(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 35 515 T2** 2006.08.10

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 822 982 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 35 515.9**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/DK96/00179**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 910 915.6**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/033267**
(86) PCT-Anmeldetag: **22.04.1996**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **24.10.1996**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **11.02.1998**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **30.11.2005**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.08.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 9/26*** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

47795	**21.04.1995**	**DK**
117395	**17.10.1995**	**DK**
128195	**16.11.1995**	**DK**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

(74) Vertreter:
Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler Wichmann Huhn, 81675 München

(72) Erfinder:
DIJKHUIZEN, Lubbert-University of Groningen, NL-9712 CP Groningen, NL; DIJKSTRA, W.-University of Groningen, Bauke, NL-9712 CP Groningen, NL; ANDERSEN, Carsten-Novo Nordisk A/S, DK-2880 Bagsvaerd, DK; VON DER OSTEN, Claus-Novo Nordisk A/S, DK-2880 Bagsvaerd, DK

(54) Bezeichnung: **VARIANTEN DER CYCLOMALTODEXTRIN-GLUCANOTRANSFERASE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Varianten der Cyclomaltodextrin-Glucanotransferase. Genauer betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Modifizieren der Substratbindung und/oder Produktselektivität eines Vorläufer-CGTase-Enzyms sowie CGTase-Varianten, die von einem Vorläufer-CGTase-Enzym durch Substitution, Insertion und/oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäurerest(en) abgeleitet ist/sind, welche(r) Aminosäurerest(e) eine Position einnimmt/einnehmen, die in der Nähe des Substrats liegt. Darüber hinaus betrifft die Erfindung DNA-Konstrukte, welche die CGTase-Varianten kodieren, Expressionsvektoren, Wirtszellen und Verfahren zum Herstellen der CGTase-Varianten der Erfindung.

Stand der Technik

[0002] Die Cyclomaltodextrin-Glucanotransferase (E.C. 2.4.1.19), ebenfalls als Cyclodextrin-Glucanotransferase oder Cyclodextrin-Glycosyltransferase bezeichnet, nachfolgend CGTase genannt, katalysiert die Umwandlung von Stärke und ähnlichen Substraten in Cyclomaltodextrine über eine intramolekulare Transglycosylierungsreaktion, wodurch Cyclomaltodextrine, nachfolgend Cyclodextrine (oder CD) genannt, verschiedener Größen gebildet werden. Kommerziell sind Cyclodextrine mit 6, 7 und 8 Glucoseeinheiten, die jeweils α-, β- bzw. γ-Cyclodextrine genannt werden, am bedeutendsten. Kommerziell weniger bedeutend sind Cyclodextrine mit 9, 10 und 11 Glucoseeinheiten, die δ-, ε- bzw. ζ-Cyclodextrine genannt werden.

[0003] Cyclodextrine sind somit cyclische Glucoseoligomere mit einem hydrophoben innen gelegenen Hohlraum. Sie sind in der Lage, in wässrigen Lösungen Einschlusskomplexe (Inklusionskomplexe) mit zahlreichen kleinen hydrophoben Molekülen zu bilden, wodurch sich Veränderungen in physikalischen Eigenschaften ergeben, z.B. eine erhöhte Löslichkeit und Stabilität sowie eine herabgesetzte chemische Reaktivität und Flüchtigkeit. Cyclodextrine finden insbesondere in der Nahrungsmittelindustrie, Kosmetikindustrie, chemischen und pharmazeutischen Industrie Anwendung.

[0004] Die meisten CGTasen besitzen sowohl Stärke-abbauende Aktivität als auch Transglycosylierungsaktivität. Obwohl einige CGTasen hauptsächlich α-Cyclodextrine herstellen und andere CGTasen hauptsächlich β-Cyclodextrine herstellen, bilden CGTasen gewöhnlicherweise eine Mischung aus α-, β- und γ-Cyclodextrinen. Es können selektive Präzipitationsschritte mit organischen Lösungsmitteln für die Isolierung von separaten α-, β- und γ-Cyclodextrinen verwendet werden. Um kostenintensive und umweltschädliche Vorgehensweisen zu vermeiden, ist die Verfügbarkeit von CGTasen, die in der Lage sind, einen erhöhten Anteil eines bestimmten Cyclodextrin-Typs herzustellen, wünschenswert.

[0005] In der Literatur sind CGTasen von verschiedenen Bakterienquellen beschrieben worden, einschließlich CGTasen, die von Bacillus, Brevibacterium, Clostridium, Corynebacterium, Klebsiella, Micrococcus, Thermoanaerobacter und Thermoanaerobacterium erhalten werden.

[0006] Kimura et al. [Kimura K, Kataoka S, Ishii Y, Takano T und Yamane K; J. Bacteriol. 1987 169 4399–4402] beschreiben demnach eine CGTase von Bacillus sp. 1011, Kaneko et al. [Kaneko T, Hamamoto T und Horikoshi K; J. Gen. Microbiol. 1988 134 97–105] beschreiben eine CGTase von Bacillus sp. Stamm 38-2, Kaneko et al. [Kaneko T, Song K B, Hamamoto T, Kudo T und Horikoshi K; J. Gen. Microbiol. 1989 135 3447–3457] beschreiben eine CGTase von Bacillus sp. Stamm 17-1, Itkor et al. [Itkor P, Tsukagoshi N und Udaka S; Biochem. Biophys. Res. Commun 1990 166 630–636] beschreiben eine CGTase von Bacillus sp. B1018, Schmid et al. [Schmid G, Englbrecht A, Schmid D; Proceedings of the Fourth International Symposium on Cyclodextrins (Huber O, Szejtli Hrsg.), 1988 71–76] beschreiben eine CGTase von Bacillus sp. 1-1, Kitamoto et al. [Kitamoto N, Kimura T, Kito Y, Ohmiya K; J. Ferment. Bioeng. 1992 74 345–351] beschreiben eine CGTase von Bacillus sp. KC201, Sakai et al. [Sakai S, Kubota M, Nakada T, Torigoe K, Ando O und Sugimoto T; J. Jpn. Soc. Starch. Sci. 1987 34 140–147] beschreiben eine CGTase von Bacillus stearothermophilus und eine CGTase von Bacillus macerans, Takano et al. [Takano T, Fukuda M, Monma M, Kobayashi S, Kainuma K und Yamane K; J. Bacteriol. 1986 166 (3) 1118–1122] beschreiben eine CGTase von Bacillus macerans, Sin et al. [Sin K A, Nakamura A, Kobayashi K, Masaki H und Uozumi T; Appl. Micorbiol. Biotechnol. 1991 35 600–605] beschreiben eine CGTase von Bacillus ohbensis, Nitschke et al. [Nitschke L, Heeger K, Bender H und Schulz G; Appl. Microbiol. Biotechnol. 1990 33 542–546] beschreiben eine CGTase von Bacillus circulans, Hill et al. [Hill D E, Aldape R und Rozzell J D, Nucleic Acids Res. 1990 18 199] beschreiben eine CGTase von Bacillus licheniformis Tomita et al. [Tomita K, Kaneda M, Kawamura K und Nakanishi K; J. Ferm. Bioeng. 1993 75 (2) 89–92] beschreiben eine– CGTase von Bacillus autolyticus, Jamuna et al. [Jamuna R, Saswathi N, Sheela R und Ra-

makrishna S V; Appl. Biochem. Biotechnol. 1993 43 163–176] beschreiben eine– CGTase von Bacillus cereus, Akimaru et al. [Akimaru K, Yagi T und Yamamoto S; J. ferm. Bioeng. 1991 71 (5) 322–328] beschreiben eine CGTase von Bacillus coagulans, Schmid G [Schmid G; New Trends in Cyclodextrins and Derivatives (Duchene D, Hrsg.), Editions de Sante, Paris, 1991, 25–54] beschreiben eine CGTase von Bacillus firmus, Abelian et al. [Abelian V A, Adamian M O, Abelian L A A, Balayan A M und Afrikian E K; Biochememistry (Moskau) 1995 60 (6) 665–669] beschreiben eine CGTase von Bacillus halophilus und Kato et al. [Kato T und Horikoshi K; J. Jpn. Soc. Starch Sci. 1986 33 (2) 137–143] beschreiben eine CGTase von Bacillus subtilis.

[0007] EP 614971 beschreibt eine CGTase von Brevibacterium, Haeckel & Bahl [Haeckel K, Bahl H; FEMS Microbiol. Lett. 1989 60 333–338] beschreiben eine CGTase von Clostridium thermosulfurogenes, Podkovyrov & Zeikus [Podkovyrov S M, Zeikus J G; J. Bacteriol. 1992 174 5400–5405] beschreiben eine CGTase von Clostridium thermohydrosulfuricum, JP 7000183 beschreibt eine CGTase von Corynebacterium, Binder et al. [Binder F, Huber O und Böck A; Gene 1986 47 269–277] beschreiben eine CGTase von Klebsiella pneumoniae, US 4,317,881 beschreibt eine CGTase von Micrococcus und Wind et al. [Wind R D, Liebl W, Buitelaar R M, Penninga D, Spreinat A, Dijkhuizen L, Bahl H; Appl. Environ. Microbiol. 1995 61 (4) 1257–1265] beschreiben eine CGTase von Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes.

[0008] Norman & Jørgensen [Norman B E, Jørgensen S T; Denpun Kagaku 1992 39 99–106, und WO 89/03421] haben von einer CGTase, die von Thermoanaerobacter sp. herstellt wird, berichtet, jedoch ist deren Aminosäuresequenz niemals offenbart worden. Wir berichten hierin von der Nukleinsäuresequenz, welche die CGTase von Thermoanaerobacter sp. kodiert (dargestellt als SEQ ID: NR1), ebenso wie deren Aminosäuresequenz (dargestellt als SEQ ID: NR 2).

[0009] Es sind ebenfalls CGTasen von thermophilen Actinomyceten berichtet worden [Abelian V A, Afyan K B Avakian Z G Melkumyan A G und Afrikian E G; Biochemistry (Moskau) 1995 60 (10) 1223–1229].

[0010] Vor kurzem ist die technische Veränderung von Proteinen („protein engineering") angewendet worden, um bestimmte CGTasen zu modifizieren, um selektiv mehr oder weniger eines spezifischen Cyclodextrins herzustellen.

Die Struktur von CGTasen

[0011] CGTasen sind funktionell mit α-Amylasen verwandt. Sowohl CGTasen als auch α-Amylasen bauen Stärke durch die Hydrolyse der α-(1,4)-glycosidischen Bindungen ab, stellen jedoch nahezu ausschließlich cyclische bzw. lineare Produkte her.

[0012] Mitglieder der CGTase-Familie besitzen eine hohe Identität über die gesamte Aminosäuresequenz, mehr als 60%. CGTasen und α-Amylasen teilen eine Identität in der Aminosäuresequenz von ungefähr 30%. Die Spalten des aktiven Zentrums von CGTasen und α-Amylasen, die zwischen der A- und B-Domäne (Asp229, Glu257 und Asp328) lokalisiert sind, sind jedoch ziemlich ähnlich.

[0013] Vor kurzem wurden die Tertiärstrukturen von CGTasen bestimmt. Demnach berichten Hofman et al. [Hofman B E, Bender H, Schultz G E; J. Mol. Biol. 1989 209 793–800] und Klein & Schulz [Klein C, Schulz G E; J. Mol. Biol. 1991 217 737–750] die Tertiärstruktur von einer CGTase, die von dem Bacillus circulans Stamm 8 abgeleitet ist, Kubota et al. [Kubota M, Matsuura Y, Sakai S und Katsube Y; Denpun Kagaku 1991 38 141–146] berichten die Tertiärstruktur von einer CGTase, die von Bacillus stearothermophilus TC-91 abgeleitet ist, Lawson et al. [Lawson C L, van Montfort R, Strokopytov B, Rozeboom H J, Kalk K H, de Vries G E, Penninga D, Dijkhuizen L und Dijkstra B W; J. Mol. Biol. 1994 236 590–600] berichten die Tertiärstruktur von einer CGTase, die von dem Bacillus circulans Stamm 251 abgeleitet ist, Strokopytov at al. [Strokopytov B, Penninga D, Rozeboom H J; Kalk K H Dijkhuizen L und Dijkstra B W; Biochemistry 1995 34 2234–2240] berichten die Tertiärstruktur von einer CGTase, die von dem Bacillus circulans Stamm 251 abgeleitet ist, wobei die CGTase mit Acarbose, einem wirksamen CGTase-Inhibitor, komplexiert worden ist, und Knegtel et al. [Knegtel R M A, Wind R D, Rozeboom H J, Kalk K H, Buitelaar R M, Dijkhuizen L und Dijkstra B W; J. Mol. Biol. 1996 256 611–622] berichten die Tertiärstruktur von einer CGTase, die von Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes abgeleitet ist.

[0014] Diese und andere Untersuchungen zeigen, dass CGTasen von Bacillus circulans aus fünf Domänen zusammengesetzt sind. Die dreidimensionalen Strukturen zeigen ebenfalls, dass die N-terminalen Domänen von CGTasen strukturelle Ähnlichkeiten zu denen von α-Amylasen besitzen, während für die C-terminalen Domänen festgestellt wurde, dass sie einzigartig für CGTasen sind.

[0015] Das katalytische Zentrum von CGTasen ist in der A-Domäne lokalisiert und besitzt drei katalytische Reste (in Bacillus circulans Stamm 251 sind dies Asp229, Glu257 bzw. Asp328, vgl. Strokopytov et al. 1995, op cit.). Ein zentraler Aminosäurerest ist in der B-Domäne lokalisiert, wobei um diesen Rest herum die Cyclodextrine gebildet werden, d.h. die Cyclisierungsachse. Die Substitution dieses zentralen Restes, z.B. Tyrosin an dem Rest 188 in Bacillus ohbensis (welcher der Position 195, CGTase-Nummerierung, enspricht) um die Herstellung von γ-Cyclodextrin relativ zu β-Cyclodextrin zu erhöhen, ist die Aufgabe (der Gegenstand) der Untersuchung gewesen, die von Sin et al. [Sin K, Nakamura A, Masaki H, Matsuura Y und Uozumi T; Journal of Biotechnology 1994 32 283–288] und JP-A-5219948 beschrieben wird.

[0016] Nakamura et al. [Nakamura A, Haga K und Yamane K; Biochemistry 1994 33 9929–9936] beschreiben die Wirkungen auf Substratbindungs- und Cyclisierungs-Eigenschaften durch Ersetzungen (Austausche), die an 4 Resten in dem aktiven Zentrum einer CGTase von dem Bacillus sp. Stamm 1011 vorgenommen wurden. In diesen CGTase-Varianten ist ein Phenylalanin an Position 183 durch Leucin ersetzt worden, ein Tyrosin an Position 195 ist durch Alanin, Phenylalanin, Leucin, Threonin, Valin bzw. Tryptophan ersetzt worden, ein Phenylalanin an Position 259 ist durch Leucin ersetzt worden und ein Phenylalanin an Position 283 ist durch Leucin ersetzt worden.

[0017] Penninga et al. [Penninga D, Strokopytov B, Rozeboom H J, Lawson C L, Dijkstra B W, Bergsma J und Dijkhuizen L; Biochemistry 1995 34 3368–3376] beschreiben die Wirkung von ortsgerichteten Mutationen in Tyrosin an Position 195 von einer CGTase von dem Bacillus circulars Stamm 251 auf die Aktivität und Produktselektivität. In dieser Publikation sind vier CGTase-Varianten hergestellt worden, wobei bei den Varianten Tyrosin an Position 195 durch Phenylalanin, Tryptophan, Leucin bzw. Glycin ersetzt worden ist.

[0018] Fujiware et al. [Fujiwara S, Kakihara H, Sakaguchi K und Imanaka T; J. Bacteriol. 1992 174 (22) 7478–7481] beschreiben CGTase-Varianten, die von Bacillus stearothermophilus abgeleitet sind, bei denen ein Tyrosinrest an Position 191 (welche der Position 195, CGTase-Nummerierung, entspricht) durch Phenylalanin ersetzt worden ist, ein Tryptophanrest an Position 254 (welche der Position 258, CGTase-Nummerierung, entspricht) durch Valin ersetzt worden ist, ein Phenylalanin an Position 255 (welche der Position 259, CGTase-Nummerierung, entspricht) durch Phenylalanin bzw. Isoleucin ersetzt worden ist, ein Threoninrest an Position 591 (welche der Position 598, CGTase-Nummerierung, entspricht) durch Phenylalanin ersetzt worden ist und ein Tryptophanrest an Position 629 (welche der Position 636, CGTase-Nummerierung, entspricht) durch Phenylalanin ersetzt worden ist.

[0019] JP-A-7023781 beschreibt CGTase-Varianten, die von Bacillus sp. 1011 abgeleitet sind, bei denen ein Tyrosinrest an Position 195 durch Leucin, Valin, Phenylalanin bzw. Isoleucin ersetzt worden ist.

[0020] JP-A-5244945 beschreibt CGTase-Varianten, die von Bacillus stearothermophilus TC-91 abgeleitet sind, bei denen Tyrosinreste an den Positionen 222 und 286 (welche den Positionen 195 und 295, CGTase-Nummerierung, entsprechen) durch Phenylalanin ersetzt worden sind, um die Herstellung von α-Cyclodextrin relativ zu α-Cyclodextrin zu erhöhen.

