

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 924294 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentsökan - Patent application **924294**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 9/10

C12N 1/21

C12N 15/54

C12P 19/18

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **22.03.1991**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **25.09.1992**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **25.09.1992**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **22.03.1991 PCT/EP1991/000560**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

27.03.1990 DE 4009822

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Consortium für Elektrochemische, Zielstrattstrasse 20 8000 München 70, BRD, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Schmid, Gerhard, Germany, SAKSA, (DE)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Leitzinger Oy, High Tech Center, Tammasaarenkatu 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

y-CGTaasi

y-CGTas

γ -CGTaasi. - γ -CGTas.

Keksinnön kohteena ovat pääasiallisesti γ -syklodekstriiniä tuottavat syklodekstriiniglykosyylitransferaasit, jotka muodostavat tärkkelys-substraatin kanssa pääasiallisesti γ -syklodekstriiniä ja sivutuotteina lähes yksinomaan syklisiä oligosakkarideja.

Syklodekstriiniglykosyylitransferaasi-entsyymi (lyh.: CGTaasi) E.C.2.4.1.19 katalysoi syklodekstriinien muodostumista tärkkelyksestä. Niiden glukoosiyksiköiden lukumäärän perusteella, joista syklodekstriini (CD) koostuu, erotetaan α -CD (6 glukoosiyksikköä), β -CD (7 glukoosiyksikköä) ja γ -CD (8 glukoosiyksikköä).

Tähän mennessä tunnetaan kahden tyyppisiä CGTaaseja:

- a) pääasiallisesti α -syklodekstriiniä muodostavat CGTaasit, joita kutsutaan myös α -CGTaaseiksi, kuten esimerkiksi seuraavien bakteereiden CGTaasit: Bacillus macerans (brittiläinen patentti GB 2169 902), Klebsiella pneumoniae (EP-A 220 714) ja Bacillus stearothermophilus (brittiläinen patentti GB 2169 902).
- b) pääasiallisesti β -syklodekstriiniä muodostavat CGTaasit eli β -CGTaasit, kuten esimerkiksi seuraavien bakteereiden CGTaasit: Bacillus circulans (US 4,477,568), Bacillus megaterium (US-patentti 38 12 011), Bacillus ohbensis (JP 74 124 285), Micrococcus sp. (EP-A 017 242) ja alkalofiilinen Bacillus sp. (J. Gen. Microbiol. 1988, 134, 97-105; Appl. Microbiol. Biotechnol. 1987, 26, 149-153).

γ -CGTaasista on kirjallisuudessa tähän mennessä kaksi viitettä:

- a) Etanolia lisättäessä tuottaa Bacillus sp.:n syklodekstriini-

glykosyyli transferaasi pääosaltaan β - ja γ -syklodekstriinin seosta (10,4 - 18,7 %) (JP 63,133,998). Entsyymien kineettisiä ominaisuuksia ei ole karakterisoitu, joten sitä ei luokitella johonkin erityiseen tyyppiin.

- b) Kahdessa artikkelissa (Agric. Biol. Chem., 1986, 50 (8), 2161-2162 ja Denpun Kagaku 1986, 33, 137) on kuvattu Bacillus subtilis n:o 313:n γ -CGTaasi. Tälle CGTaasille on tunnusomaista γ -syklodekstriiniin ja lineaaristen oligosakkaridien muodostuminen. Koska CGTaasit muodostavat tärkeyksestä ainoastaan syklisiä tuotteita, tässä "CGTaasissa" on kysymys α -amylaasin (muodostaa tärkeyksestä lineaarisia oligosakkarideja) ja CGTaasin välimuoto. Tämä " γ -CGTaasi" ei sovellu γ -syklodekstriinin valmistamiseen, koska sillä päästään vain alhaisiin saantoihin (kts. EP-A 327 099, 2. sivu, rivit 40-43).

Keksinnön tavoitteena oli sen vuoksi valmistaa entsyymejä, jotka tuottavat pääasiallisesti γ -syklodekstriiniä. Tähän tavoitteeseen päästiin seulomalla bakteereita γ -CGTaasin erityksen suhteen, karakterisoimalla nämä bakteerit ja puhdistamalla ja karakterisoimalla biokemiallisesti bakteereiden γ -CGTaasit.

γ -Syklodekstriiniglykosyyli transferaasit ovat keksinnön mielessä pääasiallisesti γ -syklodekstriiniä tuottavia γ -syklodekstriiniglykosyyli transferaaseja, jotka muodostavat tärkekelyssubstraatin kanssa pääasiallisesti γ -syklodekstriiniä ja sivutuotteina lähes yksinomaan syklisiä oligosakkarideja. Bakteereiden seulomiseen γ -CGTaasin tuoton suhteen käytetään ensisijaisesti tärkekelystä hajottavia, erityisen mielellään alkalofiilisiä tärkekelystä hajottavia bakteereita.

γ -CGTaasia tuottavien bakteereiden karakterisointia varten määritetään bakteereiden muoto, leveys, pituus ja liikkuvuus.

Lisäksi selvitetään niiden värjäytyvyys gram-reaktiossa, niiden kyky katalaasin muodostamiseen sekä niiden GC-pitoisuus. Lisäksi määritetään niiden kasvuominaisuudet eri lämpötiloissa, eri pH-arvoissa ja eri NaCl-konsentraatioissa.

γ -CGTaasin puhdistamisen jälkeen karakterisoidaan entsyymi biokemiallisesti. Siten määritetään esimerkiksi entsyymin molekyylipaino, pH-optimi, pH-stabiilisuus, lämpötila-optimi ja lämpötila-stabiilisuus.

