet enzymopløsning ved 60°C i 30 minutter.
25 Reaktionen blev øjeblikkeligt standset ved afkøling på is og derpå ved kogning på et dampbad i 10 minutter. Disse reaktionsblandinger blev centrifugeret for at fjerne uopløselige udfældninger, hvorefter den frigjorte glucose blev bestemt ved hexokinase og
30 glucose-6-phosphatdehydrogenasemetoden. En enhed af glucoamylase er defineret som den mængde enzym, der frembragte én μ mol glucose pr. minut under styrkebestemmelsens betingelser.

Kvalitativ og kvantitativ analyse af stivelsehydrolyseprodukter.

5 Enzym (12 enheder) blev anbragt i 20 ml 0,1 M natriumacetatbuffer (pH 6), der indeholdt 1% opløselig stivelse, og inkuberet ved 65°C. Prøver blev udtaget med mellemrum og indholdet af reducerende sukkerart og glucose blev bestemt som beskrevet ovenfor.

10 Maltose blev identificeret i stivelseshydrolysaterne ved hjælp af højtryksvæskechromatograf (HPLC). Adskillelsessystemet bestod af en væskechromatograf udstyret med en datastation, en brydningsindeksdetektor og en oligosaccharidanalysekolonne (300 x 7,8 mm)
15 forsynet med en "microguard" forkolonne (40 x 4,6 mm). Stivelseshydrolysatprøver blev centrifugeret ved 5.000 x g og sat på kolonnen (50 ml).

Bestemmelse af reducerende værdi og blåværdikurve.

20 En reaktionsblanding, i hvilken der blev brugt enzym og 0,25% amyloseopløsning i 0,1 M natriumacetatbuffer (pH 6,0), blev inkuberet ved 65°C. Prøver (0,5 ml) blev udtaget med 5 minutters mellemrum og blev placeret i reagensglas, der indeholdt 2 ml 0,1 M HCl til
25 bestemmelse af blåværdi. Efter blanding blev 0,5 ml prøver udtaget og sat til 5 ml iodopløsning (0,05 g iod og 0,5 g kaliumiodid pr. liter). Derpå blev absorbansen målt ved 620 nm i et spektrofotometer, i
30 hvilket der blev brugt iod-vand blindprøver. Blåværdien blev beregnet ved at dividere nedbrydningsproduktets absorbans med absorbansen for substrat-iod blindprøven og multiplicere med 100. En anden 0,5 ml prøve af reaktionsblandingen blev udtaget til bestem-

melse af den reducerende værdi. Den reducerende evne blev bestemt ved hjælp af Nelsons kolorimetrisk kobbermetode. Den totale carbohydratstyrke blev bestemt ved hjælp af phenol-svovlsyre metoden.

5

Undersøgelse af den optiske rotation.

En reaktionsblanding (5 ml), der bestod af en 1% opløsning af stivelse i 0,1 M natriumacetatbuffer (pH 6,0) og enzym, blev tilsat en 10 cm celle. Den optiske rotation blev målt ved stuetemperatur i et polarimeter under anvendelse af natriumlinien. Da den optimale rotation var blevet omtrentlig konstant, blev der tilsat ca. 20 mg fast natriumcarbonat, og blandingens mutarotation blev målt.

15

Enzymkarakterisering.

Grundige undersøgelser af enzyminhibering og -kinetik blev udført under de standardstyrkebestemmelsesbetingelser, der er beskrevet ovenfor. Ved de grundige undersøgelser af stabiliteten blev der benyttet en opløsning af enzym (ca. 40 enheder/ml) i 0,1 M natriumacetatbuffer (pH 6,0) under de beskrevne betingelser.

25

Lokalisering og type af amylaseaktiviteter.

Under foreløbige forsøg blev der fundet store rødlige farvezoner på en blå baggrund rundt omkring kolonier på stivelse-agar plader, der var blevet farvet med iodopløsning. Dette resultat indebar, at *C. thermosulfurogenes* frembringer amylaser, der ikke er i stand til at hydrolysere stivelse fuldstændigt.

30

I tabel 1 er resultaterne fra forsøg, der viser den cellulære lokalisering og typerne af forskellige amylaseaktiviteter hos *C. thermosulfurogenes*, opsummeret. Organismen frembragte ekstracellulær amylase, hvis aktivitet vil blive klassificeret nedenfor som β -amylase, men ikke ekstracellulær pullulanase eller glucoamylase under dens vækst. Desuden blev der påvist en til cellen knyttet glucoamylase- og amylase-, men ikke pullulanaseaktivitet. Hverken amylase- eller glucoamylaseaktiviteterne blev inhiberet af aerobe styrkebestemmelsesbetingelser.