[0021] JP-A-5041985 beschreibt CGTase-Varianten, die von Bacillus sp. 1011 abgeleitet sind, bei denen Histidin an Rest 140 in Region A, Histidin an Rest 233 in Region B bzw. Histidin an Rest 327 in Region C durch Arginin- bzw. Asparaginreste ersetzt worden sind.

[0022] EP 630,967 beschreibt CGTase-Varianten, bei denen ein Tyrosinrest an Position 211 von einer CGTase von Bacillus sp. 290-3 (welche der Position 195, CGTase-Nummerierung, enspricht), an Position 217 von einer CGTase von Bacillus sp. 1-1 (welche der Position 195, CGTase-Nummerierung, enspricht) und an Position 229 von einer CGTase von Bacillus circulans (welche der Position 195, CGTase-Nummerierung, enspricht) durch Tryptophan und Serin ersetzt worden sind.

[0023] Bis heute haben alle Bemühungen, CGTase-Varianten herzustellen, zu Substitutionen in der Region rund um das aktive Zentrum herum geführt, insbesondere an dem zentralen Cyclisierungsrest, welcher der Position 195, CGTase-Nummerierung, entspricht. Nur wenige CGTase-Varianten, die Substitutionen an entfernteren Regionen aufweisen, sind vorgeschlagen worden, und die Herstellung dieser Varianten ist nicht auf irgendein besonderes Konzept gestützt worden.

Zusammenfassung der Erfindung

[0024] Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue Varianten von CGTasen bereitzustellen.

[0025] Dementsprechend stellt die Erfindung in ihrem ersten Aspekt ein Verfahren zum Modifizieren der Substratbindung eines Vorläufer-CGTase-Enzyms bereit, welches Verfahren eine Substitution, Insertion und/oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäurerest(en) des Vorläufer-Enzyms umfasst, welche(r) Aminosäurerest(e) eine Position einnimmt/einnehmen, welche den Positionen in Tabelle 1, CGTase Nummerierung, entspricht; wobei das modifizierte CGTase-Enzym an Position 185 einen Argininrest (X185R) oder einen Glutaminsäurerest (X185E) oder einen Asparaginsäurerest (X185D) aufweist; oder
an Position 186 einen Alaninrest (X186A) aufweist; oder
an Position 196 einen Alaninrest (X196A) oder einen Leucinrest (X196L) aufweist; oder
an Position 232 einen Glutaminrest (X232Q) oder einen Asparaginrest (X232N) oder einen Alaninrest (X232A) oder einen Leucinrest (X232L) aufweist; oder
an Position 264 einen Alaninrest (X264A) oder einen Asparaginrest (X264N) oder einen Leucinrest (X264L) aufweist; oder
welches modifizierte CGTase-Enzym an Position 268 einen Alaninrest (X268A) aufweist; oder
an Position 371 einen Glycinrest (X371G) oder einen Asparaginrest (X371N) oder einen Alaninrest (X371A) oder einen Leucinrest (X371L) oder einen Glutaminsäurerest (X371E) aufweist; oder
an Position 375 einen Glycinrest (375G) oder einen Glutaminrest (X375Q) oder einen Asparaginrest (X375N) oder einen Alaninrest (X375A) oder einen Leucinrest (X375L) aufweist; oder
an Position 599a (z.B. über Insertion) einen Prolinrest (X599aP oder *599aP) oder einen Argininrest (X599aR oder *599aR) oder einen Histidinrest (X599aH oder *599aH) aufweist; oder
an Position 616 einen Alaninrest (X616A) aufweist.

[0026] In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung ein modifiziertes CGTase-Enzym bereit, welches von einem Vorläufer-CGTase-Enzym durch Substitution, Insertion und/oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäurerest(en) abgeleitet ist, welche(r) Aminosäurerest(e) eine Position einnimmt/einnehmen, welche den Positionen in Tabelle 1, modifiziertes CGTase-Enzym, entspricht; wobei das modifizierte CGTase-Enzym an Position 185 einen Argininrest (X185R) oder einen Glutaminsäurerest (X185E) oder einen Asparaginsäurerest (X185D) aufweist; oder
an Position 186 einen Alaninrest (X186A) aufweist; oder
an Position 196 einen Alaninrest (X196A) oder einen Leucinrest (X196L) aufweist; oder
an Position 232 einen Glutaminrest (X232Q) oder einen Asparaginrest (X232N) oder einen Alaninrest (X232A) oder einen Leucinrest (X232L) aufweist; oder
an Position 264 einen Alaninrest (X264A) oder einen Asparaginrest (X264N) oder einen Leucinrest (X264L) aufweist; oder
an Position 371 einen Glycinrest (X371G) oder einen Asparaginrest (X371N) oder einen Alaninrest (X371A) oder einen Leucinrest (X371L) oder einen Glutaminsäurerest (X371E) aufweist; oder
an Position 375 einen Glycinrest (X375G) oder einen Glutaminrest (X375Q) oder einen Asparaginrest (X375N) oder einen Alaninrest (X375A) oder einen Leucinrest (X375L) aufweist; oder
an Position 599a (z.B. über Insertion) einen Prolinrest (X599aP oder *599aP) oder einen Argininrest (X599aR oder *599aR) oder einen Histidinrest (X599aH oder *599aH) aufweist; oder
an Position 616 einen Alaninrest (X616A) aufweist.

[0027] In einem dritten Aspekt stellt die Erfindung ein DNA-Konstrukt bereit, welches ein modifiziertes CGTase-Enzym nach dem zweiten Aspekt kodiert.

[0028] In einem vierten Aspekt stellt die Erfindung einen rekombinanten Expressionsvektor bereit, welcher das DNA-Konstrukt nach dem dritten Aspekt umfasst.

[0029] In einem fünften Aspekt stellt die Erfindung eine Wirtszelle bereit, welche ein DNA-Konstrukt nach dem dritten Aspekt oder den rekombinanten Expressionsvektor nach dem vierten Aspekt umfasst.

[0030] In einem sechsten Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zum Herstellen eines modifizierten CGTase-Enzyms nach dem zweiten Aspekt bereit, welches Verfahren umfasst, die Zelle nach dem fünften Aspekt unter Bedingungen, die die Herstellung des modifizierten CGTase-Enzyms erlauben, zu kultivieren und das Enzym aus der Kultur zu gewinnen.

[0031] In weiteren Aspekten stellt die Erfindung Verwendungen eines modifizierten CGTase-Enzyms nach dem ersten Aspekt in einem Verfahren zur Herstellung von Cyclodextrinen, in einem Verfahren zur Herstellung von α-, β- und β-Cyclodextrinen oder Mischungen davon und/oder in einem Verfahren zur Herstellung von δ-, ε- und ζ-Cyclodextrinen oder Mischungen davon bereit.

[0032] In noch weiteren Aspekten stellt die Erfindung Verwendungen eines modifizierten CGTase-Enzyms nach dem ersten Aspekt in einem Verfahren zur in situ-Erzeugung von Cyclodextrinen, in einem Verfahren zur Herstellung eines gebackenen Produktes (Erzeugnisses), in einem Verfahren zur Stabilisierung von chemischen Produkten (Erzeugnissen) während deren Herstellung und/oder in einem Verfahren zur in situ-Erzeugung von linearen Oligosacchariden bereit.

Aminosäuren

[0033] Im Zusammenhang mit dieser Erfindung werden die folgenden Symbole und Abkürzungen für Aminosäuren und Aminsäureresten verwendet:

A	=	Ala	=	Alanin
C	=	Cys	=	Cystein
D	=	Asp	=	Asparaginsäure
E	=	Glu	=	Glutaminsäure
F	=	Phe	=	Phenylalanin
G	=	Gly	=	Glycin
H	=	His	=	Histidin
I	=	Ile	=	Isoleucin
K	=	Lys	=	Lysin
L	=	Leu	=	Leucin
M	=	Met	=	Methionin
N	=	Asn	=	Asparagin
P	=	Pro	=	Prolin
Q	=	Gln	=	Glutamin
R	=	Arg	=	Arginin
S	=	Ser	=	Serin
T	=	Thr	=	Threonin
V	=	Val	=	Valin
W	=	Trp	=	Tryptophan
Y	=	Tyr	=	Tyrosin
B	=	Asx	=	Asp oder Asn
Z	=	Glx	=	Glu oder Gln
X	=	Xaa	=	jede beliebige Aminosäure
*	=	Deletion oder nicht vorkommende Aminosäure		

CGTase-Varianten

[0034] Eine CGTase-Variante dieser Erfindung ist eine CGTase-Variante oder mutierte CGTase mit einer Aminosäuresequenz, die in der Natur nicht vorkommt.

[0035] Eine CGTase-Variante oder mutierte CGTase dieser Erfindung ist ein funktionelles Derivat von einem Vorläufer-CGTase-Enzym (d.h. dem nativen, Eltern- oder Wildtyp-Enzym) und kann durch Änderung einer DNA-Nukleotidsequenz eines Vorläufer-Gens oder seines Derivats, welche das Vorläufer-Enzym kodiert, erhalten werden. Die CGTase-Variante oder mutierte CGTase kann exprimiert und hergestellt werden, wenn die DNA-Nukleotidsequenz, welche die CGTase-Variante kodiert, in einen geeigneten Vektor in einem geeigneten Wirtsorganismus insertiert wird. Der Wirtsorganismus ist nicht notwendigerweise identisch mit dem Organismus, von dem das Vorläufer-Gen stammt.

[0036] In der Literatur sind Enzymvarianten ebenfalls als Mutanten oder Muteine bezeichnet worden.

CGTase-Nummerierung

[0037] Im Zusammenhang mit dieser Erfindung wird eine spezifische Nummerierung von Aminosäurerest-Positionen in CGTase-Enzymen verwendet. Durch einen Abgleich von Aminosäuresequenzen verschiedener bekannter CGTasen ist es möglich, eine CGTase-Aminosäure-Positionsnummer zu jeder beliebigen Aminosäurerest-Position in jedem beliebigen CGTase-Enzym, dessen Aminosäuresequenz bekannt ist, eindeutig zuzuordnen.

[0038] Unter Verwenden des Nummerierungssystems, das von der Aminosäuresequenz der CGTase, erhalten von Bacillus circulars Stamm 251, stammt, wobei die Sequenz in Tabelle 1(a) gezeigt ist, abgeglichen mit der Aminosäuresequenz einer Anzahl von anderen bekannten CGTasen, ist es möglich, die Position eines Aminosäurerests in einem CGTase-Enzym eindeutig anzuzeigen.

[0039] Beim Beschreiben der verschiedenen CGTase-Varianten, die gemäß der Erfindung hergestellt oder in Erwägung gezogen werden, werden die nachfolgenden Nomenklaturen zur einfacheren Bezugnahme adaptiert:
[Original-Aminosäure; Position; Substituierte Aminosäure]

[0040] Demgemäß wird die Substitution von Serin durch Alanin an der Position 145 als S145A bezeichnet.

[0041] Aminosäurereste, welche in Bezug auf die Aminosäuresequenz der CGTase von Bacillus circulars Stamm 251 Insertionen darstellen, werden durch die Hinzufügung von Buchstaben in alphabetischer Reihenfolge zu der vorangehenden CGTase-Nummer numeriert, wie z.B. Postion 91aF für den "insertierten" Phe zwischen Thr an Position 91 und Gly an Position 92 der Aminosäuresequenz der CGTase von Thermoanaerobacter sp. ATCC 53627, vgl. Tabelle 1j).

[0042] Die Deletion von einem Prolin an Position 149 wird als P149* angezeigt und eine Insertion zwischen Position 147 und 148, wo kein Aminosäurerest vorhanden ist, wird als *147aD für die Insertion einer Asparaginsäure an Position 147a angezeigt.

[0043] Mehrfach-Mutationen werden durch Schrägstrich-Markierungen ("/"), z.B. S145A/D147L, separiert, was Mutationen an den Positionen 145 und 147 darstellt, wobei Serin durch Alanin bzw. Asparaginsäure durch Leucin substituiert wird.

[0044] Sofern eine Substitution durch eine Mutation in z.B. einer CGTase, die von einem Stamm von Bacillus circulars abgeleitet ist, hergestellt wird, wird das Produkt z.B. als "B. circulars/S145A" bezeichnet.

[0045] Alle Positionen, auf die in dieser Anmeldung mittels CGTase-Nummerierung Bezug genommen wird, beziehen sich auf die oben beschriebenen CGTase-Nummern.

Tabelle 1

Aminosäuresequenz-Ablgeich, CGTase-Nummerierung und Domänen von ausgewählten CGTasen verschiedener bakterieller Herkunft

a Bacillus circulans 251; b Bacillus sp. 1-1; c Bacillus sp. 38-2; d Bacillus sp. 1011; e Bacillus licheniformis; f Bacillus macerans; g Bacillus ohbensis, h Bacillus stearothermophilus; i Klebsiella pneumoniae; j Thermoanaerobacter ATCC 53627.

Nr.	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	Domäne
1	A	E	A	A	D	S	D	A	E	A	A
2	P	A	P	P	A	P	*	G	P	P	A
3	D	D	D	D	D	D	*	N	E	D	A
4	T	*	T	T	T	T	*	*	E	T	A
5	S	*	S	S	*	S	*	*	T	S	A
6	V	V	V	V	V	V	V	*	Y	V	A

[Fortsetzung Tabelle 1 nächste Seite]

7	S	T	S	S	T	D	T	L	*	S	A
8	N	N	N	N	N	N	N	N	*	N	A
9	K	K	K	K	K	K	K	K	*	V	A
10	Q	V	Q	Q	Q	V	V	V	L	V	A
11	N	N	N	N	N	N	N	N	D	N	A
12	F	Y	F	F	F	F	Y	F	F	Y	A
13	S	S	S	S	S	S	T	T	R	S	A
14	T	D	T	T	T	T	R	S	K	T	A
14a	*	K	*	*	*	*	R	*	K	*	A
15	D	D	D	D	D	D	D	D	E	D	A
16	V	V	V	V	V	V	V	V	T	V	A
17	I	I	I	I	I	I	I	V	I	I	A
18	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	A
19	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	F	Q	A
20	I	I	I	I	V	I	I	I	L	I	A
21	F	V	F	F	F	V	V	V	F	V	A
22	T	T	T	T	T	T	T	V	L	T	A
23	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	A
24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
25	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	A
26	S	S	S	S	L	A	S	V	S	L	A
27	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	A
28	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
29	N	N	N	N	N	D	D	N	D	N	A
30	P	P	P	P	P	R	P	T	P	P	A
31	A	G	A	A	S	T	S	S	S	S	A
32	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A
33	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A
34	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	A
35	T	S	T	T	T	A	T	S	G	T	A
36	G	G	G	G	G	G	G	G	F	G	A
37	A	A	A	A	A	D	A	A	N	D	A
38	A	I	A	A	A	A	I	L	S	L	A

39	F	F	F	F	F	F	Y	F	A	Y	A
40	D	S	D	D	D	S	S	S	T	D	A
41	G	Q	G	G	G	G	Q	S	Y	P	A
42	T	N	S	S	T	D	D	G	D	T	A
43	C	C	C	C	C	R	C	C	P	H	A
44	T	I	T	T	S	S	S	T	N	T	A
45	N	D	N	N	N	N	D	N	N	S	A
46	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	A
47	R	H	R	R	K	K	H	R	K	K	A
48	L	K	L	L	L	L	K	K	K	K	A
49	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	A
50	C	C	C	C	C	F	C	C	T	F	A
51	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
52	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
53	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	A
54	W	W	W	W	W	W	W	W	L	W	A
55	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	R	Q	A
56	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
57	I	I	I	I	L	I	I	I	L	I	A
58	I	I	I	I	V	I	I	I	I	I	A
59	N	D	N	N	N	D	D	N	N	N	A
60	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	A
61	I	I	I	I	I	I	I	I	L	I	A
62	N	N	N	N	N	N	N	N	*	N	A
63	D	D	D	D	D	D	D	D	*	D	A
64	G	G	G	G	N	G	G	G	P	G	A
65	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	A
66	L	L	L	L	F	L	L	L	L	L	A
67	T	T	T	T	S	T	T	T	K	T	A
68	G	D	G	G	D	G	D	D	S	G	A
69	M	L	M	M	L	M	L	M	L	M	A
70	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
71	V	I	I	I	V	V	I	V	V	I	A

72	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A
73	A	A	A	A	A	A	A	A	S	A	A
74	I	L	I	I	L	L	I	I	I	I	A
75	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	A
76	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	A
77	S	S	S	S	S	S	S	S	T	S	A
78	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	P	Q	A
79	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	A
80	V	V	V	V	V	V	V	V	I	V	A
81	E	E	E	E	E	E	E	E	D	E	A
82	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	A
83	I	V	I	I	I	I	V	V	V	I	A
84	Y	Y	Y	Y	F	T	Y	F	N	Y	A
85	S	A	S	S	A	S	A	S	N	A	A
86	I	*	V	V	T	V	*	V	T	V	A
87	I	L	I	I	I	I	L	M	D	L	A
88	N	H	N	N	N	K	H	N	*	P	A
89	Y	P	Y	Y	Y	Y	P	D	*	D	A
90	S	S	S	S	S	S	S	A	A	S	A
91	G	G	G	G	G	G	G	S	A	T	A
91a	*	Y	*	*	*	*	Y	*	*	F	A
92	V	*	V	V	V	V	*	*	*	G	A
93	N	*	H	N	T	N	*	G	G	G	A
94	N	*	N	N	N	N	*	S	N	S	A
95	T	T	T	T	T	T	T	A	T	T	A
96	A	S	A	A	A	S	S	S	G	S	A
97	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	A
98	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	A
99	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
100	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	A
101	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	A
102	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A
103	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A