γ -CGTaasin saannon nostamiseksi muutetaan koodaavaa geeniä geeniteknologisesti ja ekspressoidaan erityismutanteissa. Tätä varten geeni ensin kloonataan ja sekvensoidaan. Geeni kloonataan mieluummin *E. coli*in. Tunnistettu geeni laitetaan sen jälkeen promoottorin, mieluummin säädeltävän promoottorin (esimerkiksi λ P_L-, trp-, lac-, trc-promoottori), erityisen mielellään laktoosilla indusoitavan tac-promoottorin, kontrollin alaiseksi. Tämä tekee mahdolliseksi γ -CGTaasin ohjattavan yliekspressoinnin. Optimaalista erittymistä varten on mielekästä käyttää signaali-peptidiä. Oman signaali-peptidin käyttäminen sopii hyvin γ -CGTaasin erittymiselle.

γ -CGTaasin tuottamista varten laitetaan mikro-organismeihin, mieluummin *E. coli*in, erityisen mielellään *E. coli*n erityismutantiin, vektori, joka sisältää γ -CGTaasia koodaavan geenin ja Leader-sekvenssin lisäksi myös säätelyelementtejä, kuten esimerkiksi tac-promoottorin. Sopivia erityismutanteja voidaan valmistaa patenttijulkaisussa EP-A-338 410 julkaistulla menetelmällä. Ylituotto ja γ -CGTaasin erittyminen viljelyalustaan saadaan aikaan indusoimalla promoottori, tac-promoottorin tapauksessa laktoosilla tai IPTG:lla. Keksinnön mukainen proteiini voidaan puhdistaa tunnetulla tavalla erityismutantin supernatantista.

Tässä kuvatuilla entsyymeillä valmistetaan ensi kertaa pää-

asiallisesti γ -syklodekstriiniä tuottavia CGTaaseja, jotka muodostavat tärkkelyssubstraatin kanssa pääasiallisesti γ -syklodekstriiniä ja sivutuotteina lähes yksinomaan syklistä oligosakkarideja.

Kuvatuilla geeniteknisillä menetelmillä voidaan saada entsyymejä suurempia määriä kuin on mahdollista niiden luontoperäisestä lähtömikro-organismeista. Entsyymien avulla voidaan lyhentää paljon γ -syklodekstriinien valmistusaikaa menetelmällä, joka on kuvattu US-patentissa 4,822,874.

γ -Syklodekstriinit lisäävät mm. hydrofobisten aineiden liukoisuutta vesiliuokseen, ne stabiloivat labiileja aineita (esim. suojaavat UV-valolta, suojaavat hapettumiselta) ja sitovat haihtuvia aineita. γ -Syklodekstriiniä voidaan käyttää myös formulointiaineena. γ -Syklodekstriinejä voidaan käyttää mm. seuraavilla aloilla: Farmaseuttinen teollisuus

Elintarviketeollisuus

Kosmetiikka

Kasvinsuojelu

Kemian teollisuus.

Esimerkeissä on kuvattu keksinnön mukaisen γ -CGTaasin eristäminen, sen geenitekkinen modifiointi sekä tämän γ -CGTaasin yliekspressointi alkalofiilisestä *Bacillus* 290-3-bakteerista (DSM 5850, tallennettu 19.3.90 DSM-kokoelmaan, Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen).

Kuvio 1: Alkalofiilisen *Bacillus*-bakteerikannan 290-3

γ -CGTaasin β - ja γ -syklodekstriinin tuottokinetiikka

Kuvio 2: *Bacillus* 290-3:sta saadun γ -CGTaasin avoin lukukehys

Kuvio 3: γ -CGTaasin yliekspressointiin käytetty tac-promoottori-plasmidi pJF118u

Kuvio 4: Synteettiset oligonukleotidit M8 ja M9

Kuvio 5: Ekspressointiplasmidi pCM750

Kuvio 6: Synteettiset oligonukleotidit M10, M11, M12 ja M13

Kuvio 7: Plasmidi pCM720

Esimerkki 1: γ -CGTaasia tuottavien alkalofiilisten bakteerien seulonta

Mitä erilaisimmista maa-alueista kerättiin maanäytteitä. Punnittiin 0,1 - 0,2 g maata ja tämä lietettiin steriileihin astioihin yhdessä 1 ml:n kanssa steriiliä fysiologista keittosuolaliuosta. Karkean aineksen laskeuduttua maljattiin kulloinkin 0,1 ml tärkkelys agarmaljalle (alusta 1: 10 g/l liuokoinen tärkkelys; 5 g/l peptoni; 5 g/l hiivauute; 1 g/l KH_2PO_4 ; 0,2 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 10 g/l Na_2CO_3 ; 15 g/l Agar; pH 10,4). Agarmaljoilla inkuboitiin 30°C:ssa 2 - 3 päivää. Tärkkelystä hajottavien bakteereiden pesäkkeillä näkyi samaa rengas, joka syntyi pienimolekyylisten tärkkelysmolekyylien uudelleenliittymisestä. Pesäkkeet eristettiin ja puhdistettiin kaksi kertaa tärkkelysagarmaljoilla. Tämän jälkeen kasvatettiin 2 ml:ssa nestemäistä alustaa, jolla oli edellä annettu koostumus. 48 tunnin inkuboinnin jälkeen 30°C:ssa erotettiin solut sentrifugoimalla ja supernatantista testattiin CGTaasi-aktiivisuus. 200 μl supernatanttia ja 200 μl 10-prosenttista tärkkelysliuosta inkuboitiin 40°C:ssa 1 - 5 tuntia 20 mM Tris/HCl pH 9,0; 5 mM CaCl_2 -liuoksessa. Entsyymireaktio pysäytettiin lisäämällä 600 μl metanolia ja supernatantti analysoitiin HPLC:n avulla sentrifugoinnin jälkeen. Lukuisista eristetyistä pesäkkeistä eristettiin Bacillus-kanta 290-3, joka erittää viljelyalustaan CGTaasia, joka kineettisesti muodostaa ensisijaisesti γ -syklodekstriiniä (kuvio 1).

Esimerkki 2: Bacillus-kannan 290-3 taksonominen karakterisointi

Taksonominen ryhmittäminen antoi tulokseksi, että kysymys on gram-positiivisesta, itiöitä muodostavasta bakteerista, joka on luettava tähän mennessä epätasaisesti karakterisoituun Bacillus firmus/lentus-ryhmään (kts. taulukko 1).