Tabel 1: Amylolytiske enzymaktiviteter og cellulær lokalisering hos *C. thermosulfurogenes*^a

LOKALISERING - AKTIVITET				
enzym	styrkebe- stemmel- sesbeting- elser	super- natant (E/ml)	vaskede celler (E/ml)	cellefri ekstrakter (E/mg protein)
amylase	aerob	5.5	0.07	0.26
	anaerob	5.5	0.07	0.26
pullulanase	aerob	0.00	0.00	0.00
	anaerob	0.00	0.00	0.00
glucoamylase	aerob	0.00	0.02	0.07
	anaerob	0.00	0.02	0.07

^a*C. thermosulfurogenes* blev dyrket op til den sene eksponentielle fase på et TYE medium, der indeholdt 0,5% opløselig stivelse som carbonkilde. Anaerobe styrkebestemmelsesbetingelser blev etableret via til-

sætning af dithiothreitol (2 mM) og gennemledning af N_2 gas under fremstillingen af enzymopløsningen og alle reaktanterne.

5 HPLC analyse af stivelseshydrolysater dannet ved
hjælp af ekstracellulær amylase afslørede, at det u-
delukkende var maltose, der blev frembragt som et på-
viseligt produkt ud over oligosaccharider med høj mo-
lekylvægt (dvs. grænsedekstriner). Selv om der blev
10 benyttet en langvarig inkubation, blev der kun påvist
reducerende sukkerarter, men ikke glucose ved kvanti-
tativ analyse af stivelseshydrolysater. Enzymatisk
hydrolyse af maltotriose og maltotetraose blev også
undersøgt grundigt. Kun maltose (8 mg/ml) blev frem-
15 bragt som et resultat af inkubering af 1% maltotetra-
ose i 0,1 M natriumacetatbuffer med 12 enheder af en-
zymet ved 65°C i 3 timer. Under de selv samme betin-
gelser gav enzymatisk hydrolyse af maltotriose (1%)
både glucose (0,4 mg/ml) og maltose.

20 Udløsningen af den reducerende evne og formindskelsen
af iodfarvningskapaciteten ved enzymets indvirkning
på amylase blev bestemt. Den langsomme nedgang i blå-
værdien taget i forhold til den reducerende værdi i
25 sammenligning med den, som man fandt for α -amylase-
kontrollen, viser, at enzymet er en eksternt virkende
amylase. Ved grundige undersøgelser af mutarotatio-
nen, i hvilke undersøgelser der blev benyttet α -amy-
lase som kontrol, finder man, at der fremkommer en
30 opadgående forskydning i den optiske rotation ved
tilsætningen af base til stivelseshydrolysater, der
er dannet ved hjælp af *C. thermosulfurogenes* enzymet,
hvilken opadgående forskydning viser, at hydrolyse-
produkterne har en β -anomer konfiguration. De ovenfor

angivne data tilvejebragte beviset for, at den ekstracellulære amylaseaktivitet isoleret fra *C. thermo-sulfurogenes* var en β -amylase.

5 β -amylases fysisk kemiske egenskaber.

Virkning af temperaturen på β -amylaseaktiviteten blev bestemt. Den optimale temperatur for enzymaktiviteten var 75°C og 85% af den maksimale aktivitet blev målt ved 80°C. Da Arrhenious kurver for den specifikke aktivitet over for 1/temperaturerne var blevet tegnet op (er ikke angivet), blev der beregnet Q_{10} værdier på 1,7 for β -amylase, hvor Q_{10} , temperaturkoefficienten, er forholdet med reaktionshastigheden ved en bestemt, valgt temperatur og ved en temperatur, der er 10°C lavere end førstnævnte temperatur.

Temperatures påvirkning af stabiliteten af β -amylase i fravær af substrat blev også bestemt. Enzymet var fuldstændigt stabilt op til 70°C, og 83% af dets oprindelige aktivitet blev bibeholdt efter behandling ved 75°C i 1 time. Enzymet blev næsten fuldstændigt destrueret indenfor 20 minutter ved 80°C i fravær af stivelse, men tilsætning af stivelse til enzymopløsningen forøgede varmestabiliteten i et stort omfang taget i forhold til koncentrationen af stivelse. Enzymet var fuldstændigt stabilt ved 80°C i nærværelse af 5% stivelse.