104	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	A
105	F	Y	F	F	F	F	Y	F	Y	F	A
106	K	K	K	K	K	K	K	K	F	K	A
107	K	K	K	K	K	Q	R	K	R	K	A
108	T	T	T	T	T	T	T	P	I	T	A
109	N	N	N	N	N	N	N	N	D	N	A
110	P	P	P	P	P	D	P	P	E	P	A
111	A	Y	A	A	Y	A	F	F	H	F	A
112	Y	Y	Y	Y	F	F	Y	F	F	F	A
113	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
114	T	N	T	T	T	D	D	T	N	S	A
115	I	F	M	M	M	F	F	L	L	F	A
116	A	D	Q	Q	T	A	S	S	D	T	A
117	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	A
118	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	A
119	Q	D	K	K	Q	Q	D	Q	K	Q	A
120	N	R	N	N	N	N	R	R	E	N	A
121	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	A
122	I	M	I	I	V	I	M	V	T	I	A
123	A	S	D	D	T	D	D	D	S	A	A
124	A	T	T	T	T	T	T	A	L	T	A
125	A	A	A	A	A	L	A	A	M	A	A
126	H	H	H	H	H	T	H	H	H	H	A
127	A	S	A	A	A	L	S	A	S	A	A
128	K	N	H	H	K	I	N	K	P	H	A
129	N	G	N	N	G	T	G	G	D	N	A
130	I	I	I	I	I	S	I	I	Y	I	A
131	K	K	K	K	K	R	K	K	N	K	A
132	V	V	V	V	I	S	V	V	M	V	A
133	I	I	I	I	I	D	I	I	K	I	A
134	I	M	I	I	I	R	M	I	L	I	A
135	D	D	D	D	D	L	D	D	V	D	A
136	F	F	F	F	F	R	F	F	L	F	A

137	A	T	A	A	A	P	T	A	D	A	A
138	P	P	P	P	P	Q	P	P	Y	P	A
139	N	N	N	N	N	P	N	N	A	N	A
140	H	H	H	H	H	H	H	H	P	H	A
141	T	S	T	T	T	V	S	T	N	T	A
142	S	S	S	S	S	S	S	S	H	S	A
143	P	P	P	P	P	G	P	P	S	P	A
144	A	A	A	A	A	R	A	A	N	A	B
145	S	L	S	S	M	A	L	S	A	S	B
146	S	E	S	S	E	G	E	E	N	E	B
147	D	T	D	D	T	T	T	T	D	T	B
148	Q	N	D	D	D	N	D	N	E	D	B
149	P	P	P	P	T	P	P	P	N	P	B
150	S	N	S	S	S	G	S	S	E	T	B
151	F	Y	F	F	F	F	Y	Y	F	Y	B
152	A	V	A	A	A	A	A	M	G	G	B
153	E	E	E	E	E	E	E	E	A	E	B
154	N	N	N	N	N	N	N	N	L	N	B
155	G	G	G	G	G	G	G	G	Y	G	B
156	R	A	R	R	K	A	A	R	R	R	B
157	L	I	L	L	L	L	V	L	D	L	B
158	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	G	Y	B
159	D	D	D	D	D	D	N	D	V	D	B
160	N	N	N	N	N	N	D	N	F	N	B
161	G	G	G	G	G	G	G	G	I	G	B
162	T	A	N	N	N	S	V	T	T	V	B
163	L	L	L	L	L	L	L	L	D	L	B
164	L	L	L	L	V	L	I	L	Y	L	B
165	G	G	G	G	G	G	G	G	P	G	B
166	G	N	G	G	G	A	N	G	T	G	B
167	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	B
168	T	S	T	T	T	S	S	T	V	T	B
169	N	N	N	N	N	N	N	N	A	N	B

170	D	D	D	D	D	D	D	D	A	D	B
171	T	Q	T	T	T	T	P	A	N	T	B
172	Q	Q	Q	Q	N	A	N	N	T	N	B
173	N	N	N	N	G	G	N	M	G	G	B
174	L	L	L	L	Y	L	L	Y	W	Y	B
175	F	F	F	F	F	F	F	F	Y	F	B
176	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B
177	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	B
178	N	N	Y	Y	N	N	N	N	N	Y	B
179	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	B
180	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	B
181	T	T	T	T	S	T	T	T	V	T	B
182	D	D	D	D	D	D	D	T	T	N	B
182a	*	*	*	*	*	*	*	*	N	*	B
183	F	F	F	F	F	F	F	F	W	F	B
184	S	S	S	S	S	S	S	S	N	S	B
185	T	S	T	T	T	T	S	S	D	S	B
186	T	Y	I	I	L	I	Y	L	F	Y	B
187	E	E	E	E	E	E	E	E	F	E	B
188	N	D	N	N	N	D	D	D	Q	D	B
189	G	S	G	G	G	G	S	G	V	G	B
190	I	I	I	I	I	I	I	I	K	I	B
191	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	B
192	K	R	K	K	K	K	R	R	H	R	B
193	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	B
194	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	B
195	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	F	F	F	B
196	D	D	D	D	D	D	D	D	N	D	B
197	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	B
198	A	A	A	A	A	A	A	A	S	A	B
199	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	B
200	L	Y	L	L	L	I	Y	L	L	L	B
201	N	D	N	N	N	N	D	N	N	D	B

202	H	L	H	H	H	H	L	H	Q	Q	B
203	N	N	N	N	N	N	N	Q	S	Q	B
204	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	B
205	S	T	S	S	S	N	T	P	T	S	A
206	T	V	S	S	T	A	V	V	D	T	A
207	V	M	V	V	I	M	M	I	V	I	A
208	D	D	D	D	D	D	D	D	Y	D	A
209	V	Q	V	V	T	A	Q	R	Q	S	A
210	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	A
211	L	L	L	L	F	F	L	L	L	L	A
212	K	K	K	K	K	K	K	K	L	K	A
213	D	E	D	D	D	S	E	D	D	A	A
214	A	S	A	A	A	A	S	A	G	A	A
215	I	I	I	I	I	I	I	V	S	I	A
216	K	K	K	K	K	D	K	K	K	K	A
217	M	F	M	M	L	L	L	M	F	L	A
218	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	A
219	L	L	L	L	L	L	L	I	I	L	A
220	D	D	D	D	D	G	D	D	D	D	A
221	L	K	L	L	M	M	K	M	A	M	A
222	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
223	I	I	V	V	V	V	I	I	V	I	A
224	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	A
225	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	A
226	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	A
227	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A
228	M	V	V	V	V	F	V	M	I	M	A
229	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	A
230	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
231	V	V	V	V	V	V	V	V	I	V	A
232	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	A
233	H	H	H	H	H	Q	H	H	H	H	A
234	M	M	M	M	M	Y	M	M	M	M	A

235	P	S	P	P	P	P	S	P	D	A	A
236	F	E	F	F	Q	F	E	F	K	F	A
237	G	G	G	G	G	G	G	G	S	G	A
238	W	W	W	W	W	W	W	W	F	W	A
239	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	I	Q	A
240	K	T	K	K	K	K	T	K	Q	K	A
241	S	S	S	S	N	S	S	S	K	N	A
242	F	L	F	F	W	F	L	L	W	F	A
243	M	M	M	M	M	V	M	M	T	M	A
244	A	S	S	A	S	S	S	D	S	D	A
245	A	E	T	T	S	S	D	E	D	S	A
246	V	I	I	I	I	I	I	I	I	I	A
247	N	Y	N	N	Y	Y	Y	D	Y	L	A
248	N	S	N	N	A	G	A	N	D	S	A
249	Y	H	Y	Y	H	G	H	Y	Y	Y	A
249a	*	*	*	*	*	D	*	*	S	*	A
250	K	K	K	K	K	H	E	R	K	R	A
251	P	P	P	P	P	P	P	P	S	P	A
252	V	V	V	V	V	V	V	V	I	V	A
253	F	F	F	F	F	F	F	F	G	F	A
254	T	T	N	T	T	T	T	T	R	T	A
255	F	F	F	F	F	F	F	F	E	F	A
256	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
257	E	E	E	E	E	E	E	E	F	E	A
258	W	W	W	W	W	W	W	W	F	W	A
259	F	F	F	F	F	Y	F	F	F	Y	A
260	L	L	L	L	L	L	L	L	F	L	A
261	G	G	G	G	G	G	G	S	G	G	A
262	V	S	V	V	S	A	S	E	E	T	A
263	N	G	N	N	A	D	G	N	W	N	A
264	E	E	E	E	A	Q	E	E	F	E	A
265	V	V	I	I	P	T	V	V	G	V	A
266	S	D	S	S	D	D	D	D	A	D	A

267	P	P	P	P	A	G	P	A	S	P	A
268	E	Q	E	E	D	D	Q	N	A	N	A
269	N	N	Y	Y	N	N	N	N	N	N	A
270	H	H	H	H	T	I	H	H	T	T	A
271	K	H	Q	Q	D	K	H	Y	T	Y	A
272	F	F	F	F	F	F	F	F	T	F	A
273	A	A	A	A	A	A	A	A	G	A	A
274	N	N	N	N	N	N	N	N	V	N	A
275	E	E	E	E	E	E	E	E	D	E	A
276	S	S	S	S	S	S	S	S	G	S	A
277	G	G	G	G	G	G	G	G	N	G	A
278	M	M	M	M	M	M	M	M	A	M	A
279	S	N	S	S	S	N	S	S	I	S	A
280	L	L	L	L	L	L	L	L	D	L	A
281	L	L	L	L	L	L	L	L	Y	L	A
282	D	D	D	D	D	D	D	D	A	D	A
283	F	F	F	F	F	F	F	F	N	F	A
284	R	Q	P	R	R	E	Q	R	T	R	A
285	F	F	F	F	F	Y	F	F	S	F	A
286	A	G	A	A	N	A	G	G	G	A	A
287	Q	Q	Q	Q	S	Q	Q	Q	S	Q	A
288	K	T	K	K	A	E	T	K	A	K	A
289	V	I	A	A	V	V	I	L	L	V	A
290	R	R	R	R	R	R	R	R	L	R	A
291	Q	N	Q	Q	N	E	D	Q	D	Q	A
292	V	V	V	V	V	V	V	V	F	V	A
293	F	L	F	F	F	F	L	L	G	F	A
294	R	K	R	R	R	R	M	R	F	R	A
295	D	D	D	D	D	D	D	N	R	D	A
296	N	R	N	N	N	K	G	N	D	N	A
297	T	T	T	T	T	T	S	S	T	T	A
298	D	S	D	D	S	E	S	D	L	D	A
299	N	N	N	N	N	T	N	N	E	T	A

300	M	W	M	M	M	M	W	W	R	M	A
301	Y	Y	Y	Y	Y	K	Y	Y	V	Y	A
302	G	D	G	G	A	D	D	G	L	G	A
303	L	F	L	L	L	L	F	F	V	L	A
304	K	N	K	K	D	Y	N	N	G	D	A
305	A	E	A	A	S	E	E	Q	R	S	A
306	M	M	M	M	M	V	M	M	S	M	A
307	L	I	L	L	L	L	I	I	G	I	A
308	E	T	E	E	T	A	A	Q	N	Q	A
309	G	S	G	G	A	S	S	D	T	S	A
310	S	T	S	S	T	T	T	T	M	T	A
311	A	E	E	E	A	E	E	A	K	A	A
312	A	K	V	V	A	S	E	S	T	A	A
313	D	E	D	D	D	Q	D	A	L	D	A
314	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	N	Y	A
315	A	N	A	A	N	D	D	D	S	N	A
316	Q	E	Q	Q	Q	Y	E	E	Y	F	A
317	V	V	V	V	V	I	V	V	L	I	A
318	D	I	N	N	N	N	I	L	I	N	A
319	D	D	D	D	D	N	D	D	K	D	A
320	Q	Q	Q	Q	Q	M	Q	Q	R	M	A
321	V	V	V	V	V	V	V	V	Q	V	A
322	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A
323	F	F	F	F	F	F	F	F	V	F	A
324	I	I	I	I	I	I	I	I	F	I	A
325	D	D	D	D	D	D	D	D	T	D	A
326	N	N	N	N	N	N	N	N	S	N	A
327	H	H	H	H	H	H	H	H	D	H	A
328	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	A
329	M	M	M	M	M	M	M	M	W	M	A
330	E	S	E	E	D	D	S	D	Q	D	A
331	R	R	R	R	R	R	R	R	V	R	A
332	F	F	F	F	F	F	F	F	V	F	A

333	H	S	H	H	K	Q	S	M	F	Y	A
334	A	V	T	T	T	V	F	I	M	T	A
335	S	G	S	S	S	A	E	D	D	G	A
336	N	S	N	N	A	G	Q	G	N	*	A
337	A	S	G	G	V	S	S	G	H	G	A
338	N	S	D	D	N	G	S	D	D	S	A
339	R	N	R	R	N	T	N	P	M	T	A
340	R	R	R	R	R	R	R	R	A	R	A
341	K	Q	K	K	R	A	H	K	R	P	A
342	L	T	L	L	L	T	T	V	I	V	A
343	E	D	E	E	E	E	D	D	G	E	A
344	Q	M	Q	Q	Q	Q	I	M	T	Q	A
345	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
346	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	A
347	A	A	A	A	A	A	A	A	R	A	A
348	F	V	F	F	F	L	V	V	S	F	A
349	T	L	T	T	T	T	L	L	N	T	A
350	L	L	L	L	L	L	L	L	A	L	A
351	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	A
352	S	S	S	S	S	S	S	S	T	S	A
353	R	R	R	R	R	R	R	R	F	R	A
354	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
355	V	V	V	V	V	V	V	V	P	V	A
356	P	P	P	P	P	P	P	P	G	P	A
357	A	T	A	A	A	A	T	N	N	A	A
358	I	I	I	I	I	I	I	I	N	I	A
359	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	E	Y	A
360	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	A
361	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	A
362	T	T	S	S	T	T	T	T	G	T	A
363	E	E	E	E	E	E	E	E	S	E	A
364	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	A
365	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	S	Y	A

366	M	V	M	M	L	M	L	M	E	M	A
367	S	T	S	S	T	T	T	T	A	T	A
368	G	G	G	G	G	G	G	G	F	G	A
369	G	G	G	G	N	D	G	N	A	N	A
370	T	N	N	N	G	G	N	G	Q	G	A
371	D	D	D	D	D	D	D	D	K	D	A
372	P	P	P	P	P	P	P	P	R	P	A
373	D	E	D	D	D	N	E	N	I	Y	A
374	N	N	N	N	N	N	N	N	D	N	A
375	R	R	R	R	R	R	R	R	L	R	A
376	A	K	A	A	G	A	K	K	G	A	A
377	R	P	R	R	K	M	P	M	L	M	A
378	I	L	I	L	M	M	M	M	V	M	A
379	P	K	P	P	P	T	S	S	A	T	A
380	S	T	S	S	S	S	D	S	T	S	A
381	F	F	F	F	F	F	F	F	M	F	A
382	S	D	S	S	S	N	D	N	T	D	A
383	T	R	T	T	K	T	R	K	V	T	A
384	S	S	T	T	S	G	T	N	R	T	A
385	T	T	T	T	T	T	T	T	G	T	A
386	T	N	T	T	T	T	N	R	I	T	A
387	A	S	A	A	A	A	S	A	P	A	A
388	Y	Y	Y	Y	F	Y	Y	Y	A	Y	A
389	Q	Q	Q	Q	N	K	Q	Q	I	N	A
390	V	I	V	V	V	V	I	V	Y	V	A
391	I	I	I	I	I	I	I	I	Y	I	A
392	Q	S	Q	Q	S	Q	S	Q	G	K	A
393	K	K	K	K	K	A	T	K	T	K	A
394	L	L	L	L	L	L	L	L	E	L	A
395	A	A	A	A	A	A	A	S	H	A	A
396	P	S	P	P	P	P	S	S	Y	P	A
397	L	L	L	L	L	L	L	L	A	L	A
398	R	R	R	R	R	R	R	R	A	R	A