Taulukko 1: Eristeen 290-3 taksonomiset tunnusmerkit

Ominaisuudet	Bacillus 290-3
Sauvoja	+
Leveys μm	0,7-0,9
Pituus μm	2,5-4,0
Liikkuvuus	+
Endosporit	+
Gram-reaktio	+
Katalaasi	+
Suurin lämpötila	-
Kasvu positiivinen $^{\circ}\text{C}$:ssa	40
Kasvu negatiivinen $^{\circ}\text{C}$:ssa	45
Kasvu	
Alustassa pH 5,7	-
Alustassa pH 7,0	-
NaCl 5 %	+
7 %	..+
mol % G+C	36,6

Esimerkki 3: γ -CGTaasin puhdistaminen

Bacillus-kantaa 290-3 kasvatettiin alustassa 1 (kts. esimerkki 1). 48 tunnin kasvuajan jälkeen solut erotettiin sentrifugomalla ja viljelysupernatanttiin lisättiin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:a, kunnes kyllästysaste oli 66 %. Seosta säilytettiin 1 tunti 4°C :ssa ja sen jälkeen sakka erotettiin sentrifugomalla $10\,000 \times g$; 20 min.). Sakka suspendoitiin uudelleen 1/100:aan lähtötilavuudesta puskuria A (20 mM Tris/Cl pH 8,5, 5 mM CaCl_2 , 0,05 % γ -CD) ja dialysoitiin sen jälkeen samaa puskuria vasten. Sentrifugoinnin (10 min.; $10\,000 \times g$) jälkeen entsyymiliuos vietiin affinitettipylvääseen (γ -syklodekstriini, kytketty Sepharöse 6B-hartsiiin butyylidiglysidyylietterin avulla). Eluointi suoritettiin puskurilla A, johon oli lisätty 1 % γ -syklodekstriiniä.

Eluoitu proteiinimateriaali väkevöitiin saostamalla ammoniumsulfaatilla ja dialysoitiin uudelleen. Proteiinin puhtautta kontrolloitiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesin avulla.

Esimerkki 4: γ -CGTaasin biokemiallinen karakterisointi

γ -CGTaasin biokemiallinen karakterisointi antoi seuraavat tulokset:

Molekyylipaino 75 000 Da

pH-optimi 6,0 - 8,0

pH-stabiilisuus 5,0 - 10,0

Lämpötila-optimi 60°C

Lämpötila-stabiilisuus 50°C asti

Esimerkki 5: γ -CGTaasin geenin kloonauk ja sekvensointi

Kloonauk:

Bacillus-kannan 290-3 kromosomaalinen DNA pilkottiin osittain restriktioentsyymillä Sau 3A, fragmentit fraktioitiin suuruuden perusteella agarosigeelielektroforeesin avulla, minkä jälkeen nämä DNA-palat kloonattiin plasmidiin pUC18 (pilkottu BamHI:lla).

2×10^4 tämän geenipankin kloonin analysoitiin pesäkkeiden hybridisointikokeissa (Maniatis et al. 1982, Cold Spring Harbor Laboratory) Bacillus 1-1:n β -CGTaasin koodaavan alueen radioaktiivisesti leimatulla, 1,6 Kb suurella DNA-fragmentilla (BglIII-PstI) (Proc. 4th Int. Symposium on Cyclodextrins (Huber O., Szejtli J., eds) 1988, s. 71-76, Kluwer Academic). Tällöin tunnistettiin kloonit p19 ja p43, joiden plasmideissa oli γ -CGTaasigeeni.

Sekvensointi:

γ -CGTaasi-rakennegeenin nukleotidisekvenssin määrittämistä varten DNA-fragmentit kloonattiin edelleen plasmidiin pUC18 tai pUC19. Näiden plasmidien insertteihin tehtiin deletiot eksonukleaasi III:lla siten, että "Sanger'in dideoksi-ketjunkatkaisumenetelmän" mukainen DNA-sekvensointi johti päällekkäisiin sekvensseihin (DNA, 1985, 4, 165-170). γ -CGTaasia koodaava avoin lukukehys käsittää 2097 nukleotidia (kuvio 2). Tästä johdettu proteiini muodostuu 699 aminohaposta, ja sen molekyylipaino on 78 000 Da. Signaaliptidin poislohkaisemisen jälkeen molekyylipainoksi saadaan 75 000 Da.

Esimerkki 6: γ -CGTaasin ekspressoointi ja erittyminen E.colissa

γ -CGTaasin yliekspressoointiin käytettiin "tac"-promoottoriplas-

midia pJF118u (kuvio 3). Plasmidi pilkottiin restriktioentsyymeillä EcoRI ja HindIII ja agaroosigeelielektroforeesin avulla erotettiin pieni DNA-fragmentti "poly-linkkeristä".

Plasmidi p19 (kts. esimerkki 5) pilkottiin AccI:lla ja HindIII:lla ja agaroosigeelielektroforeesin avulla eristettiin 2,4 kb suuruinen DNA-fragmentti, jossa γ -CGTaasin rakennegeeni on lähes täydellisenä. Geenin 5'-päästä (kts. "AccI-kohta" kuviossa 2) puuttuu lyhyt, signaalipeptidiä koodaava alue. Tämä alue korvataan kahdella synteettisellä oligonukleotidillä M8 ja M9 (kuvio 4).

Ekspressoointiplasmidi pCM750 (kuvio 5) saatiin ligatoimalla pJF118u:n EcoRI-HindIII-fragmentti oligonukleotidiparin M8, M9 ja p19:n AccI-HindIII-fragmentin kanssa.

Eritysmutantin *E. coli* WCM100 transformointi plasmidilla pCM750 ja transformoidun kannan kasvattaminen täydellisessä alustassa (10 g/l peptoni; 5 g/l hiivauute; 5 g/l NaCl; 10 g/l laktoosi; 0,1 g/l CaCl₂; 100 mg/l ampisilliini) 30°C:ssa mahdollisti γ -CGTaasin 500 kertaa korkeamman saannon verrattuna *Bacillus*-kannan 290-3 entsyymisaantoihin.