30 Virkningen af pH på β -amylases aktivitet og stabilitet blev bestemt. Optimumsaktiviteten blev iagttaget ved pH 5,5 til 6,0, og aktiviteten faldt gradvis ved mere alkaliske eller sure pH værdier. En aktivitet større end 43% af den maksimale aktivitet blev på-

vist ved pH værdier mellem 2,5 og 9,0. Enzymet var stabilt i pH intervallet 3,5 til 6,5, men ustabil under pH 3,0 og over pH 7,5.

5 Virkningerne af sulfhydrylreagenser, metalioner og Schardinger dekstriner (α - og β -cyclodekstriner) på β -amylaseaktivitet blev undersøgt. β -amylaseaktiviteten blev kraftigt inhiberet af Cu^{++} , Hg^{++} og p-chlor-mercuribenzoat (PCMB), men svagt inhiberet af hydrogenperoxid, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoesyre, N-ethylmaleimid (NEM), iodeddikesyre og Zn^{++} . Inhiberingerne kunne forhindres og genoprettes ved tilsætning af dithiothreitol (10 mM). Mod forventning inhiberede Schardinger dekstrinerne ikke enzymaktiviteten og de blev ikke hydrolyseret af β -amylasen. Under de brugte styrkebestemmelsesbetingelser blev enzymaktiviteten ikke påvirket af tilsætningen af 1 til 30 mM calciumion.

20 Tabel 2: Virkninger af sulfhydrylreagenser, metalioner og Schardinger dekstriner på β -amylaseaktivitet.

Koncentration af tilsat reagens (mM)	% resterende aktivitet ^a
Ingen	100
Hydrogenperoxiddase - 1 5	98 86
5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoe syre (DTNB) - 0,2	96
N-ethylmaleimid (NEM) - 1 5	93 54
Iodacetat (IA) -1 5	100 52

	p-chlormercuribenzoesyre - 0,02	0,2
	(PCMB) - 0,1	0,0
	CuCl ₂ - 1	1,8
	HgCl ₂ - 1	0,0
5	ZnCl ₂ - 1	93
	-10	73
	CaCl ₂ - 5	100
	-30	100
	α -cyclodekstrin - 10	100
10	β -cyclodekstrin - 10	100

15 ^a100% svarer til 24,4 enheder/mg protein under standardstyrkebestemmelsesbetingelserne.

20 Virkningerne af ethanol på enzymaktiviteten og -stabiliteten blev også undersøgt. β -amylaseaktiviteten blev ikke kendeligt påvirket af tilstedeværelsen af 3% (v/v) ethanol, men den faldt langsomt i forhold til ethanolkoncentrationen, når ethanolkoncentrationen var større end 3% (v/v). Ved tilstedeværelsen af 10% (v/v) ethanol blev 65% af den maksimale aktivitet iagttaget. Denne virkning er tillagt udfældningen af

25 stivelsessubstrat forårsaget af ethanol, fordi β -amylase er fuldstændigt stabilt ved 65°C i 1 time ved tilstedeværelse af 10% (v/v) ethanol inden aktivitetbestemmelsen.

30 β -amylases kinetiske egenskaber.

De tilsyneladende kinetiske konstanter blev bestemt for β -amylase på stivelse kontra amylose ved bestemmelse af kurver, der fremstiller produktdannelses-

hastigheden som funktion af tiden. Det blev vist, at afhængigheden for hastigheden for den enzymatiske hydrolyse af substratkoncentrationen fulgte kinetikken ifølge Michaelis-Menten, og man fik lineære sammenhænge for $1/V$ som funktion af $1/S$. Den tilsyneladende $S_{0,5V}$ og V_{maks} som bestemt ud fra den to gange reciprokke graf for stivelse kontra amylose var: 1 mg/ml og 60 E/mg protein kontra henholdsvis 1,67 mg/ml og 30 E/mg protein.

10

Alment har man, at de forudgående data godtgør, at C. thermosulfurogenes frembringer både cellebundet glucoamylase- og ekstracellulære β -amylaseaktiviteter. β -amylasen bliver frembragt i stort udbytte som en primær metabolit under dyrkning på stivelse. β -amylasen besidder en høj termisk stabilitet, som kan gøre den industrielt anvendelig ved brygning og stivelsesforarbejdning.