399	K	Q	K	K	K	K	Q	R	N	K	A
400	C	T	S	S	S	S	N	N	F	S	A
401	N	N	N	N	N	N	N	N	T	N	A
402	P	S	P	P	P	P	P	P	S	P	A
403	A	A	A	A	A	A	A	A	N	A	A
404	I	L	I	I	I	I	L	L	S	I	A
405	A	G	A	A	A	A	G	A	F	A	A
406	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	G	Y	A
407	G	G	G	G	G	G	G	G	Q	G	C
408	S	T	S	S	S	T	N	D	V	T	C
409	T	T	T	T	T	T	T	T	G	Q	C
410	Q	T	Q	H	Q	T	S	E	S	K	C
411	E	E	E	E	Q	E	E	Q	D	Q	C
412	R	R	R	R	R	R	R	R	P	R	C
413	W	W	W	W	W	W	W	W	Y	W	C
414	I	L	I	I	I	V	I	I	N	I	C
415	N	N	N	N	N	N	N	N	R	N	C
416	N	E	N	N	N	N	S	G	E	N	C
417	D	D	D	D	D	D	D	D	K	D	C
418	V	I	V	V	V	V	V	V	M	V	C
419	L	Y	I	I	Y	L	Y	Y	P	Y	C
420	I	I	I	I	I	I	I	V	G	I	C
421	Y	Y	Y	Y	Y	I	Y	Y	F	Y	C
422	E	E	E	E	E	E	E	E	D	E	C
423	R	R	R	R	R	R	R	R	T	R	C
424	K	T	K	K	K	K	S	Q	E	Q	C
425	F	F	F	F	F	F	F	F	S	F	C
426	G	G	G	G	G	G	G	G	E	G	C
427	S	N	N	N	K	S	D	K	A	N	C
428	N	S	N	N	S	S	S	D	F	N	C
429	V	I	V	V	V	A	V	V	S	V	C
430	A	V	A	A	A	A	V	V	I	A	C
431	V	L	V	V	V	L	L	L	I	L	C

432	V	T	V	V	V	V	T	V	K	V	C
433	A	A	A	A	A	A	A	R	T	A	C
434	V	V	I	I	V	I	V	V	L	I	C
435	N	N	N	N	N	N	N	N	G	N	C
436	R	S	R	R	R	R	S	R	D	R	C
437	N	*	N	N	N	N	*	S	L	N	C
438	L	S	M	M	L	S	G	S	R	L	C
439	N	N	N	N	T	S	D	S	K	S	C
440	A	S	T	T	T	A	T	S	S	T	C
441	P	N	P	P	P	A	S	N	S	S	C
442	A	Q	A	A	T	Y	Y	Y	P	Y	C
443	S	T	S	S	S	P	T	S	A	Y	C
444	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	C
445	S	T	T	T	T	S	N	T	Q	T	C
446	G	N	G	G	N	G	N	G	N	G	C
447	L	L	L	L	L	L	L	L	G	L	C
448	V	N	V	V	N	L	N	F	T	Y	C
449	T	T	T	T	T	S	T	T	Y	T	C
450	S	S	S	S	S	S	S	A	T	A	C
451	L	L	L	L	L	L	L	L	E	L	C
452	P	P	P	R	P	P	P	P	L	P	C
453	Q	Q	Q	R	S	A	Q	A	W	A	C
454	G	G	G	A	G	G	G	G	V	G	C
455	S	N	S	S	T	T	Q	T	N	T	C
456	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	D	Y	C
457	N	T	N	N	T	S	T	T	D	S	C
458	D	D	D	D	D	D	D	D	I	D	C
459	V	E	V	V	V	V	E	Q	L	M	C
460	L	L	L	L	L	L	L	L	V	L	C
461	G	Q	G	G	G	N	Q	G	F	G	C
462	G	Q	G	G	G	G	Q	G	E	G	C
463	L	R	I	I	V	L	L	L	R	L	C
464	L	L	L	L	L	L	L	L	R	L	C

465	N	D	N	N	N	N	D	D	S	N	C
466	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	C
467	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	C
468	T	T	T	T	N	S	E	T	D	S	C
469	L	I	L	L	I	I	I	I	I	I	C
470	S	T	T	T	T	T	T	Q	V	T	C
471	V	V	V	V	S	V	V	V	I	V	C
472	G	N	G	G	S	G	N	G	V	S	C
473	S	A	A	A	G	S	S	S	A	S	C
474	G	N	G	G	G	G	N	N	L	N	C
475	G	G	G	G	N	G	G	G	N	G	C
476	A	A	A	A	I	A	A	S	R	S	C
477	A	V	A	A	*	V	V	V	G	V	C
478	S	N	S	S	S	T	D	N	E	T	C
479	N	S	N	N	S	N	S	A	A	P	C
480	F	F	F	F	F	F	F	F	N	F	C
481	T	Q	T	T	T	T	Q	D	T	T	C
482	L	L	L	L	L	L	L	L	I	L	C
483	A	R	A	A	A	A	S	G	N	A	C
484	A	A	P	P	A	A	A	P	V	P	C
485	G	N	G	G	G	G	N	G	K	G	C
486	G	S	G	G	A	G	G	E	N	E	C
487	T	V	T	T	T	T	V	V	I	V	C
488	A	A	A	A	A	A	S	G	A	A	C
489	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	C
490	W	W	W	W	W	W	W	W	P	W	C
491	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	A	N	Q	C
492	Y	V	Y	Y	Y	Y	I	Y	G	Y	C
493	T	S	T	T	T	T	T	S	V	V	C
494	A	N	T	T	A	A	E	A	Y	S	C
495	A	P	D	D	S	P	E	T	P	T	C
496	T	S	A	A	E	E	H	E	S	T	D
497	A	T	T	T	T	T	A	S	L	N	D

498	T	S	A	T	T	S	S	T	I	P	D
499	P	P	P	P	P	P	P	P	G	P	D
500	T	L	I	I	T	A	L	I	N	L	D
501	I	I	N	I	I	I	I	I	N	I	D
502	G	G	G	G	G	G	G	G	S	G	D
503	H	Q	N	N	H	N	H	H	V	H	D
504	V	V	V	V	V	V	V	V	S	V	D
505	G	G	G	G	G	G	G	G	V	G	D
506	P	P	P	P	P	P	P	P	A	P	D
507	M	M	M	M	V	T	M	M	N	T	D
508	M	M	M	M	M	M	M	M	K	M	D
509	A	G	A	A	G	G	G	G	R	T	D
510	K	K	K	K	K	Q	K	Q	T	K	D
511	P	A	A	P	P	P	H	V	T	A	D
512	G	G	G	G	G	G	G	G	L	G	D
513	V	N	V	V	N	N	N	H	T	Q	D
514	T	T	T	T	V	I	T	Q	L	T	D
515	I	I	I	I	V	V	V	V	M	I	D
516	T	T	T	T	T	T	T	T	Q	T	D
517	I	V	I	I	I	I	I	I	N	I	D
518	D	S	D	D	D	D	T	D	E	D	D
519	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	D
520	R	E	R	R	R	R	E	E	V	R	D
521	G	G	A	G	G	G	G	G	V	G	D
522	F	F	*	F	F	F	F	F	I	F	D
523	G	G	S	G	G	G	G	G	R	G	D
524	S	D	A	S	S	G	D	T	S	T	D
525	S	E	R	G	A	T	N	N	Q	T	D
526	K	R	Q	K	K	A	E	T	S	A	D
527	G	G	G	G	G	G	G	G	D	G	D
528	T	S	T	T	T	T	S	T	D	Q	D
529	V	V	V	V	V	V	V	V	A	V	D
530	Y	L	Y	Y	Y	Y	L	K	E	L	D

531	F	F	F	F	F	F	F	F	N	F	D
532	G	D	G	G	G	G	D	G	P	G	D
533	T	S	T	T	T	T	S	T	T	T	D
534	T	T	T	T	T	T	D	T	V	T	D
535	A	S	A	A	A	A	F	A	Q	P	D
536	V	S	V	V	V	V	S	A	S	A	D
537	S	E	T	T	T	T	D	N	I	T	D
538	G	*	G	G	G	G	*	*	N	*	D
539	A	*	A	A	S	S	*	*	F	*	D
540	D	*	D	D	A	G	*	*	T	*	D
541	I	I	I	I	I	I	V	V	C	I	D
542	T	I	V	V	T	V	L	V	N	V	D
543	S	S	A	A	S	S	S	S	N	S	D
544	W	W	W	W	W	W	W	W	G	W	D
545	E	S	E	E	E	E	S	S	Y	E	D
546	D	N	D	D	D	D	D	N	T	D	D
547	T	T	T	T	T	T	T	N	I	T	D
548	Q	K	Q	Q	Q	Q	K	Q	S	E	D
549	I	I	I	I	I	I	I	I	G	V	D
550	K	S	Q	Q	K	K	E	V	Q	K	D
551	V	V	V	V	V	A	V	V	S	V	D
552	K	K	K	K	T	V	S	A	V	K	D
553	I	V	I	I	I	I	V	V	Y	V	D
554	P	P	L	P	P	P	P	P	I	P	D
555	A	N	R	A	P	K	D	N	I	A	D
556	V	V	V	V	V	V	V	V	G	L	D
557	A	A	P	P	A	A	T	S	N	T	D
558	G	G	G	G	G	A	A	P	I	P	D
559	G	G	G	G	G	G	G	G	P	G	D
560	N	Y	I	I	D	K	H	K	Q	K	D
561	Y	Y	Y	Y	Y	T	Y	Y	L	Y	D
562	N	D	D	D	A	G	D	N	G	N	D
563	I	L	I	I	V	V	I	I	G	I	D

564	K	S	R	R	K	S	S	T	W	T	D
565	V	V	V	V	V	V	V	V	D	L	D
566	A	V	A	A	A	K	V	Q	L	K	D
567	N	T	N	N	A	T	N	S	T	T	D
568	A	A	A	A	*	S	A	S	K	A	D
569	A	A	A	A	N	S	G	S	A	S	D
570	G	N	G	G	G	G	D	G	V	G	D
571	T	I	A	A	V	T	S	Q	K	V	D
572	A	K	A	A	N	A	Q	T	I	T	D
573	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	D
574	N	P	N	N	N	N	P	A	P	N	D
575	V	T	I	I	A	T	T	A	T	S	D
576	Y	Y	Y	Y	Y	F	Y	Y	Q	Y	D
577	D	K	D	D	N	K	D	D	Y	N	D
578	N	E	N	N	D	S	K	N	P	N	D
579	F	F	F	F	F	F	F	F	Q	I	D
580	E	E	E	E	T	N	E	E	W	N	D
581	V	V	V	V	I	V	V	V	S	V	D
582	L	L	L	L	L	L	L	L	A	L	D
583	S	S	T	T	S	T	T	T	S	T	D
584	G	G	G	G	G	G	G	N	L	G	E
585	D	N	D	D	D	D	D	D	E	N	E
586	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	L	Q	E
587	V	V	V	V	V	V	V	V	P	V	E
588	S	S	T	T	S	T	S	S	S	C	E
589	V	V	V	V	V	V	I	V	D	V	E
590	R	R	R	R	R	R	R	R	L	R	E
591	F	F	F	F	F	F	F	F	N	F	E
592	V	G	V	V	V	L	A	V	V	V	E
593	V	V	I	I	I	V	V	V	E	V	E
594	N	N	N	N	N	N	N	N	W	N	E
595	N	N	N	N	N	Q	N	N	K	N	E
596	A	A	A	A	A	A	A	A	C	A	E

597	T	T	T	T	T	N	T	T	V	T	E
598	T	T	T	T	T	T	T	T	K	T	E
599	A	S	A	A	A	N	S	N	R	V	E
600	L	P	L	L	L	Y	L	L	N	W	E
601	G	G	G	G	G	G	G	G	E	G	E
602	Q	T	Q	Q	E	T	T	Q	T	E	E
603	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	E
604	V	L	V	V	I	V	L	I	P	V	E
605	Y	Y	F	F	Y	Y	Y	Y	T	Y	E
606	L	I	L	L	L	L	M	I	A	L	E
607	T	V	T	T	T	V	V	V	N	T	E
608	G	G	G	G	G	G	G	G	V	G	E
609	S	N	N	N	N	N	N	N	E	N	E
610	V	V	V	V	V	A	V	V	W	V	E
611	S	N	S	S	S	A	N	Y	Q	A	E
612	E	E	E	E	E	E	E	E	S	E	E
613	L	L	L	L	L	L	L	L	G	L	E
614	G	G	G	G	G	G	G	G	A	G	E
615	N	N	N	N	N	T	N	N	N	N	E
616	W	W	W	W	W	W	W	W	N	W	E
617	D	D	D	D	T	D	D	D	Q	D	E
618	P	A	P	P	T	P	P	T	F	T	E
619	A	D	N	N	G	N	D	S	N	S	E
620	K	K	N	N	A	K	Q	K	S	K	E
621	A	A	A	A	A	A	A	A	N	A	E
621a	*	*	*	*	S	*	*	*	*	*	E
622	I	I	I	I	I	I	I	I	D	I	E
623	G	G	G	G	G	G	G	G	T	G	E
624	P	P	P	P	P	P	P	P	Q	P	E
625	M	M	M	M	A	M	M	M	T	M	E
626	Y	F	Y	Y	F	Y	F	F	T	F	E
627	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	E
628	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	G	Q	E

629	V	V	V	V	V	V	V	V	S	V	E
630	V	M	V	V	I	I	M	V	F	V	E
631	Y	Y	Y	Y	H	A	Y	Y	F	Y	E
632	Q	Q	Q	Q	A	K	Q	S		Q	E
633	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	E
634	P	P	P	P	P	P	P	P		P	E
635	N	T	T	T	T	S	T	T		T	E
636	W	W	W	W	W	W	W	W		W	E
637	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	E
638	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	I		Y	E
639	D	D	D	D	D	D	D	D		D	E
640	V	I	V	V	V	V	I	V		V	E
641	S	S	S	S	S	S	S	S		S	E
642	V	V	V	V	V	V	V	V		V	E
643	P	P	P	P	P	P	P	P		P	E
644	A	A	A	A	A	A	A	E		A	E
645	G	G	G	G	G	G	E	G		G	E
646	K	K	Q	Q	K	T	E	K		T	E
647	T	N	T	T	Q	K	N	T		T	E
648	I	L	I	I	L	L	L	I		I	E
649	E	E	E	E	E	D	E	E		E	E
650	F	Y	F	F	F	F	Y	F		F	E
651	K	K	K	K	K	K	K	K		K	E
652	F	Y	F	F	F	F	F	F		F	E
653	L	I	L	L	F	I	I	I		I	E
654	K	K	K	K	K	K	K	K		K	E
655	K	K	K	K	K	K	K	K		K	E
656	Q	D	Q	Q	N	G	D	D		N	E
657	G	Q	G	G	G	G	S	S		G	E
658	S	N	S	S	A	G	S	Q		S	E
658a	*	G	*	*	*	*	G	G		*	E
659	T	N	T	T	T	T	N	N		T	E
660	V	V	V	V	I	V	V	V		V	E

661	T	V	T	T	T	T	V	T	T	E
662	W	W	W	W	W	W	W	W	W	E
663	E	Q	E	E	E	E	E	E	E	E
664	G	S	G	G	G	G	S	S	G	E
665	G	G	G	G	G	G	G	G	G	E
666	S	N	A	A	S	G	N	S	Y	E
667	N	N	N	N	N	N	N	N	N	E
668	H	R	R	R	H	H	H	H	H	E
669	T	T	T	T	T	T	T	V	V	E
670	F	Y	F	F	F	Y	Y	Y	Y	E
671	T	T	T	T	T	T	T	T	T	E
672	A	S	T	T	T	T	T	T	T	E
673	P	P	P	P	P	P	P	P	P	E
674	S	T	T	T	T	A	A	T	T	E
675	S	T	S	S	S	S	T	N	S	E
676	G	G	G	G	G	G	G	T	G	E
677	T	T	T	T	T	V	T	T	T	E
678	A	D	A	A	A	G	D	G	A	E
679	T	T	T	T	T	T	T	K	T	E
680	I	V	V	V	V	V	V	I	V	E
681	N	M	N	N	T	T	L	I	I	E
682	V	I	V	V	I	V	V	V	V	E
683	N	N	N	N	N	D	D	D	D	E
684	W	W	W	W	W	W	W	W	W	E
685	Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	E
686	P		P	P		N		N	P	E

---

* An dieser Position nicht vorhandener Aminosäurerest

KURZE BESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0046] Die vorliegende Erfindung wird weiterhin durch Bezugnahme auf die begleitenden Zeichnungen illustriert, von denen:

[0047] Fig. 1 ein Model von der Struktur der Spalte des aktiven Zentrums (Domänen A und B) von einer CG-Tase von Bacillus circulans Stamm 251, die mit einem linearen Stärkemolekül komplexiert worden ist, und Reste, die in die Enzym-Substrat-Wechselwirkungen involviert sind, zeigt;

[0048] Fig. 2 die Bildung (% Cyclodextrin) von α-(•), β-(▮), und γ-Cyclodextrin (▲) aus 10% Paselli™ WA4

(prä-gelatinisierte, Trommel-getrocknete Stärke) während einer 50 Stunden dauernden Inkubation bei 50°C, katalysiert durch (A) Wildtyp-Enzym (CGTase von Bacillus circulans Stamm 251), (B) die CGTase-Variante Y89D, (C) die CGTase-Variante S146P und (D) die CGTase-Variante Y89D/S146P, zeigt;

[0049] Fig. 3 die Konstruktion des Plasmids pDP66K zeigt, wobei die Subklonierungsschritte neben den Pfeilen angezeigt werden;