Esimerkki 7: γ -CGTaasin modifiointi

Oligonukleotidiparit M10, M11 ja M12, M13 syntetisoitiin fosforiamidiitti-menetelmällä (kuvio 6). Oligonukleotidien DNA-sekvenssi koodaa *Bacillus* 1-1:n β -CGTaasin N-terminaalista aminohapposekvenssiä (Proc. 4th Int. Symposium on Cyclodextrins (Huber O., Szejtly J., toim.) 1988, s. 71-76, Kluwer Academic) ja on homologinen γ -CGTaasin N-terminaalisen alueen kanssa, joka käsittää DNA-alueen SspI-katkaisukohtaan asti (kts. kuvio 2).

Plasmidi pCM750 pilkottiin osittain restriktioentsyymillä AccI.

Suoritettiin jälkipilkonta SspI:lla ja agarosigeelielektroforeesin avulla eristettiin 7,3 kB suuruinen DNA-fragmentti. Tämän DNA-fragmentin ligatointi kaksisäikeisten oligonukleotidien M10, M11 ja M12, M13 tuotti plasmidin pCM720 (kuvio 7), joka koodaa kimääristä γ -CGTaasia.

E. coli WCM100:n eritysmutanttin transformointi ja kasvattaminen esimerkin 6 mukaisesti nosti kaksinkertaisesti γ -CGTaasin saantoa verrattuna esimerkin 6 tuloksiin.

Esimerkki 8: γ -Syklodekstriinin valmistaminen γ -CGTaasilla

10 g liukoista tärkkelystä laitettiin 100 ml:aan puskuria (10 mmol/l Tris/HCl pH 8,0 ja 5 mM CaCl₂) ja tärkkelys liuotettiin kuumentamalla 5 minuuttia 95°C:ssa. 50°C:een jäähdyttämisen jälkeen lisättiin γ -syklodekstriinin selektiivisenä kompleksinmuodostajana 1 g sykloheksadekenonia. Tämän jälkeen seokseen pipetoitiin 100 U γ -CGTaasia. Panosta sekoitettiin voimakkaasti ja reaktiolämpötila pidettiin 50°C:ssa. 8 tunnin reaktioajan jälkeen saavutettiin optimaalinen γ -syklodekstriinisaanto, joka oli 48 % laskettuna käytetystä tärkkelyksestä.

Vertailuesimerkki:

Koe suoritettiin esimerkissä 5 kuvatulla tavalla paitsi, että γ -CGTaasin asemesta käytettiin 100 U *Bacillus macerans*:n α -CGTaasia. 32 tunnin kuluttua saavutettiin maksimaalinen γ -syklodekstriinisaanto, joka oli 43 %.

Patenttivaatimukset

1. γ -Syklodekstriiniglykosyyliitransferaasi Bacillus 290-3:sta (DSM 5850).

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen γ -syklodekstriiniglykosyyliitransferaasin aminoterminalisella alueella modifioitu johdos, t u n n e t t u siitä, että sitä voidaan saada suurempia määriä kuin sitä on mahdollista saada sen luonnonperäisistä lähtömikro-organismeista.

3. γ -Syklodekstriiniglykosyyliitransferaasi, t u n n e t t u siitä, että sitä koodaa patenttivaatimuksen 1 mukaisen γ -syklodekstriiniglykosyyliitransferaasin geeni, joka on korvattu 5'-alueella Bacillus 1-1:n β -CGTaasin jotakin homologista aminohappoa koodaavalla DNA-alueella.

4. Ekspressointiplasmidit, jotka koodaavat yhden tai useamman patenttivaatimuksen 1 - 3 mukaisesti saatavaa syklodekstriiniglykosyyliitransferaasia.

5. Menetelmä γ -syklodekstriiniglykosyyliitransferaasin saamiseksi, t u n n e t t u siitä, että

a) alkalofiilisiä tärkkelystä hajottavia bakteereita seulotaan γ -CGTaasin erittymisen suhteen,

b) nämä bakteerit karakterisoidaan taksonomisesti,

c) bakteereiden γ -CGTaasi puhdistetaan ja karakterisoidaan biokemiallisesti,

d) γ -CGTaasin geeni kloonataan ja sekvensoidaan,

e) tämä geeni modifioidaan valmista proteiinia koodaavan alueen 5'-alueella

f) näin modifioitu geeni laitetaan säädeltävän promoottorin kontrollin alaiseksi ja viedään bakteeriin niin, että se lisääntyy tämän kanssa ja että geenituote voidaan erittää,

g) entsyymi otetaan talteen viljelmän supernatantista indu-

soinnin ja ekspressoinnin jälkeen.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että vaiheessa e) 5'-aluetta koodaava alue vaihdetaan toisen CGTaasin homologista aluetta koodaavaan alueeseen.

7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että toisen CGTaasin homologista aluetta koodaavana alueena käytetään Bacillus 1-1:n vastaavaa aluetta koodaavaa aluetta.

8. Menetelmä valmistaa γ -syklodekstriiniglykosyyli transferaaseja, t u n n e t t u siitä, että γ -syklodekstriiniglykosyyli transferaasia koodaavaa geeniä modifioidaan geeniteknologisesti käyttämällä omaa signaalipeptidiä siten, että γ -syklodekstriiniglykosyyli transferaasin ohjattavissa oleva yli-ekspressointi tulee mahdolliseksi ja että näin modifioitu geeni ekspressoituu eritysmutanteissa.

9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että γ -syklodekstriiniglykosyyli transferaasia koodaavana geeninä käytetään patenttivaatimuksen 1 mukaisen γ -syklodekstriiniglykosyyli transferaasin geeniä.