15

Den ekstracellulære amylase blev klassificeret som en β -amylase på basis af visse kriterier. Indvirkningen af enzymet på stivelse gav kun maltose som et påviseligt produkt ved siden af grænsedekstrin med høj molekylvægt, men ikke glucose eller andre lavmolekylære maltosaccharider. Maltotetraosehydrolyse gav kun maltose, og maltotriose gav glucose og maltose. Enzymet var inaktivt over for pullulan, sucrose, cellobiose, trehalose, Schardinger dekstriner og maltose. En kraftig udlæsning af reduceringsevne sammen med en forholdsvis lille formindskelse af iodfarvningsevnen ved hydrolyse af amylose og den opadgående mutarotation af stivelsesnedbrydningsprodukt efter tilsætning af alkali viste, at enzymet virker på en ekstern måde og producerede maltose med den β -anomere konfigura-

25

30

tion. I disse henseender lignede den ekstracellulære amylase fra *C. thermosulfurogenes* de påvirkningsmønstre, der er knyttet til planteamylase og andre mikrobielle β -amylaser.

5

β -amylasen har industrielle anvendelser ved fremstillingen af opløsninger af forskellige sukkerarter eller alkoholer ud fra stivelse på grund af dens nye karakteristika. Enzymet er ekstracellulært, en primær metabolit og det er aktivt og stabilt ved høj temperatur. Enzymet fremviser en høj maksimumstemperatur (75°C) for enzymaktivitet og er stabilt op til 80°C ved tilstedeværelse af substrat. β -amylasen er også aktiv og stabil over et bredt interval for pH. Den har en optimal aktivitet (pH 5,5-6,0) og stabilitet (pH 3,5-6,5) i det sure område, hvilket adskiller den fra de fleste andre β -amylaser, der fremviser optimal aktivitet og stabilitet omkring et neutralt pH. β -amylasen kan også have nye anvendelser ved produktion af maltosesirupper sammen med en pullulanase, der er aktiv ved næsten det samme pH og i næsten det samme temperaturinterval.

10

15

20

25

30

β -amylaser fra højere planter og mikroorganismer er sulfhydrylzymer og bliver inaktiveret af sulfhydrylreagenser og oxidation. De nærværende data viser, at *C. thermosulfurogenes* β -amylase også bliver inaktiveret af sulfhydrylreagenser (dvs. PCMB, NEM). Imidlertid kunne denne inhibering forhindres eller vendes om ved hjælp af tilsætning af reduktionsmiddel (dithiothreitol). Også metalioner (f.eks. Cu^{++} , Hg^{++} , og Fe^{++}) inhiberede β -amylasen. Imidlertid inhiberede Schardinger dekstriner, der er betydningsfulde konkurrerende inhibitorer over for andre β -amylaser

(5,6), ikke β -amylasen fra *C. thermosulfurogenes*.

5 β -amylaseaktiviteten og -stabiliteten blev kun påvirket meget lidt af ethanol, selv om væksten af denne mikroorganisme var meget følsom (dvs. ingen vækst ved tilstedeværelse af 2% ethanol).

P A T E N T K R A V

1. β -amylase, k e n d e t e g n e t ved, at den
5 har temperaturoptimum på ca. 75°C, er stabil op til
70°C i fravær af substrat og op til 80°C ved tilste-
deværelse af 5% stivelse, har pH-optimum i området
ca. 5,5 til ca. 6,0, er stabil ved pH ca. 3,5 til ca.
6,5, og kan fremstilles ved dyrkning af Clostridium
10 thermosulfurogenes ATCC 33743 (DSM 2229) i et passen-
de næringsmedium og påfølgende isolering af den dan-
nede β -amylase med de ovennævnte egenskaber fra kul-
turvæsken
- 15 2. Anvendelse af β -amylasen ifølge krav 1 til at
fremstille maltose ud fra stivelse.
3. Anvendelse af β -amylasen ifølge krav 1 ved frem-
stillingen af alkohol ud fra stivelse.
- 20 4. Fremgangsmåde til fremstilling af β -amylasen i-
følge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at en
stamme af arten Clostridium thermosulfurogenes dyrkes
anaerobt i et passende næringsmedium, hvorpå β -amyla-
25 sen isoleres fra kulturvæsken.