[0050] Fig. 4 die Ergebnisse von Stärkebindungs-Experimenten (% Protein, das an Rohstärke gebunden ist) bei Stärkekonzentrationen von 0 bis 8% Rohstärke, (●) ohne β-Cyclodextrin und (o) mit 0,1 mM β-Cyclodextrin zeigt; (a) Wildtyp-Enzym (CGTase von Bacillus circulans Stamm 251), (b) die Variante W616A/W662A und (c) die Variante Y633A;

[0051] Fig. 5 die Ergebnisse von Reaktionskinetik-Experimenten (Aktivität, U/mg) anhand von Paselli™ SA2 (d.h. teilweise hydrolysierte Kartoffelstärke) bei Konzentrationen von 0 bis 5% Paselli™, (•) ohne β-Cyclodextrin, (o) mit 0,1 mM β-Cyclodextrin, und (♦) mit 0,2 mM β-Cyclodextrin zeigt; (a) Wildtyp-Enzym (CGTase von Bacillus circulans Stamm 251), (b) die Variante W616A/W662A und (c) die Variante Y633A;

[0052] Fig. 6 die Ergebnisse von Reaktionskinetik-Experimenten (Aktivität, U/mg) anhand von Rohstärke bei einer Stärkekonzentration von 0 bis 60% Rohstärke, (•) Wildtyp-Enzym (CGTase von Bacillus circulans Stamm 251), (□) die Variante W616A/W662A und (▬) die Variante Y633A zeigt, wobei die gepunktete Linie die Modell-Kurve, die sich aus der mutmaßlichen Wechselwirkung zwischen MBS2 und der E-Domäne und MBS3 und der C-Domäne ergibt, anzeigt;

[0053] Fig. 7 die Produktbildung (o α-Cyclodextrin-Bildung; □ β-Cyclodextrin-Bildung und Δ γ-Cyclodextrin-Bildung) von zwei CGTase-Varianten der Erfindung (N193G, Fig. 7B und Y89G, Fig. 7C), im Vergleich zu dem Wildtyp-Enzym (von Bacillus circulans Stamm 251, Fig. 7A) während einer Inkubation für 0 bis 45 Stunden zeigt;

[0054] Fig. 8 die Produktbildung (o α-Cyclodextrin-Bildung; □ β-Cyclodextrin-Bildung und Δ γ-Cyclodextrin-Bildung) von zwei CGTase-Varianten der Erfindung (*145aI, Fig. 8B und D371G, Fig. 8C), im Vergleich zu dem Wildtyp-Enzym (von Bacillus circulans Stamm 251, Fig. 8A) während einer Inkubation für 0 bis 45 Stunden zeigt;

[0055] Fig. 9 die Produktbildung (o α-Cyclodextrin-Bildung; □ β-Cyclodextrin-Bildung und Δ γ-Cyclodextrin-Bildung) von zwei CGTase-Varianten der Erfindung (N193G, Fig. 9B und Y89G, Fig. 9C), im Vergleich zu dem Wildtyp-Enzym (von Bacillus circulans Stamm 251, Fig. 9A) während einer Inkubation für 0 bis 10 Stunden zeigt; und

[0056] Fig. 10 die Produktbidlung (o α-Cyclodextrin-Bildung; □ β-Cyclodextrin-Bildung und Δ γ-Cyclodextrin-Bildung) von zwei CGTase-Varianten der Erfindung (145aI, Fig. 10B und D371G, Fig. 10C), im Vergleich zu dem Wildtyp-Enzym (von Bacillus circulans Stamm 251, Fig. 10A) während einer Inkubation für 0 bis 10 Stunden zeigt.

AUSFÜRHLICHE OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

Verfahren zum Herstellen von CGTase-Varianten

[0057] Im Zusammenhang mit dieser Erfindung beschreibt eine CGTase-Variante mit modifizierter Substratbindungsfähigkeit eine CGTase-Variante, die in der Lage ist, effizienter auf ihr Substrat zu wirken und/oder eine CGTase-Variante, die durch eine Produktinhibierung weniger beeinflusst wird. Im Zusammenhang mit dieser Erfindung beschreibt Produktinhibierung das Phänomen, dass ansteigende Mengen an Produkt die Substratumwandlung reduzieren oder sogar inhibieren. Es ist wünschenswert, CGTase-Varianten zu erhalten, die durch eine Produktinhibierung weniger beeinflusst werden (d.h. Varianten mit reduzierter Produktinhibierung).

[0058] Darüber hinaus beschreibt im Zusammenhang mit dieser Erfindung eine CGTase-Variante mit erhöhter Produktselektivität eine CGTase-Variante, die in der Lage ist, beliebige der verschiedenen Cyclodextrine selektiver herzustellen und dadurch den Anteil des gewünschten Produkts im Vergleich zu dem Vorläufer-Enzym zu erhöhen.

[0059] Die vorliegende Erfindung basiert auf dem Konzept, „Hindernisse" in den Subsites der Spalte des ak-

tiven Zentrums, der Substratbindungsspalte oder der Furche, die zu diesen Spalten führt, zu entfernen und/oder in diese einzuführen, und dadurch die Einführung des Substrats und seine Anlagerung derart zu erleichtern, dass Produkte mit einer vorherbestimmbaren Größe erhalten werden, und derart zu erleichtern, dass die Substratbindung nicht durch das Produkt inhibiert wird.

[0060] Durch Modifizieren der Substratbindung eines CGTase-Enzyms, kann seine Produktselektivität modifiziert werden, damit die CGTase-Variante in der Lage ist, jedes beliebige der verschiedenen Cyclodextrine, α-, β- und γ-Cyclodextrine, selektiver herzustellen. Es können sogar CGTasen erhalten werden, die in der Lage sind, δ-, ε- und ζ-Cyclodextrine mit 9, 10 bzw. 11 Glucoseeinheiten herzustellen. Eine Modifizierung der Substratbindung einer CGTase kann ebenfalls die Tendenz einer Produktinhibierung reduzieren, und dadurch die Cyclodextrin-Ausbeute der CGTase-Variante erhöhen.

[0061] Das Konzept der Erfindung kann anders auch als die Modifizierung der intermolekularen Wechselwirkungen der Enzym-Substrat-Seitenkette ausgedrückt werden. Durch das Einführen von spezifischen Mutationen gemäß der Erfindung können die intermolekularen Wechselwirkungen zwischen Substrat und CGTase verändert werden, um das Substrat zu einem spezifischen Ort in der Spalte des aktiven Zentrums zu lenken, und dadurch ein cyclisches oder lineares Produkt von vorherdefinierbarer Größe zu erhalten, bevorzugt ein α-, ein β- oder ein γ-Cyclodextrin oder δ-, ε- und ζ-Cyclodextrine eines linearen Oligosaccharids von ähnlicher Größe, bevorzugt von 2 bis 12 Glucoseeinheiten, stärker bevorzugt von 2 bis 9 Glucoseeinheiten.

[0062] Die Einführung von mehr intermolekularen Wechselwirkungen (z.B. mehr Potential zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindung („hydrogen bonding potential") in der Region rund um die Glucoseeinheiten C bis I, bevorzugt C bis H, aus **Fig. 1**, herum, hält das Substrat in einer Position, 6 Glucoseeinheiten von dem katalytischen Zentrum (zwischen den Glucoseeinheiten B und C in **Fig. 1**) entfernt fest und führt zu einer erhöhten Produktselektivität für α-Cyclodextrine (6 Glucoseeinheiten). Darüber hinaus kann die Bildung von größeren Cyclodextrinen und/oder größeren linearen Oligosacchariden gleichzeitig reduziert werden, indem potentielle intermolekulare Wechselwirkungen der Glucoseeinheit I bis J aus **Fig. 1** reduziert werden.

[0063] Die Einführung von mehr intermolekularen Wechselwirkungen (z.B. mehr Potential zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindung) in der Region rund um die Glucoseeinheiten F bis J, bevorzugt H und I, aus **Fig. 1**, herum, hält das Substrat in einer Position, 7 Glucoseeinheiten von dem katalytischen Zentrum (zwischen den Glucoseeinheiten B und C aus **Fig. 1**) entfernt, fest und führt zu einer erhöhten Produktselektivität für β-Cyclodextrine (7 Glucoseeinheiten). Darüber hinaus kann die Bildung von z.B. α-Cyclodextrinen und/oder kleinen linearen Oligosacchariden gleichzeitig reduziert werden, indem potentielle intermolekulare Wechselwirkungen der Glucoseeinheit C bis G aus **Fig. 1** reduziert werden.

[0064] Die Einführung von mehr intermolekularen Wechselwirkungen (z.B. mehr Potential zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindung) in der Region rund um die Glucoseeinheiten H bis K, bevorzugt I und J, aus **Fig. 1**, herum, hält das Substrat in einer Position, 8 Glucoseeinheiten von dem katalytischen Zentrum (zwischen den Glucoseeinheiten B und C aus **Fig. 1**) entfernt, fest und führt zu einer erhöhten Produktselektivität für γ-Cyclodextrine (8 Glucoseeinheiten). Darüber hinaus kann die Bildung von kleineren Cyclodextrinen und/oder linearen Oligosacchariden gleichzeitig reduziert werden, indem potentielle intermolekulare Wechselwirkungen der Glucoseeinheit C bis H aus **Fig. 1** reduziert werden.

[0065] Die Einführung von mehr intermolekularen Wechselwirkungen (z.B. mehr Potential zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindung) in der Region rund um die Glucoseeinheiten J bis M, bevorzugt K und L, aus **Fig. 1**, herum, hält das Substrat in einer Position, 9 Glucoseeinheiten von dem katalytischen Zentrum (zwischen den Glucoseeinheiten B und C aus **Fig. 1**) entfernt, fest und führt zu einer erhöhten Produktselektivität für δ-Cyclodextrine (9 Glucoseeinheiten). Darüber hinaus kann die Bildung von kleineren Cyclodextrinen und/oder linearen Oligosacchariden gleichzeitig reduziert werden, indem potentielle intermolekulare Wechselwirkungen der Glucoseeinheit C bis H aus **Fig. 1** reduziert werden.

[0066] Die Einführung von mehr intermolekularen Wechselwirkungen (z.B. mehr Potential zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindung) in der Region rund um die Glucoseeinheiten K bis N, bevorzugt L und M, aus **Fig. 1**, herum, hält das Substrat in einer Position, 10 Glucoseeinheiten von dem katalytischen Zentrum (zwischen den Glucoseeinheiten B und C aus **Fig. 1**) entfernt, fest und führt zu einer erhöhten Produktselektivität für ε-Cyclodextrine (10 Glucoseeinheiten). Darüber hinaus kann die Bildung von kleineren Cyclodextrinen und/oder linearen Oligosacchariden gleichzeitig reduziert werden, indem potentielle intermolekulare Wechselwirkungen der Glucoseeinheit C bis H aus **Fig. 1** reduziert werden.

[0067] Die Einführung von mehr intermolekularen Wechselwirkungen (z.B. mehr Potential zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindung) in der Region rund um die Glucoseeinheiten L bis O, bevorzugt M und N, aus Fig. 1, herum, hält das Substrat in einer Position, 11 Glucoseeinheiten von dem katalytischen Zentrum (zwischen den Glucoseeinheiten B und C aus Fig. 1) entfernt, fest und führt zu einer erhöhten Produktselektivität für ζ-Cyclodextrine (11 Glucoseeinheiten). Darüber hinaus kann die Bildung von kleineren Cyclodextrinen und/oder linearen Oligosacchariden gleichzeitig reduziert werden, indem potentielle intermolekulare Wechselwirkungen der Glucoseeinheit C bis H aus Fig. 1 reduziert werden.

[0068] Die Bildung von linearen Oligosacchariden mit einer gewünschten Länge kann erhöht werden, indem die obigen Bedingungen mit einer Substitution an der Cyclisierungsachse, die der Position 195, CGTase-Nummerierung, entspricht, kombiniert werden.

[0069] Das CGTase-Enzym, das dem Verfahren der Erfindung unterzogen wird, kann jede beliebige, in der Natur vorkommende CGTase sein. Die CGTase ist jedoch bevorzugt ein mikrobielles Enzym, bevorzugt ein bakterielles Enzym, und bevorzugt ist die CGTase von einem Stamm von Bacillus, einem Stamm von Brevibacterium, einem Stamm von Clostridium, einem Stamm von Corynebacterium, einem Stamm von Klebsiella, einem Stamm von Micrococcus, einem Stamm von Thermoanaerobium, einem Stamm von Thermoanaerobacter, einem Stamm von Thermoanaerobacterium oder einem Stamm von Thermoactinomyces abgeleitet.

[0070] In stärker bevorzugten Ausführungsformen ist die CGTase von einem Stamm von Bacillus autolyticus, einem Stamm von Bacillus cereus, einem Stamm von Bacillus circulans, einem Stamm von Bacillus circulans var. alkalophilus, einem Stamm von Bacillus coagulans, einem Stamm von Bacillus firmus, einem Stamm von Bacillus halophilus, einem Stamm von Bacillus macerans, einem Stamm von Bacillus megaterium, einem Stamm von Bacillus ohbensis, einem Stamm von Bacillus stearothermophilus, einem Stamm von Bacillus subtilis, einem Stamm von Klebsiella pneumoniae, einem Stamm von Thermoanaerobacter ethanolicus, einem Stamm von Thermoanaerobacter finnii, einem Stamm von Clostridium thermoamylolyticum, einem Stamm von Clostridium thermosaccharolyticum, oder einem Stamm von Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes abgeleitet.

[0071] In am stärksten bevorzugten Ausführungsformen ist die CGTase von dem Stamm Bacillus sp. Stamm 1011, dem Stamm Bacillus sp. Stamm 38-2, dem Stamm Bacillus sp. Stamm 17-1, dem Stamm Bacillus sp. 1-1, dem Stamm Bacillus sp. Stamm B1018, dem Stamm Bacillus circulans Stamm 8, dem Stamm Thermoanaerobacter sp. ATCC 53627 oder dem Stamm Bacillus circulans Stamm 251 oder einer Mutante oder einer Variante davon abgeleitet.

[0072] Der Stamm Thermoanaerobacter sp. ATCC 53627 wurde gemäß dem Budapester Vertrag über die internationale Anerkennung der Hinterlegung von Mikroorganismen für Zwecke des Patentverfahren bei der American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852, USA, am 3. Juni 1987 hinterlegt. Der Stamm Bacillus circulans Stamm 251 ist in der offenen Sammlung an dem Rijksinstituut voor Volksgezondheit (RIV), Bilthoven, Niederlande, hinterlegt worden und ihm ist die Zugangsnummer RIV 11115 zugeteilt worden und somit ist er öffentlich zugänglich.

[0073] Das Verfahren der Erfindung umfasst die Substitution, Insertion und/oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäurerest(en) des Enzyms, welche(r) Rest(e) eine Position in der Nähe des Substrats einnimmt/einnehmen, wenn das Substrat an das CGTase-Enzym, an seine Substratbindungsstellen, gebunden hat. In spezielleren Aspekten umfasst das Verfahren der Erfindung die Substitution, Insertion und/oder Deletion von zwei oder mehr Aminosäureresten, bevorzugt von drei oder mehr Aminosäureresten.

[0074] Im Zusammenhang mit dieser Erfindung zeigt ein CGTase-Aminosäurerest, der eine Position in der Nähe des Substrats einnimmt, einen Aminosäurerest an, der innerhalb des Enzyms derart lokalisiert ist, dass er innerhalb eines potentiellen intermolekularen (d.h. Enzym-Substrat) interaktiven Abstandes von einer Glucoseeinheit des Substrats (d.h. eines Polysaccharids) liegt. Beispiele von potentiellen intermolekularen Wechselwirkungen schließen ein, sind jedoch nicht hierauf beschränkt, Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen („hydrogen bonding"), Bildung von Ionenbindungen, polare Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen und aromatische Wechselwirkungen.

[0075] Eine Aminosäureposition, die in der Nähe des Substrats liegt, zeigt einen Abstand von weniger als 8 Å (Angström), bevorzugt weniger als 5 Å, stärker bevorzugt weniger als 3 Å, von dem Substrat an.

[0076] Diese Abstände werden unter Verwenden der CGTase von Bacillus circulans Stamm 251 [cf. Lawson

C L, van Montfort R, Strokopytov B, Rozeboom H J, Kalk K H, de Vries G E, Penninga D, Dijkhuizen L und Dijkstra B W; J. Mol. Biol. 1994 236 590–600], komplexiert mit einem Maltonanose-Derivat, berechnet, deren Koordinaten bei der Protein Data Bank, Biology Department, Bldg. 463, Brookhaven National Laboratory, P. O. Box 5000, Upton, NY 11973-5000, USA, unter dem Zugriffscode 1DIJ hinterlegt worden sind.

[0077] Das Wissen über diese Struktur macht es möglich, ähnliche Positionen in anderen CGTasen mit einer bekannten Primärstruktur zu identifizieren, wobei die Positionen den Positionen entsprechen, die in z.B. Tabelle 2, vgl. ebenfalls Tabelle 1, angegeben sind.