10. DNA, joka koodaa kuvion 2 mukaista aminohapposekvenssiä. *OK*

11. DNA, joka koodaa γ -syklodekstriiniglykosyyli transferaasia ja jossa on kuvion 2 aminohaposta 75 alkava aminohapposekvenssi. *OK*

12. DNA, joka koodaa γ -syklodekstriiniglykosyyli transferaasia ja joka sisältää kuviossa 2 annetun aminohappoalueen aminohaposta 198 aminohappoon 214 asti tämä mukaanlukien ja/tai aminohappoaluetta aminohaposta 238 aminohappoon 247 asti tämä mukaanlukien ja/tai aminohappoaluetta aminohaposta 267 amino-

happoon 275 asti tämä mukaanlukien ja/tai aminohappoaluetta aminohaposta 336 aminohappoon 343 asti tämä mukaanlukien.

13. Menetelmä valmistaa γ -syklodekstriiniä, t u n n e t t u -
siitä, että käytetään yhden tai useamman patenttivaatimuksen
1 - 3 mukaista γ -CGTaasia.

14. Bakteerikanta Bacillus 290-3 (DSM 5850).

Patentkrav

1. γ -cyklodextringlykosyltransferas från Bacillus 290-3 (DSM 5850).
2. I det aminoterminala området modifierat derivat av ett γ -cyklodextringlykosyltransferas enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att det kan erhållas i större mängder än vad som är möjligt från dess naturliga ursprungs-mikroorganism.
3. γ -cyklodextringlykosyltransferas, k ä n n e t e c k n a t därav, att det kodas av en gen av γ -cyklodextringlykosyltransferas enligt patentkravet 1, vilken i 5'-området substituerats med ett något av β -CGTasets homologa aminosyror från Bacillus 1-1 kodande DNA-område.
4. Expresseringsplasmider, vilka kodar ett eller flera enligt patentkraven 1 - 3 erhållbara cyklodextringlykosyltransferaser.
5. Förfarande för att erhålla γ -cyklodextringlykosyltransferas, k ä n n e t e c k n a t därav, att
 - a) alkalofila stärkelsenedbrytande bakterier siktas med avseende på utsöndring av γ -CGTas,
 - b) dessa bakterier karakteriseras taxonomiskt,
 - c) bakteriernas γ -CGTas renas och karakteriseras biokemiskt,
 - d) γ -CGTasets gen klonas och sekventieras,
 - e) denna gen modifieras med det färdigt protein kodande områdets 5'-område,
 - f) den på sålunda modifierade genen försättes under kontrollen av en reglerbar promotor och införs i bakterien så, att den förökar sig med denna och att genprodukten kan avskiljas.
 - g) enzymet tillvaratages från odlingens supernatant efter induktion och expression.

6. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att i steget a) det 5'-området kådande området utbytes mot ett det homologa området hos ett annat CGTas kådande område.

7. Förfarande enligt patentkravet 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att som det homologa området hos ett annat CGTas kådande området användes ett det motsvarande området av Bacillus l-1 kådande område.

8. Förfarande för framställning av γ -cyklodextringlykosyltransferaser, k ä n n e t e c k n a t därav, att den ett γ -cyklodextringlykosyltransferas kådande genen modifieras genteknologiskt under användning av den egna signalpeptiden, att en styrbar överexpression av γ -cyklodextringlykosyltransferaset blir möjligt och att den sålunda modifierade genen expresas i avsöndringsmutanter.

9. Förfarande enligt patentkravet 8, k ä n n e t e c k n a t därav, att som γ -cyklodextringlykosyltransferas kådande gen användes den γ -cyklodextringlykosyltransferaset enligt patentkravet 1 kådande genen.

10. DNA, som kådar en aminosyrasekvens enligt figur 2.

11. DNA, som kådar ett γ -cyklodextringlykosyltransferas och som har en från aminosyra 75 i figur 2 begynnande aminosyrasekvens.

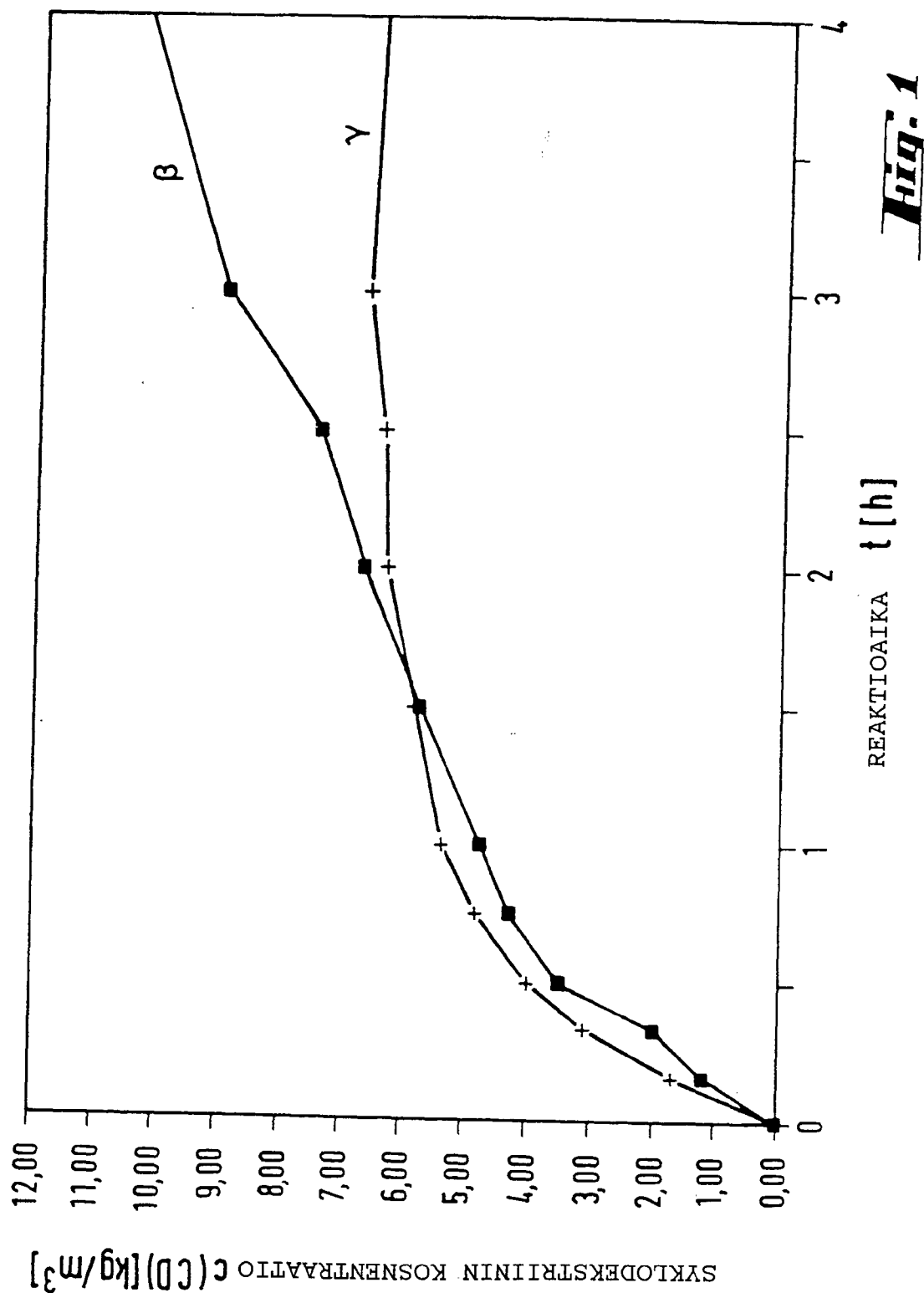
12. DNA, som kådar ett γ -cyklodextringlykosyltransferas och som innefattar det i figur 2 uppvisade aminosyraområdet från aminosyra 198 till och med aminosyra 214 och/eller från aminosyra 238 till och med aminosyra 247 och/eller från aminosyra 267 till och med aminosyra 275 och/eller från aminosyra 336 ända till aminosyra 343 denna medräknad.

13. Förfarande för framställning av γ -cyklodextrin, k ä n -
n e t e c k n a t därav, att ett γ -CGTas enligt ett eller
flera av patentkraven 1 - 3 användes.

14. Bakteriestam Bacillus 290-3 (DSM 5850).

15

1/10



2/10

Fig. 2

10 30 50
atgattcgaaggcctttctttttcacttggtggttttatttttgattagcttcttagttatc
M I R R L S F S L V V L F L I S F L V I

70 Acc I 90 110
gttaaccagagtatacagaggcaaataaaaacttagacaatgttaattatgcccaagag
V N P E Y T E A N E N L D N V N Y A Q E

130 150 170
attatttatcaaattgttacggatcggttttatgatgggtgacccaactaataatcctgag
I I Y Q I V T D R F Y D G D P T N N P E

190 210 Ssp I 230
ggaactttgttttagtccagggttgctctggatttaactaaatattgtggtggggactggcaa
G T L F S P G C L D L T K Y C G G D W Q

250 270 290
ggggttatcgaaaagatcgaggacgggtattttaccggatatgggcataacggctatttgg
G V I E K I E D G Y L P D M G I T A I W

310 330 350
atttcgccaccaattgaaaacggttatggagcttcacccaggaggttttgcttcttatcat
I S P P I E N V M E L H P G G F A S Y H

370 390 410
ggttattggggcagagatttttaaacgaacaaatcctgcttttggttagtttggcagatttt
G Y W G R D F K R T N P A F G S L A D F

430 450 470
tcgagattaattgaaacgggtcataatcacgatataaaaagtaatcatcgattttgttccc
S R L I E T A H N H D I K V I I D F V P

490 510 530
aatcacatctcctgtcgatattgagaatggagcttttatatgataatgggtcgtttagtt
N H T S P V D I E N G A L Y D N G R L V

3/10

Fig. 2 (JATK.)

550 570 590
gggcattattccaatgatagtgaggattatTTTTatacaaatggtggttcggattttctca
G H Y S N D S E D Y F Y T N G G S D F S

610 630 650
agttatgaagacagtattttatcgaaatctttatgatttagctagtctaaaccagcaaaac
S Y E D S I Y R N L Y D L A S L N Q Q N

670 690 710
tcatttattgatcggttattttaaagaatcgattcaaatgtggttagatttaggaattgat
S F I D R Y L K E S I Q M W L D L G I D

730 750 770
ggaattcgagtagatgcggttagcacatatgccagtaggggtggcaaaagaactttgttagc
G I R V D A V A H M P V G W Q K N F V S

790 810 830
tccatctatgattataatcctgtctttacatttgagaaatgggtttacagggtgctgggtggt
S I Y D Y N P V F T F G E W F T G A G G

850 870 890
agtgatgagtatcattattttattaataatagcgggatgagtgcggttagattttcgttac
S D E Y H Y F I N N S G M S A L D F R Y

910 930 950
gcacaagtcgtccaagatgtgttaagaaataacgatggaacgatgtatgatttggaaca
A Q V V Q D V L R N N D G T M Y D L E T

970 990 1010
gtggtgagagaaactgaaagcggtttacgaaaagccgcaagatcaagttacctttatcgat
V L R E T E S V Y E K P Q D Q V T F I D

1030 1050 1070
aaccatgatattaatcgcttttcgagaaatggctcactcaacgcgtacaacagatttaggg
N H D I N R F S R N G H S T R T T D L G

4/10

Fig. 2 (JATK.)