[0078] CGTasen besitzen Substratbindungsregionen, die in der A-Domäne, in der B-Domäne, in der C-Domäne und in der E-Domäne des Enzyms lokalisiert sind. Infolgedessen umfasst das Verfahren der Erfindung in einer bevorzugten Ausführungsform das Substituieren von einem oder mehreren Aminosäurerest(en) des CGTase-Enzyms, welche(r) Rest(e) in einer oder mehreren der A-, B-, C- und/oder E-Domäne(n), vgl. Tabelle 1, lokalisiert ist/sind.

[0079] Durch einen Sequenzabgleich und Molecular Modelling („Molekül-Modellierung") eines in der Natur vorkommenden CGTase-Enzyms, können Aminosäurereste, die in der Nähe des Substrats lokalisiert sind, identifiziert werden. Unter Verwenden eines Sequenzabgleichs kann die Tertiärstruktur von jeder beliebigen homologen CGTase auf der Basis von bekannten dreidimensionalen CGTase-Strukturen modelliert („modelled") werden.

[0080] Die nachfolgende Tabelle 2 stellt eine Liste von CGTase-Aminosäurepositionen dar, die innerhalb eines Abstandes von 8 Å von dem Substrat lokalisiert sind, und daher im Zusammenhang mit dieser Erfindung in Betracht zu ziehen sind. Die Aminosäurereste werden mittels CGTase-Nummerierung identifiziert, was die Identifizierung der entsprechenden Aminosäurepositionen in jedem beliebigen CGTase-Enzym ermöglicht.

[0081] Bevorzugt umfasst das Verfahren der Erfindung eine Substitutionen, Insertion und/oder Deletion an einem oder mehreren Aminosäurerest(en), der/die in der nachfolgenden Tabelle 2 identifiziert ist/sind.

Tabelle 2

CGTase-Aminosäurereste mit weniger als 8 Å von dem Substrat

Positionen mittels CGTase-Nummerierung identifiziert

19		142		192	85	301		476	634
21		143		193		304		596	140 635
46		144	60	194		326		597	636
47		145		195		327	115	598	649
75	35	146		196		328		599	650
78		147		197	90	329		600	651
82		148		198		370		601	145 652
87		149	65	199		371		602	653
88		150		227		372	120	603	655
89	40	151		228		374		604	656
90		154		229	95	375		605	660
94		167		230		410		607	150 661
95		168	70	231		411		608	662
96		176		232		412	125	609	663
97	45	177		233		413		615	664
98		178		257	100	414		616	665
99		179		258		415		617	155 666
100		180	75	259		416		618	667
101		181		260		418	130	624	668
102	50	182		261		420		625	685
135		183		262	105	443		626	686
136		184		264		444		627	
137		185	80	266		445		628	
138		186		268		446	135	629	
139	55	187		281		447		631	
140		188		283	110	448		632	
141		189		287		449		633	

[0082] Durch Molecular Modelling der CGTase, die von Bacillus circulans Stamm 251 erhalten wurde, sind die in den nachfolgenden Tabellen 3 bis 5 dargestellten Aminosäurepositionen als Positionen identifiziert worden, die in der Nähe des Substrats liegen, d.h. in einem Abstand von 8 Å, 5 Å bzw. 3 Å.

[0083] In einer stärker bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren der Erfindung eine Substitution, Insertion und/oder Deletion an einem oder mehreren Aminosäurerest(en), der/die in den nachfolgenden Tabellen 3 bis 5 identifiziert ist/sind.

Tabelle 3

CGTase-Aminosäurereste mit weniger als 8 Å von dem Substrat

Positionen in B. circulans Stamm 251 identifiziert (CGTase-Nummerierung)

Gln-19	Ser-142	Gly-189	Phe-283	Leu-447	Val-629
Phe-21	Pro-143	Lys-192	Gln-287	Val-448	Tyr-631
Arg-47	Ala-144	Asn-193	Tyr-301	Thr-449	Gln-632
Trp-75	Ser-145	Leu-194	Lys-304	Ala-476	Tyr-633
Gln-78	Ser-146	Phe-195	Asn-326	Ala-596	Pro-634
Asn-82	Asp-147	Asp-196	His-327	Thr-597	Asn-635
Ile-87	Gln-148	Leu-197	Asp-328	Thr-598	Trp-636
Asn-88	Pro-149	Ala-198	Met-329	Ala-599	Glu-649
Tyr-89	Ser-150	Asp-199	Thr-370	Leu-600	Phe-650
Ser-90	Phe-151	Arg-227	Asp-371	Gly-601	Lys-651
Asn-94	Asn-154	Met-228	Pro-372	Gln-602	Phe-652
Thr-95	Tyr-167	Asp-229	Asn-374	Asn-603	Lys-655
Ala-96	Thr-168	Ala-230	Arg-375	Val-604	Gln-656
Tyr-97	His-176	Val-231	Gln-410	Tyr-605	Val-660
His-98	His-177	Lys-232	Glu-411	Thr-607	Thr-661
Gly-99	Asn-178	His-233	Arg-412	Gly-608	Trp-662
Tyr-100	Gly-179	Glu-257	Trp-413	Ser-609	Glu-663
Trp-101	Gly-180	Trp-258	Ile-414	Asn-615	Gly-664
Ala-102	Thr-181	Phe-259	Asn-415	Trp-616	Gly-665
Asp-135	Asp-182	Leu-260	Asn-416	Asp-617	Ser-666
Phe-136	Phe-183	Gly-261	Val-418	Pro-618	Asn-667
Ala-137	Ser-184	Val-262	Ile-420	Pro-624	His-668
Pro-138	Thr-185	Glu-264	Ser-443	Met-625	Gln-685
Asn-139	Thr-186	Ser-266	Ile-444	Tyr-626	Pro-686
His-140	Glu-187	Glu-268	Ser-445	Asn-627	
Thr-141	Asn-188	Leu-281	Gly-446	Gln-628	

Tabelle 4

CGTase-Aminosäurereste mit weniger als 5 Å von dem Substrat

Positionen in B. circulans Stamm 251 identifiziert (CGTase-Nummerierung)

Tyr-89	Pro-149	Asn-193	Leu-260	Asn-415	Tyr-626
His-98	Ser-150	Leu-194	Gly-261	Gly-446	Asn-627
Tyr-100	Tyr-167	Phe-195	Glu-264	Leu-447	Gln-628
Trp-101	Gly-179	Asp-196	Tyr-301	Val-448	Tyr-633
Ala-137	Gly-180	Leu-197	His-327	Thr-598	Trp-636
His-140	Thr-181	Arg-227	Asp-328	Ala-599	Glu-649
Pro-143	Asp-182	Asp-229	Asp-371	Leu-600	Lys-651
Ala-144	Phe-183	Ala-230	Arg-375	Gly-601	Trp-662
Ser-145	Ser-184	Lys-232	Glu-411	Gln-602	Glu-663
Ser-146	Thr-185	His-233	Arg-412	Asn-603	Asn-667
Asp-147	Glu-187	Glu-257	Trp-413	Trp-616	
Gln-148	Asn-188	Phe-259	Ile-414	Met-625	

Tabelle 5

CGTase-Aminosäurereste mit weniger als 3 Å von dem Substrat

Positionen in B. circulans Stamm 251 identifiziert (CGTase-Nummerierung)

Tyr-89	Asp-147	Asn-193	Phe-259	Thr-598	Gln-628
His-98	Gln-148	Phe-195	His-327	Ala-599	Tyr-633
Tyr-100	Gly-180	Asp-196	Asp-328	Leu-600	Trp-636
Trp-101	Asp-182	Asp-229	Asp-371	Gly-601	Lys-651
His-140	Phe-183	Lys-232	Glu-411	Gln-602	Asn-667
Ser-145	Ser-184	His-233	Ile-414	Asn-603	
Ser-146	Thr-185	Glu-257	Gly-446	Asn-627	

[0084] Auf eine ähnliche Weise hat ein Molecular Modelling der CGTase, die von dem Stamm Thermoanaerobacter sp. ATCC 53627 erhalten wurde, die in den nachfolgenden Tabellen 6 bis 8 dargestellten Aminosäurepositionen als Positionen ergeben, die in der Nähe des Substrats liegen, d.h. in einem Abstand von 8 Å, 5 Å bzw. 3 Å.

[0085] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren der Erfindung eine Substitution, Insertion und/oder Deletion an einem oder mehreren Aminosäurerest(en), der/die in den nachfolgenden Tabellen 6 bis 8 identifiziert ist/sind.

Tabelle 6

CGTase-Aminosäurereste mit weniger als 8 Å von dem Substrat

Positionen in Thermoanaerobacter sp. identifiziert (CGTase-Nummerierung)

Gln-19	His-140	Tyr-186	Glu-264	Tyr-443	Met-625
Val-21	Thr-141	Glu-187	Asp-266	Ile-444	Phe-626
Leu-46	Ser-142	Asp-188	Asn-268	Thr-445	Asn-627
Lys-47	Pro-143	Gly-189	Leu-281	Gly-446	Gln-628
Trp-75	Ala-144	Arg-192	Phe-283	Leu-447	Gln-632
Gln-78	Ser-145	Asn-193	Gln-287	Tyr-448	Tyr-633
Asn-82	Glu-146	Leu-194	Tyr-301	Ser-476	Pro-634
Leu-87	Thr-147	Phe-195	Asn-326	Ala-596	Thr-635
Pro-88	Asp-148	Asp-196	His-327	Thr-597	Trp-636
Asp-89	Pro-149	Leu-197	Asp-328	Thr-598	Glu-649
Phe-91a	Thr-150	Ala-198	Met-329	Val-599	Phe-650
Ser-94	Tyr-151	Asp-199	Gly-370	Trp-600	Lys-651
Thr-95	Asn-154	Arg-227	Asp-371	Gly-601	Phe-652
Ser-96	Tyr-167	Met-228	Pro-372	Glu-602	Ile-653
Tyr-97	Thr-168	Asp-229	Asn-374	Asn-603	Lys-655
His-98	His-176	Ala-230	Arg-375	Val-604	Asn-656
Gly-99	His-177	Val-231	Lys-410	Tyr-605	Thr-661
Tyr-100	Tyr-178	Lys-232	Gln-411	Thr-607	Trp-662
Trp-101	Gly-179	His-233	Arg-412	Gly-608	Glu-663
Ala-102	Gly-180	Glu-257	Trp-413	Asn-609	Gly-664
Asp-135	Thr-181	Trp-258	Ile-414	Asn-615	Gly-665
Phe-136	Asn-182	Tyr-259	Asn-415	Trp-616	Tyr-666
Ala-137	Phe-183	Leu-260	Asn-416	Asp-617	Asn-667
Pro-138	Ser-184	Gly-261	Val-418	Thr-618	His-668
Asn-139	Ser-185	Thr-262	Ile-420	Pro-624	Gln-685

Tabelle 7

CGTase-Aminosäurereste mit weniger als 5 Å von dem Substrat

Positionen in Thermoanaerobacter sp. identifiziert (CGTase-Nummerierung)

Lys-47	Asp-148	Asn-193	Gly-261	Thr-445	Gln-628
Ser-94	Pro-149	Leu-194	Glu-264	Gly-446	Tyr-633
Tyr-97	Thr-150	Phe-195	Asp-266	Leu-447	Trp-636
His-98	Tyr-151	Asp-196	Tyr-301	Tyr-448	Glu-649
Tyr-100	Tyr-167	Leu-197	His-327	Thr-598	Lys-651
Trp-101	Gly-179	Arg-227	Asp-328	Val-599	Trp-662
Ala-137	Gly-180	Asp-229	Asp-371	Trp-600	Glu-663
His-140	Thr-181	Ala-230	Arg-375	Gly-601	Gly-665
Pro-143	Asn-182	Lys-232	Gln-411	Glu-602	Asn-667
Ala-144	Phe-183	His-233	Arg-412	Asn-603	
Ser-145	Ser-184	Glu-257	Trp-413	Trp-616	
Glu-146	Ser-185	Tyr-259	Ile-414	Met-625	
Thr-147	Tyr-186	Leu-260	Asn-415	Asn-627	

Tabelle 8

CGTase-Aminosäurereste mit weniger als 3 Å von dem Substrat

Positionen in Thermoanaerobacter sp. identifiziert (CGTase-Nummerierung)

His-98	Thr-147	Phe-195	Asp-328	Thr-598	Asn-627
Tyr-100	Gly-180	Asp-229	Asp-371	Val-599	Tyr-633
Trp-101	Phe-183	His-233	Arg-375	Trp-600	Lys-651
His-140	Ser-184	Glu-257	Gln-411	Gly-601	Asn-667
Ser-145	Ser-185	Tyr-259	Ile-414	Glu-602	
Glu-146	Asn-193	His-327	Gly-446	Asn-603	

[0086] Die Substratbindung und Produktselektivität einer CGTase-Variante der Erfindung kann, wie oben beschrieben, durch Entfernen von vorhandenen und/oder Einfügen von potentiellen intermolekularen Wechselwirkungen zwischen der CGTase-Variante und ihrem Substrat gestaltet werden.

[0087] Beispiele von intermolekularen Wechselwirkungen schließen ein, sind jedoch nicht hierauf beschränkt, Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen, Bildung von Ionenbindungen, polare Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen und aromatische Wechselwirkungen.

[0088] Aminosäurereste, die Seitenketten mit Potential zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen besitzen (d.h. die Fähigkeit zur Bildung von H-Brückenbindungen („H-bonding capability"), sind im Allgemeinen die folgenden:
Ser (S), Thr (T), Asn (N), Gln (Q), His (H), Asp (D), Tyr (Y), Glu (E), Lys (K), Arg (R), Trp (W) und Cys (C).

[0089] Dementsprechend besitzen die folgenden Aminosäuren im Allgemeinen keine potentielle Befähigung, Seitenketten-Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden, (d.h. keine Fähigkeit zur Bildung von H-Brückenbindun-

gen):
Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Phe (F), Gly (G), Met (M) und Pro (P).

[0090] Aminosäurereste, die Seitenketten mit Potential zur Bildung von Ionenbindungen besitzen, sind im Allgemeinen die folgenden:
Asp (D), Glu (E), Lys (K), Arg (R) und His (H).

[0091] Aminosäurereste, die Seitenketten mit Potential zur Bildung von polaren Wechselwirkungen („polar interaction potentials") besitzen, sind im Allgemeinen die folgenden:
Asp (D), Asn (N), Glu (E), Gln (Q), Lys (K), Arg (R), His (H), Tyr (Y), Trp (W) und Cys (C).

[0092] Aminosäurereste, die Seitenketten mit Potential zur Bildung von hydrophoben Wechselwirkungsen („hydrophobic interaction potentials") besitzen, sind im Allgemeinen die folgenden:
Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Phe (F), Met (M), Pro (P) und ein Teil der Arg(R)-, Glu (E)- und Gln (Q)-Seitenketten.

[0093] Aminosäurereste, die Seitenketten mit Potential zur Bildung von aromatischen Wechselwirkungsen („aromatic interaction potentials") besitzen, sind im Allgemeinen die folgenden:
His (H), Phe (F), Tyr (Y) und Trp (W).

CGTase-Varianten

[0094] In ihrem zweiten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung neue CGTase-Varianten bereit, die eine Aminosäuresequenz besitzen, die in der Natur nicht vorkommt. Funktionell wird die CGTase-Variante der Erfindung als ein Derivat eines Vorläufer-CGTase-Enzyms (d.h. des nativen, Eltern- oder Wildtyp-Enzyms) angesehen.

[0095] Bei einer CGTase-Variante der Erfindung ist die Substratbindung und/oder Produktselektivität im Vergleich zu dem Vorläufer-CGTase-Enzym durch Ersetzen, Insertion und/oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäurerest(en), welche(r) eine Position in der Nähe des Substrat einnimmt/einnehmen, modifiziert worden.

[0096] Die CGTase-Variante der Erfindung kann von jedem beliebigen in der Natur vorkommenden CGTase-Enzym abgeleitet sein. Bevorzugt ist die CGTase-Variante der Erfindung jedoch von einem mikrobiellen Enzym, bevorzugt einem bakteriellen Enzym abgeleitet, und bevorzugt ist die CGTase-Variante von einem Stamm von Bacillus, einem Stamm von Brevibacterium, einem Stamm von Clostridium, einem Stamm von Corynebacterium, einem Stamm von Klebsiella, einem Stamm von Micrococcus, einem Stamm von Thermoanaerobium, einem Stamm von Thermoanaerobacter, einem Stamm von Thermoanaerobacterium oder einem Stamm von Thermoactinomyces abgeleitet.

[0097] In stärker bevorzugten Ausführungsformen ist die CGTase-Variante der Erfindung von einem Stamm von Bacillus autolyticus, einem Stamm von Bacillus cereus, einem Stamm von Bacillus circulans, einem Stamm von Bacillus circulans var. alkalophilus, einem Stamm von Bacillus coagulans, einem Stamm von Bacillus firmus, einem Stamm von Bacillus halophilus, einem Stamm von Bacillus macerans, einem Stamm von Bacillus megaterium, einem Stamm von Bacillus ohbensis, einem Stamm von Bacillus stearothermophilus, einem Stamm von Bacillus subtilis, einem Stamm von Klebsiella pneumoniae, einem Stamm von Thermoanaerobacter ethanolicus, einem Stamm von Thermoanaerobacter finnii, einem Stamm von Clostridium thermoamylolyticum, einem Stamm von Clostridium thermosaccharolyticum oder einem Stamm von Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes abgeleitet.