1090 1110 1130
ttagcctttttattaacatctcggaggagtcccaaccattttattatggtactgaaatttat
L A F L L T S R G V P T I Y Y G T E I Y

1150 1170 1190
atgacaggtgatggggacccagataatcggaaaatgatgaatacatttgatcaatcgaca
M T G D G D P D N R K M M N T F D Q S T

1210 1230 1250
gttgccctatcaaatacacaacagctctcttctactgcgacaagaaaatagagcgattgct
V A Y Q I I Q Q L S S L R Q E N R A I A

1270 1290 1310
tatggggatacgacggaacgatggataaatgaagatgtattttatttatgaacgttcattt
Y G D T T E R W I N E D V F I Y E R S F

1330 1350 1370
aatggagaatatgcacttattgctgtgaaccggagcttaaacactcttatcagattagt
N G E Y A L I A V N R S L N H S Y Q I S

1390 1410 1430
agcttggttaacggatatgccttctcaattatatgaagatgagctgtcaggtcttttagac
S L V T D M P S Q L Y E D E L S G L L D

1450 1470 1490
gggcaatcgataacagtcgatcaaaatgggtctattcagccctttttggttagcaccgggt
G Q S I T V D Q N G S I Q P F L L A P G

1510 1530 1550
gaagtaagtgtttggcaatactcaaattgggtcagaatgtagcaccggaaattgggtcaaatt
E V S V W Q Y S N G Q N V A P E I G Q I

1570 1590 1610
ggtcctcctattgggaaaccaggagatgaagtgagaatcgatgggttcaggcttttggaagt
G P P I G K P G D E V R I D G S G F G S

5/10

Fig. 2

1630 1650 1670
agtacgggggatgtttcttttgcgggttcaactatgaatgtattgtcttggaaatgacgat
S T G D V S F A G S T M N V L S W N D D

1690 1710 1730
acaattatagccgaactgcctgagcataatggtggaaaaaatagtgttaactgttaacgact
T I I A E L P E H N G G K N S V T V T T

1750 1770 1790
aactcaggcgaaagcagtaatggttatccgtttgaattattaacagggtttacaaacatct
N S G E S S N G Y P F E L L T G L Q T S

1810 1830 1850
gtcagatttgtcgtgaaccaagccgaaacgtctgttggcgaaaatctgtacgtagttggg
V R F V V N Q A E T S V G E N L Y V V G

1870 1890 1910
gatgtacctgaattagggagctgggatccctgataaagcaattggtcctatgtttaatcaa
D V P E L G S W D P D K A I G P M F N Q

1930 1950 1970
gttttatactcatatcccacttggtattatgatgtgagtgtacctgctaatacaagatata
V L Y S Y P T W Y Y D V S V P A N Q D I

1990 2010 2030
gagtacaaatatattatgaaagatcaaaatggaaacgtaagctgggaaagtggaaacaac
E Y K Y I M K D Q N G N V S W E S G N N

2050 2070 2090
catatctatagaactccagaaaattcaactggaatcgtagaagttaattttaatcaataa
H I Y R T P E N S T G I V E V N F N Q *

7/10

Fig. 4.

EcoRI

A A T T C A A T G A T T C G A A G G C T T C T T T T C A C T T
G T T A C T A A G C T T C C G A A A A A G T G A A

Met Ile Arg Arg Leu Ser Phe Ser Leu

G T G G T T T A T T T T G A T T A G C T T C T A G T T A T C C G
C A C C A A A T A A A A C T A A T C G A A A G A T C A A T A G C C

Val Val Leu Phe Leu Ile Ser Phe Leu Val Ile

AccI

T T A A C C C A G A G T
A A T T G G G T C T C A T A

Val Asn Pro Glu

8/10

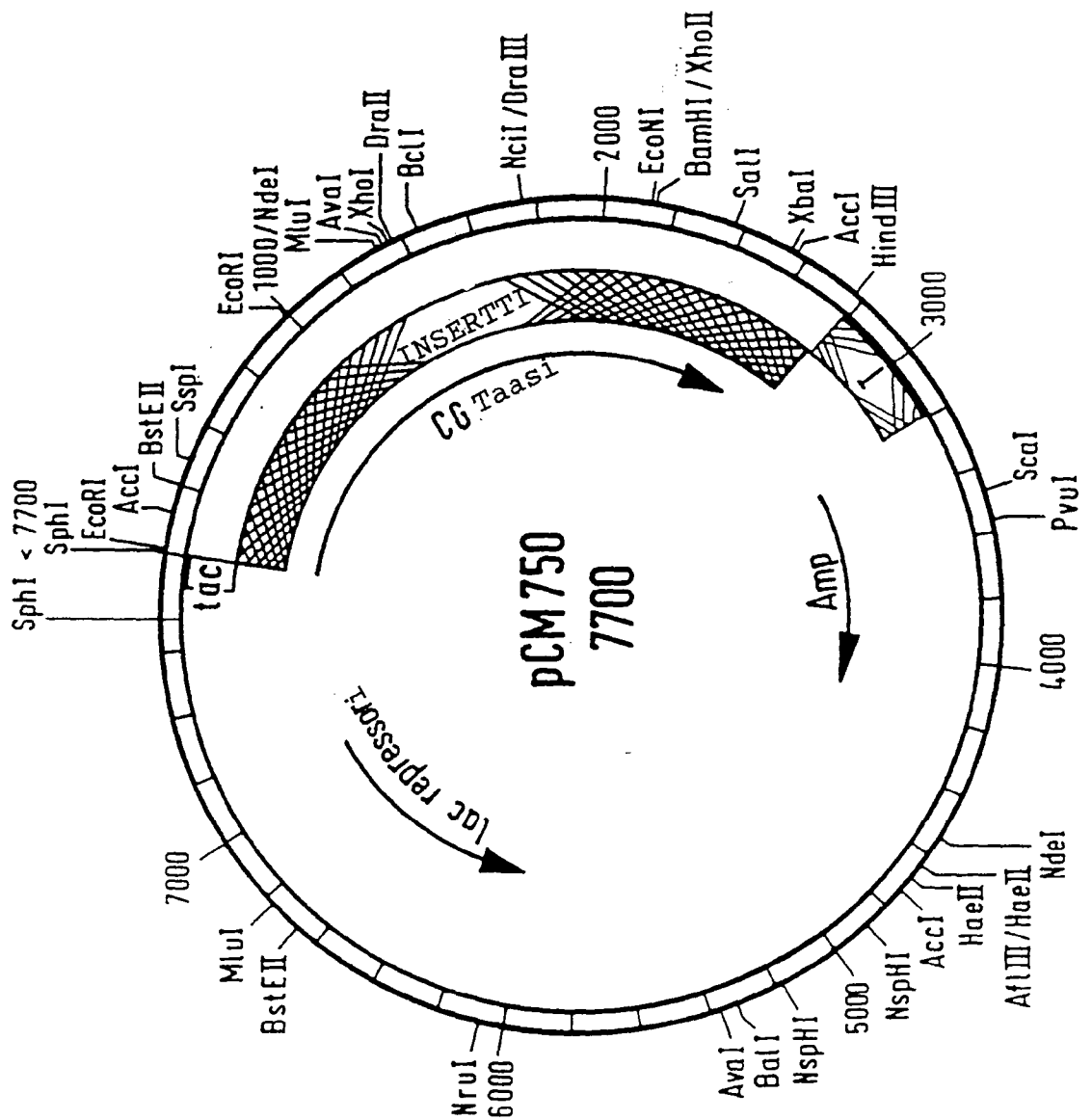


Fig. 5

9/10

Fig. 6

Oligo M10 ja M11

```
1      ACCI
      ATACAGAGGCAGACGTAACAAACAAGTCAATTACTCAAAAGATGTGATTACCAGATTG
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      TGTCTCCGCTCTGCATTGTTGTTTCAGTTAATGAGTTTCTACACTAAATGGTCTAAC
      T E A D V T N K V N Y S K D V I Y Q I V
      60

      TTACCGATCGATTCTCTG
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      AATGGC
      T
      61      78
```

Oligo M12 ja M13

```
1      -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      ACGGGAATCCTGGCAACAATCCCTTCAGGGGCTATCTTTAGTCAAAACT
      TAGCTAAGAGACTGCCCTTAGGACCCGTTGTAGGAAGTCCGGGATAGAAATCAGTTTGA
      R F S D G N P G N N P S G A I F S Q N C
      60

      GTATAGATCTCCATAAGT
      -----+-----+-----+-----+-----+-----+
      CATATCTAGAGGTATTCA
      I D L H K
      61      78
```

10/10

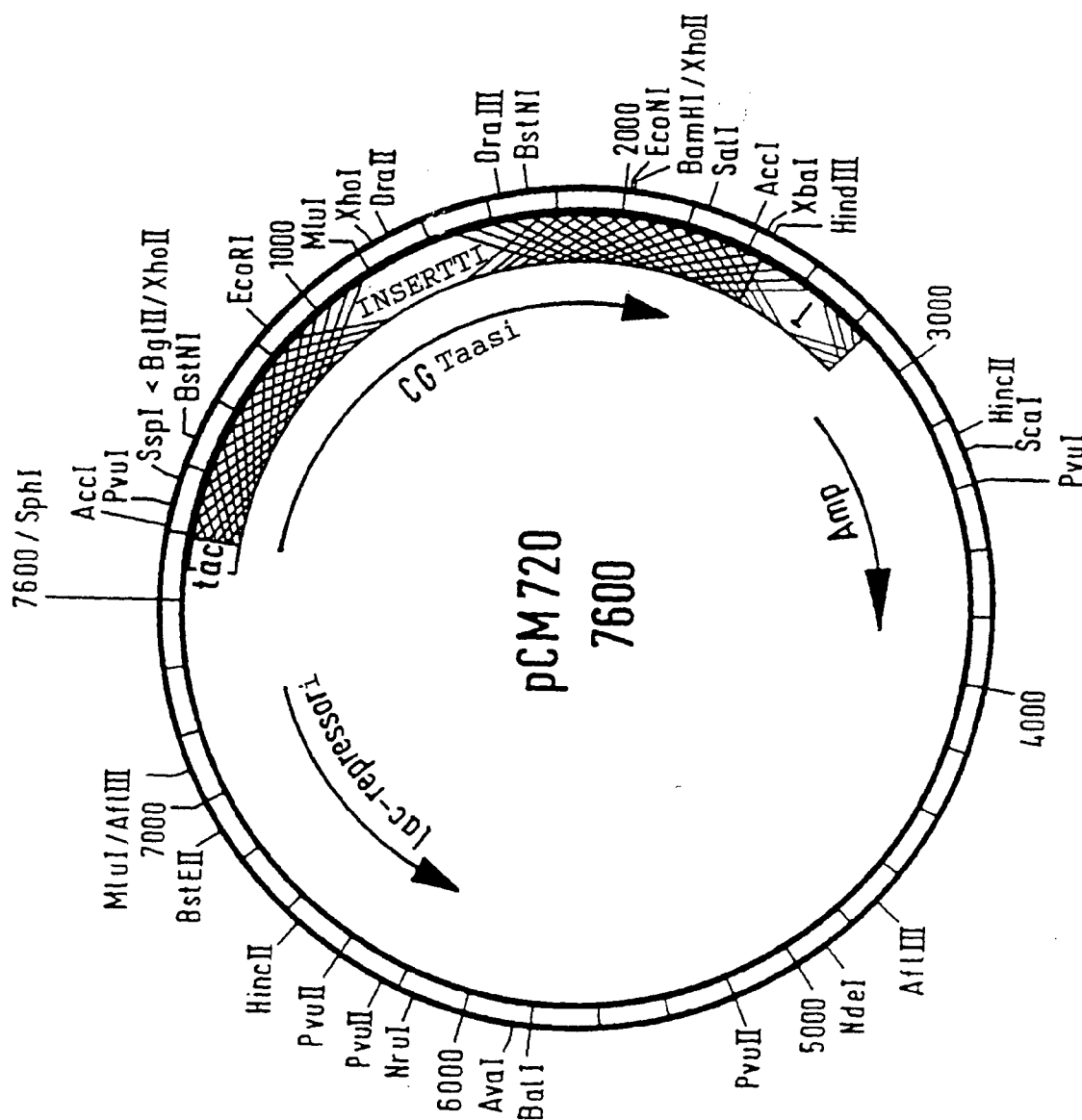


Fig. 7