[0098] In am stärksten bevorzugten Ausführungsformen ist die CGTase-Variante der Erfindung von dem Stamm Bacillus sp. Stamm 1011, dem Stamm Bacillus sp. Stamm 38-2, dem Stamm Bacillus sp. Stamm 17-1, dem Stamm Bacillus sp. 1-1, dem Stamm Bacillus sp. Stamm B1018, dem Stamm Bacillus circulans Stamm 8, dem Stamm Bacillus circulans Stamm 251 oder dem Stamm Thermoanaerobacter sp. ATCC 53627 oder einer Mutante oder einer Variante davon abgeleitet.

[0099] Im Zusammenhang mit dieser Erfindung zeigt ein Aminosäurerest, der eine Position in Nähe des Substrats einnimmt, einen Aminosäurerest an, der innerhalb des Enzyms derart lokalisiert ist, dass er innerhalb eines potentiellen intermolekularen (d.h. Enzym-Substrat) interaktiven Abstandes von einer Glucoseeinheit des Substrats (d.h. eines Polysaccharids) liegt.

[0100] Beispiele von potentiellen intermolekularen Wechselwirkungen schließen ein, sind jedoch nicht hierauf beschränkt, Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen, Bildung von Ionenbindungen, polare Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen und aromatische Wechselwirkungen.

[0101] In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung zeigt eine Aminosäurenposition in der Nähe des Substrats einen Abstand von weniger als 8 Å (Angström), bevorzugt weniger als 5 Å, stärker bevorzugt weniger als 3 Å von dem Substrat an.

[0102] Darüber hinaus besitzen CGTasen Substratbindungsregionen, die in der A-Domäne, in der B-Domäne, in der C-Domäne und in der E-Domäne lokalisiert sind. Infolgedessen stellt die Erfindung in einer bevorzugten Ausführungsform eine CGTase-Variante bereit, bei welcher Variante eine Substitution, eine Insertion und/oder eine Deletion an einem oder mehreren der Aminosäurereste, der/die in einer oder mehreren der A-, B-, C- und E-Domänen lokalisiert ist sind, eingeführt worden ist/sind.

[0103] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stellt die Erfindung eine CGTase-Variante bereit, bei welcher Variante eine Substitution, eine Insertion und/oder eine Deletion an einer oder mehreren der Aminosäurepositionen, die den in Tabelle 2 angegebenen Positionen entspricht/entsprechen, eingeführt worden ist/sind.

[0104] Jedoch wird, wenn Substitutionen an den Positionen 195 und 198 (CGTase-Nummerierung) vorgenommen worden sind, die CGTase nicht als eine CGTase-Variante der Erfindung angesehen, sofern nicht eine zusätzliche Substitution, Insertion und/oder Deletion an einem oder mehreren Aminosäurerest(en) eingeführt worden ist/sind. Darüber hinaus wird eine CGTase, die eine beliebige der folgenden spezifischen Mutationen: H140R, H140N, F183L, H233R, H233N, W258V, F259L, F259I, F259Y, F283L, H327R, H327N, T598F und/oder W636F umfasst, nicht als eine CGTase-Variante der Erfindung angesehen, sofern nicht eine zusätzliche Substitution, Insertion und/oder Deletion von Aminosäurerest(en) an einer oder mehreren hier nicht angegebener/angegebenen Position(en) eingeführt worden ist/sind. Schließlich wird eine CGTase, welche eine beliebige der folgenden spezifischen Mutationen: F195Y/F259Y, W258/F259I, T598F/W636F und F183L/F259L umfasst, nicht als eine CGTase-Variante der Erfindung angesehen, sofern nicht eine zusätzliche Substitution, Insertion und/oder Deletion von Aminosäurerest(en) an einer oder mehreren Positionen eingeführt worden ist/sind. Demnach sind solche CGTase-Varianten entsprechend der vorliegenden Erfindung nicht beansprucht (disclaimed).

[0105] In einer stärker bevorzugten Ausführungsform ist die CGTase-Variante der Erfindung eine CGTase-Variante, die von einem Enzym abgeleitet ist, das von einem Stamm von Bacillus erhältlich ist, welches Enzym durch Substitution, Insertion und/oder Deletion an einer oder mehreren Aminosäurepositionen, die den in den Tabellen 3 bis 5 angegebenen Positionen entsprechen, modifiziert worden ist. Bevorzugt ist die CGTase-Variante von einem Stamm von Bacillus autolyticus, einem Stamm von Bacillus cereus, einem Stamm von Bacillus circulans, einem Stamm von Bacillus circulans var. alkalophilus, einem Stamm von Bacillus coagulans, einem Stamm von Bacillus firmus, einem Stamm von Bacillus halophilus, einem Stamm von Bacillus macerans, einem Stamm von Bacillus megaterium, einem Stamm von Bacillus ohbensis, einem Stamm von Bacillus stearothermophilus oder einem Stamm von Bacillus subtilis abgeleitet. Am stärksten bevorzugt ist die CGTase-Variante von dem Stamm Bacillus sp. Stamm 1011, dem Stamm Bacillus sp. Stamm 38-2, dem Stamm Bacillus sp. Stamm 17-1, dem Stamm Bacillus sp. 1-1, dem Stamm Bacillus sp. Stamm B1018, dem Stamm Bacillus circulans Stamm 8 oder dem Stamm Bacillus circulans Stamm 251 oder einer Mutante oder einer Variante davon abgeleitet.

[0106] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die CGTase-Variante der Erfindung eine CGTase-Variante, die von einem Enzym abgeleitet ist, das von einem Stamm von Thermoanaerobacter erhältlich ist, welches Enzym durch Substitution, Insertion und/oder Deletion an einer oder mehreren Aminosäurepositionen, die den in den Tabellen 6 bis 8 angegebenen Positionen entsprechen, modifiziert worden ist. Bevorzugt ist die CGTase-Variante von einem Stamm von Thermoanaerobacter sp. ATCC 53627 oder einer Mutante oder einer Variante davon abgeleitet.

[0107] In einer CGTase-Variante der Erfindung, sind die intermolekularen Enzym-Substrag-Wechselwirkungen im Vergleich zu dem Vorläufer-Enzym modifiziert worden. Beispiele von potentiellen Wechselwirkungen schließen ein, sind jedoch nicht hierauf beschränkt, Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen, Bildung von Ionenbindungen, polare Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen und aromatische Wechselwirkungen. Solche Modifikationen können durch Substitution, Insertion und/oder Deletion an einer oder mehreren der oben beschriebenen Positionen gemäß der folgenden Anleitung durchgeführt werden.

[0108] Aminosäurereste, die Seitenketten mit Potential zur Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen besitzen (d.h., die Fähigkeit zur Bildung von H-Brückenbindungen besitzen), sind im Allgemeinen die folgenden:
Ser (S), Thr (T), Asn (N), Gln (Q), His (H), Asp (D), Tyr (Y), Glu (E), Lys (K), Arg (R), Trp (W) und Cys (C).

[0109] Dementsprechend besitzen die folgenden Aminosäuren die im Allgemeinen keine potentielle Befähigung, Seitenketten-Wasserstoffbrückenbindungen zu bilden (d.h. keine Fähigkeit zur Bildung von H-Brückenbindungen):
Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Phe (F), Gly (G), Met (M) und Pro (P).

[0110] Aminosäurereste, die Seitenketten mit Potential zur Bildung von Ionenbindungen besitzen, sind im Allgemeinen die folgenden:
Asp (D), Glu (E), Lys (K), Arg (R) und His (H).

[0111] Aminosäurereste, die Seitenketten mit Potential zur Bildung von polaren Wechselwirkungen besitzen, sind im Allgemeinen die folgenden:
Asp (D), Asn (N), Glu (E), Gln (Q), Lys (K), Arg (R), His (H), Tyr (Y), Trp (W) und Cys (C).

[0112] Aminosäurereste, die Seitenketten mit Potential zur Bildung von hydrophoben Wechselwirkungen besitzen, sind im Allgemeinen die folgenden:
Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Phe (F), Met (M), Pro (P) und ein Teil der Arg (R)-, Glu (E)- und Gln (Q)-Seitenketten.

[0113] Aminosäurereste, die Seitenketten mit Potential zur Bildung von aromatischen Wechselwirkungen besitzen, sind im Allgemein die folgenden:
His (H), Phe (F), Tyr (Y) und Trp (W).

[0114] Durch das Verfahren der Erfindung werden Varianten erhalten, welche eine geänderte Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen oder anderen Wechselwirkungen in den Subsites der aktiven Spalte oder in der Furche, welche zu dieser Spalte führt, oder an den Maltose-Bindungsstellen, besitzen. Durch Ändern der Subsites in der Bindungsspalte ist es möglich, die Anzahl der Zucker, welche in der Lage sind, zu binden, zu manipulieren, und damit die Anteile an α-, β-, γ-Cyclodextrinen usw., die von dem Enzym hergestellt werden, zu ändern.

[0115] Insbesondere wenn die Konstruktion von α-Cyclodextrin-bildenden CGTase-Varianten in Erwägung gezogen wird, sollten Wechselwirkungen an oder vor den Subsites C bis I des Substrats (vgl. **Fig. 1**) erhöht werden, und Wechselwirkungen an den Subsites I und höher sollten herabgesetzt werden. Alternativ kann sterische Behinderung angewendet werden, um ein Binden an den Subsites I und höher zu verhindern. Ausgehend von einer CGTase von Bacillus werden zum Beispiel folgende Mutationen, einzeln oder in Kombinationen, in Erwägung gezogen.

[0116] Eine geringere Kopplungs- und Disporportionierungsaktivität wird erzielt, indem Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und dem Donor/Akzeptor, d.h. zwischen der CGTase und den Subsites A, B, C und D, entfernt werden. Mutationen, die Wasserstoffbrückenbindungen entfernen, sind z.B.:
H233Q, D135L, R47L oder R47Q.

[0117] Mutationen, welche die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen bezüglich („relative to") des Substrats erhöhen, sind z.B.:
H233Q (bezüglich Subsite B des Substrats), L197D oder L197E (Subsite D), N94Q oder N94K oder N94R oder N94W oder N94F (Subsite E), D371N oder D371G (Subsite E + F), Y89D (Subsite E), A144K oder A144R oder A144D (Subsite H), N193D oder N193E (Subsite H), Y167F (um den Rest an Position 193 für die Bildung einer H-Brückenbindung zur Subsite H freizugeben) und T185R oder T185E oder T185D (an der Maltose-Bindungsstelle 2, vgl. nachfolgend).

[0118] Mutationen, welche die Konformation der Substratbindungsspalte ändern, und damit neue Enzym-Substrat-Wechselwirkungen herstellen, sind z.B.:
N88P und P143G.

[0119] Mutationen, welche die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen bezüglich des Substrats herabsetzen, sind z.B.:
S145E oder S145A und S146P oder S146Q oder S146G (bezüglich Subsite I des Substrats).

[0120] Eine Mutation, welche die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen bezüglich Subsite H erhöht, ist z.B. A144R.

[0121] Eine Mutation, welche die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen bezüglich des Substrats erhöht, ist z.B. N88K.

[0122] Mutationen, welche zu einer sterischen Behinderung führen, sind z.B.:
S145 W oder S145Y oder S145F und S146W oder S146I oder S146R oder S146P (verhindern die Bindung an Subsite I des Substrats).

[0123] Mutationen, welche die elektrostatischen Wechselwirkungen (Stapelung, „stacking") erhöhen, sind z.B.:
L600W oder L600F oder L600Y (der Maltose-Bindungsstelle 2, vgl. nachfolgend).

[0124] In einer bevorzugten Ausführungsform kann eine α-Cyclodextrin-bildende CGTase-Variante der Erfindung eine Variante sein, welche an den Positionen 87 bis 94 die Aminosäureteilsequenz IKYSGVNN umfasst und/oder an den Positionen 143 bis 151 die Aminosäureteilsequenz GRAGTNPGF umfasst oder an den Positionen 143 bis 145 die Aminosäureteilsequenz GRW umfasst.

[0125] Um ein Enzym mit verbesserter Produktselektivität in Richtung auf β-Cyclodextrine herzustellen, ist es erforderlich, die Herstellung von sowohl kleineren als auch größeren cyclischen Produkten zu umgehen. Ein Grundprinzip könnte sein, die Herstellung von α-Cyclodextrin zu verhindern, indem Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Enzym und dem Substrat entfernt werden, was es dem Substrat ermöglicht, sich schneller in das aktive Zentrum zu bewegen. Umgekehrt verlangsamt die Einführung von Wasserstoffbrückenbindungen an relevanten Positionen die Bewegung des Substrats, was zu der Herstellung von größeren Cyclodextrinen führt. Dieser Ansatz, gekoppelt mit der Substitution von Aminosäureresten, die eine sterische Behinderung für kleinere Aminosäurereste hervorrufen, an Positionen, die gestaltet sind, um die Bewegung des Substrats zu blockieren, verhindern die Bildung von Cyclodextrinen, die größer als β-Cyclodextrin sind. Daher werden, wenn die Konstruktion von β-Cyclodextrin-bildenden CGTase-Varianten in Erwägung gezogen wird, die folgenden Mutationen, einzeln oder in Kombinationen, in Erwägung gezogen, ebenfalls ausgehend von einer CGTase von Bacillus.

[0126] Mutationen, welche die Konformation der Substratbindungsspalte in der Nähe des aktiven Zentrums ändern, und damit Raum für größere Cyclodextrine (β- und γ-Cyclodextrine) erzeugen, sind z.B.:
N88P, Y89* (eine Deletion), 91aY (eine Insertion), V92* oder N92* und N94*.

[0127] Eine Mutation, welche die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen bezüglich des Substrats erhöht, ist z.B. S146E.

[0128] Mutationen, welche die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen bezüglich des Substrats herabsetzen, sind z.B.
S145L und Q148N.

[0129] Mutationen, welche Wasserstoffbrückenbindungen von den Subsites D, E, F, H, I und J des Substrats entfernen, sind z.B.:
R375G, D371G, D371N, Y89G, N193G, S145A, Q148A und *145aI.

[0130] Eine Mutation, welche eine sterische Behinderung zwischen den Subsites I und J des Substrats einführt, gestaltet, um das Produktverhältnis in Richtung auf die Herstellung von kleineren Cyclodextrinen zu verlagern, ist z.B D147W.

[0131] In einer bevorzugten Ausführungsform kann eine β-Cyclodextrin-bildende CGTase-Variante der Erfindung eine Variante sein, welche an den Positionen 87 bis 94 die Aminosäureteilsequenz HP*SGY** umfasst und/oder an den Positionen 143 bis 151 die Aminosäureteilsequenz PALETNPNF umfasst oder an den Positionen 143 bis 151 die Aminosäureteilsequenz PAAETWPAF umfasst.

[0132] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann eine β-Cyclodextrin-bildende CGTase-Variante der Erfindung eine Variante sein, welche an den Positionen 87 bis 94 die Aminosäureteilsequenz HP*SGY** umfasst und/oder an den Positionen 143 bis 151 die Aminosäureteilsequenz PALETNPNF umfasst oder an den Positionen 143 bis 151 die Aminosäureteilsequenz PAAETWPAF umfasst, und welche Variante an der Po-

sition 195 einen Leucinrest (X195L) aufweist.

[0133] In einer dritten bevorzugten Ausführungsform kann eine CGTase-Variante der Erfindung, die in der Lage ist, lineare Oligosaccharide zu bilden, eine Variante sein, welche an den Positionen 87 bis 94 die Aminosäureteilsequenz HP*SGY** umfasst und/oder an den Positionen 143 bis 151 die Aminosäureteilsequenz PALETNPNF umfasst oder an den Positionen 143 bis 151 die Aminosäureteilsequenz PAAETWPAF umfasst, und welche Variante an der Position 195 einen Glycinrest (X195G) aufweist.

[0134] Auf ähnliche Weise, wenn die Konstruktion von γ-Cyclodextrin-bildenden CGTase-Varianten in Erwägung gezogen wird, werden die folgenden Mutationen, einzeln oder in Kombinationen, in Erwägung gezogen, wiederum ausgehend von einer CGTase von Bacillus.

[0135] Mutationen, welche die Konformation der Substratbindungsspalte in der Nähe des aktiven Zentrums ändern und damit Raum für größere Cyclodextrine (β- und γ-Cyclodextrine) erzeugen, sind z.B.:
N88P, Y89* (eine Deletion), 91aY (eine Insertion), V92* oder N92* und N94*.

[0136] Eine Mutation, welche die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen bezüglich des Substrats erhöht, ist z.B. S146E.

[0137] Mutationen, welche die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen bezüglich des Substrats herabsetzen, sind z.B.
S145L und Q148N.

[0138] Mutationen, welche Wasserstoffbrückenbindungen von den Subsites D, E, F und H des Substrats entfernen, sind z.B.:
N193G, R375G, D371G und D371N.

[0139] Eine Mutation, welche Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Stapelung („stacking") von den Subsites D, E, F und H des Substrats entfernt, ist z.B. Y89G.

[0140] Mutationen, welche die Bindungseigenschaften an den Subsites I und J des Substrats verändern, sind z.B.:
X145aI oder *145aI (via Insertion), S145A und Q148E, insbesondere
S145A/X145aI oder A145A/*145aI und X145aI/Q148E oder *145aI/Q148E.

[0141] Mutationen, welche die Kopplungsaktivität an den Subsites A, D und E reduzieren, sind z.B.:
R375G, D371G, K232Q und E264Q.

[0142] Mutationen, welche die Kopplungsaktivität durch Verändern der spezifischen Bindung von Cyclodextrinen reduzieren, sind z.B. R47Q.

[0143] Insbesondere wenn CGTase-Varianten in Erwägung gezogen werden, die von einem Stamm von Thermoanaerobacter abgeleitet sind, sind Mutationen, welche zu einer geringeren Hydrolyse führen, die durch Entfernen von Wassermolekülen in der Nähe des aktiven Zentrums erhalten wird, z.B.:
V21F oder V21Y.

[0144] Eine geringere Kopplungs- und Disproportionierungsaktivität wird erzielt, indem Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und dem Donor/Akzeptor, d.h. zwischen der CGTase und den Subsites A, B, C und D, entfernt werden. Mutationen, welche Wasserstoffbrückenbindungen entfernen, sind z.B.:
Y259F, H233Q und D135L.

[0145] In einer bevorzugten Ausführungsform kann eine γ-Cyclodextrin-bildende CGTase-Variante der Erfindung eine Variante sein, welche an den Positionen 87 bis 94 die Aminosäureteilsequenz HP*SGY** umfasst und/oder an den Positionen 143 bis 151 die Aminosäureteilsequenz PALETNPNF umfasst oder an den Positionen 143 bis 151 die Aminosäureteilsequenz PAAEADPNF umfasst.

[0146] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform kann eine γ-Cyclodextrin-bildende CGTase-Variante der Erfindung eine Variante sein, welche an den Positionen 87 bis 94 die Aminosäureteilsequenz HP*SGY** umfasst und/oder an den Positionen 143 bis 151 die Aminosäureteilsequenz PALETNPNF umfasst oder an den Positionen 143 bis 151 die Aminosäureteilsequenz PAAEADPNF umfasst, und welche Variante an der Po-

sition 195 einen Leucinrest (X195W) aufweist.

[0147] In einer dritten bevorzugten Ausführungsform können die Varianten der Erfindung, um lineare Oligosaccharide einer gewünschten Länge zu erhalten, mit einer Substitution an dem zentralen Aminosäurerest, der die Cyclisierungsachse bildet, welcher der Position 195, CGTase-Nummerierung, entspricht, kombiniert werden. An dieser Position sind Tyrosin und Phenylalanin in Wildtyp-CGTasen vorherrschend (vgl. Tabelle 1). Durch Ändern dieses Restes werden die Cyclisierungseigenschaften beeinflusst und eine Cyclisierung kann unterbunden werden. In einer bevorzugten Ausführungsform wird Glycin an dieser Position eingeführt (X195G).

[0148] In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist eine CGTase-Variante der Erfindung ein Enzym, welches durch Substitution, Insertion und/oder Deletion an einer oder mehreren der Aminosäurepositionen, die den in der nachfolgenden Tabelle 9 angegebenen Positionen entsprechen, modifiziert worden ist. Wie in dieser Tabelle angezeigt wird, führt die Einführung von einer oder mehreren dieser Substitutionen/Insertionen/Deletionen zu CGTase-Varianten mit einer erhöhten Produktselektivität in Bezug auf α-, β- bzw. γ-Cyclodextrine.

Tabelle 9

CGTase-Varianten mit erhöhter Produktselektivität

Positionen mittels CGTase-Nummerierung identifiziert

Position	α-Cyclodextrin	β-Cyclodextrin	γ-Cyclodextrin
21	F,Y	F,Y	F,Y
47	Q,L	A,Q,H,R,L	A,Q,H,R,L
87	I,H	I,H	I,H
88	P,N,K,H	P,N,K,H	P,N,K,H
89	D,G,A,Y,E,*	D,G,A,E,K,R,Y,P,*	D,G,A,Y,P,*
90	S	G,A,S	G,A,S
91	A,V,D,G,T	A,V,G,S,T	A,V,G,S
91a	A,V,G,Y,*	A,V,G,Y,F,*	A,V,G,Y,F,*
92	G,V,*	G,V,*	G,V,*
93	G,N,*	G,N,H,T,*	G,N,H,T,*
94	Q,K,R,W,F,N,S,* ,N,S,*	Q,K,R,W,F,N,S,*	Q,K,R,W,F
98	H	G,A	G,A
101	W	G,A	G,A,F,Y
135	L,D	L,D	L,D
140	A,R,N	A,R,N	A,R,N

[Fortsetzung Table 9 auf der nächsten Seite]

143	G,S,A	P	P
144	K,R,D,A,N,E,Q	A	A
145	A,E,W,P,G,F,Y,P,R,K	A,E,L,W	A,E,L,W
145a	P,A,F,Q,S,W,I,R,*	P,A,I,Q,S	I,A,Q,P,S
146	P,A,F,Q,S,W,I,R,G,E,*	P,A,I,Q,S,E,K,D,N,R,F,W,*	I,A,Q,P,S,E
147	A,L,I,F,T,*	A,L,I,F,W,G,Y,R,D,T,*	S,T,A,D
147a	*	*	D,N,E,Q,T
148	G,A,N	G,A,N,Q	D,E,R,K,Y,F,N,Q
149	P	W,P	L,I,F,W,P
150	A,G	A,S	A,S,N
167	P,F,Y	A,F,Y	A,F,P,Y
168	S,T	S,T	S,T
178	N,Y	N,Y	N,Y
179	S,N,D	G,S,N,D	G,S,N,D
180	S,N,D	G,S,N,D	G,S,N,D
183	F,W,Y,A	F,W,Y,A	F,W,Y,A
185	P,H,R,E,D	P,H,R,E,D	P,H,R,E,D
192	K,R	K,R	K,R
193	G,D,E,N,Q	G,A,N	G,A,N
195	Y,F	L,I,W,Y,F	L,I,W,F,Y
196	A,D,N,S	A,D,N,S	A,D,N,S
197	D,E,L	D,E,L	D,E,L
232	K,Q,L	K,Q,L	K,Q,L
233	H,Q,N,I	H,Q,N,I	H,Q,N,I
259	F,W,Y,A	F,W,Y,A	F,W,Y,A
264	Q	Q	Q
326	Q,F,L	Q,F,L	Q,F,L
370	G	T,N	T,N
371	A,D,S,N,G,E,Q	A,G,N,D,S	A,G,N,V,L,I,D,S
373	D,N,Y	D,E,Y	D,E,Y
375	R,K	A,P,G,R,K	A,P,G,R,K
600	X	X	X

X = jeder beliebige natürliche Aminosäurerest

* deletierter oder nicht vorhandener Rest

[0149] Im Hinblick auf die Produktbindung und Produktinhibierung ist die E-Domäne der CGTase von Bacillus circulans Stamm 251 nun als eine Rohstärke-bindende Domäne identifiziert worden. In der Maltose-abhängigen Kristallstruktur sind drei Maltosemoleküle an jedem Enzymmolekül an Kontaktpunkten zwischen diesen Molekülen (Maltose-Bindungsstellen, MBS) gefunden worden. Zwei von diesen Maltosen sind an spezifischen Stellen an der E-Domäne (MBS1 und MBS2, nahe 616 und 662) gebunden, die dritte Stelle ist an der C-Domäne (MBS3, nahe 413) lokalisiert. Demnach sind die Bindungsstellen an der E-Domäne erforderlich für die Umwandlung von Rohstärke in Cyclodextrine. Experimente, ausgeführt wie nachfolgend (beschrieben), zeigen an, dass das Enzym über MBS1 an das Rohstärkekörnchen bindet, während MBS2 eine Stärkekette, die aus dem Körnchen herausragt, zu dem aktiven Zentrum führt.

[0150] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist eine CGTase-Variante der Erfindung ein Enzym, welches durch Substitution, Insertion und/oder Deletion an einer oder mehreren der Aminosäurepositionen, die den in der nachfolgenden Tabelle 10 angegebenen Positionen entsprechen, modifiziert worden. Solche Modifizierungen führen zu CGTase-Varianten mit reduzierter Produktinhibierung.

[0151] Zum Beispiel werden im Zusammenhang mit dieser Erfindung die folgenden Mutationen, ausgehend von einer CGTase von Bacillus, einzeln oder in Kombination, in Erwägung gezogen, um eine Produktinhibierung zu reduzieren.

[0152] Mutationen, welche eine nicht-kompetitive Produktinhibierung reduzieren, sind z.B.:
YY633A (erfolgt an MBS2, diese Mutation entfernt eine nicht-kompetitive Produktinhibierung vollständig), 599aP oder 599aR oder 599aH und L600R.

[0153] Die Reste 595 bis 605 bilden einen Loop (eine Schleife) neben MBS2. Eine Insertion vergrößert den Loop, dadurch wird die Bindung von einem Cyclodextrin an MBS2 durch sterische Behinderung verhindert, während die Rolle von MBS2 bei der (Weiter-)Führung der Substratkette beibehalten bleibt. Mutationen an der Position 600 und den angrenzenden Resten konnten die Bindung von cyclischen Produkten an MBS2 reduzieren, während die Bindung von linearen Substraten unbeeinflusst bleibt. Die Substitution von Leucin an Position 600 durch Aspartat, Alanin oder Glycin hat geringe Wirkungen auf die Produktinhibierung. Die Substitution durch Arginin beeinflusst, aufgrund seiner Größe und Ladungseigenschaft, die Bindung von Cyclodextrinen und reduziert dadurch die Produktinhibierung.

[0154] Mutationen, welche die elektrostatischen Wechselwirkungen rund um MBS1 herum herabsetzen, was zu einer herabgesetzten Produktaffinität führt, sind z.B. W616A und/oder W662A.

[0155] Mutationen, welche die elektrostatischen Wechselwirkungen rund um MBS2 herum herabsetzen, was zu einer herabgesetzten Produktaffinität führt, sind z.B. L600A oder L600S und/oder Y663A.

[0156] Eine Mutation, welche die elektrostatischen Wechselwirkungen rund um MBS3 herum herabsetzt, was zu einer herabgesetzten Produktaffinität führt, ist z.B. W413A.

[0157] Für eine kompetitive Produktinhibierung wird angenommen, dass sie durch Kopplungsreaktionen verursacht wird. Eine Reduzierung dieser Kopplungsreaktion kann durch Reduzierung der Bindung des ersten (Cyclodextrin-) und zweiten (Malto-Oligosaccharid-) Substrats erreicht werden.

[0158] Mutationen, welche die kompetitive Produktinhibierung durch Reduzieren der Cyclodextrinbindung reduzieren, sind z.B.:
R47A oder R47Q oder R47L, Y89G, D196A oder D196L, D371G oder D371N oder D371A oder D371L und R375G oder R375Q oder R375N oder R375A oder R375L.

[0159] Mutationen, welche die kompetitive Produktinhibierung durch Reduzieren der Bindung des zweiten Substrats reduzieren, sind z.B.:
K232Q oder K232N oder K2323A oder K232L, E264A oder E264N oder E264L, T186A und E268A.

Tabelle 10

CGTase-Varianten mit reduzierter Produktinhibierung

Positionen mittels CGTase-Nummerierung identifiziert

47	A, Q, L
89	G
100	A, I, L, F, Y
185	R, E, D
186	A
196	A, L, D
232	K, Q, N, A, L
264	A, N, L
268	A
339	A
371	G, N, A, L, D, S, E, Q
375	G, Q, N, A, L, R, K
382	A, L, V
384	A, L, V
413	A, V, G, W
598	A, V, G, P, T
599a	P, R, H
600	X
603	A, V, L, G, N
616	A, I, L, G, W
626	A, I, V, L, G
627	A, V, L, G,
628	A, V, L, G, Q
633	A, V, L, I, G, Y
636	I, L, A, G, W
649	A, G
651	A, G, V, K
662	A, L, I, G, W
667	A, N

X = jeder beliebige natürliche Aminosäurerest

[0160] In einer bevorzugten Ausführungsform ist die CGTase-Variante der Erfindung eine CGTase-Variante, die von einem Enzym, das von einem Stamm von Bacillus erhältlich ist, abgeleitet ist, welches Enzym durch Substitution, Insertion und/oder Deletion an einer oder mehreren der Aminosäurepositionen, die den in der, nachfolgenden Tabelle 11 angegebenen Positionen entsprechen, modifiziert worden ist. Solche Modifizierungen führen zu CGTase-Varianten mit einer, wie in der Tabelle angezeigten, erhöhten Produktselektivität.

[0161] Stärker bevorzugt ist die CGTase-Variante von einem Stamm von Bacillus autolyticus, einem Stamm von Bacillus cereus, einem Stamm von Bacillus circulans, einem Stamm von Bacillus circulars var. alkalophilus, einem Stamm von Bacillus coagulans, einem Stamm von Bacillus firmus, einem Stamm von Bacillus halophilus, einem Stamm von Bacillus macerans, einem Stamm von Bacillus megaterium, einem Stamm von Bacillus ohbensis, einem Stamm von Bacillus stearothermophilus oder einem Stamm von Bacillus subtilis abgeleitet.

[0162] Am stärksten bevorzugt ist die CGTase-Variante von dem Stamm Bacillus sp. Stamm 1011, dem Stamm Bacillus sp. Stamm 38-2, dem Stamm Bacillus sp. Stamm 17-1, dem Stamm Bacillus sp. 1-1, dem Stamm Bacillus sp. Stamm B1018, dem Stamm Bacillus circulars Stamm 8 oder dem Stamm Bacillus cirulans Stamm 251 oder einer Mutante oder einer Variante davon abgeleitet.

Tabelle 11

Von Bacillus abgeleitete CGTase-Varianten mit erhöhter Produktselektivität

Positionen mittels CGTase-Nummerierung identifiziert

Position	α-Cyclodextrin	β-Cyclodextrin	γ-Cyclodextrin
21	F,Y	F,Y	F,Y
47	Q,L	A,Q,H,R,L	A,Q,H,R,L
87	H	H	H
88	P,N,K,H	P,N,K,H	P,N,K,H
89	D,G,A,E,*	D,G,A,E,K,R,P,*	D,G,A,P,*
90	-	G,A	G,A
91	A,V,D,T	A,V,S,T	A,V,S
91a	A,V,G,Y,*	A,V,G,Y,F,*	A,V,G,Y,F,*
92	G,*	G,*	G,*
93	G,*	G,H,T,*	G,H,T,*
94	Q,K,R,W,F,S,* ,S,*	Q,K,R,W,F,S,*	Q,K,R,W,F
98	-	G,A	G,A
101	-	G,A	G,A,F,Y
135	L	L	L
140	A,R,N	A,R,N	A,R,N
143	G,S	P	P
144	K,R,D,A,N,E,Q	A	A
145	A,E,W,P,G,F,Y,P,R,K	A,E,L,W	A,E,L,W
145a	P,A,F,Q,S,W,I,R,*	P,A,I,Q,S	I,A,Q,P,S
146	P,A,F,Q,S,W,I,R,G,E,*	P,A,I,Q,S,E,K,D,N,R,F,W,*	I,A,Q,P,S,E
147	A,L,I,F,*	A,L,I,F,W,G,Y,R,D,T,*	S,T,A,D
147a	*	*	D,N,E,Q,T
148	G,A,N	G,A,N	D,E,R,K,Y,F,N
149	-	W	L,I,F,W
150	A,G	A	A,S,N
167	P,F	A,F	A,F,P
168	S,T	S,T	S,T
178	N,Y	N,Y	N,Y
179	S,N,D	S,N,D	S,N,D

180	S,N,D	S,N,D	S,N,D
183	W,Y,A	W,Y,A	W,Y,A
185	P,H,R,E,D	P,H,R,E,D	P,H,R,E,D
192	K,R	K,R	K,R
193	G,D,E,Q	G,A	G,A
195	F	L,I,W,F	L,I,W,F
196	A,S,N,G	A,S,N,G	A,S,N,G
197	D,E	D,E	D,E
232	Q,L	Q,L	Q,L
233	Q,N,I	Q,N,I	Q,N,I
259	F,W,A	F,W,A	F,W,A
264	Q	Q	Q
326	Q,F,L	Q,F,L	Q,F,L
370	G	T,N	T,N
371	A,S,N,G,E,Q	A,G,N,S	A,G,N,V,L,I,S
373	D,N,Y	D,E,Y	D,E,Y
375	-	A,P,G,K	A,P,G,K
600	X	X	X

X = jeder beliebige natürliche Aminosäurerest

– konservierter Rest
* deletierter oder nicht vorhandener Rest

[0163] In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die CGTase-Variante der Erfindung eine CGTase-Variante, die von einem Enzym, das von einem Stamm von Bacillus erhältlich ist, abgeleitet ist, welches Enzym durch Substitution, Insertion und/oder Deletion an einer oder mehreren der Aminosäurepositionen, die den in der nachfolgenden Tabelle 12 angegebenen Positionen entsprechen, modifiziert worden ist. Solche Modifizierungen führen zu CGTase-Varianten mit reduzierter Produktinhibierung.

Tabelle 12

Von Bacillus abgeleitete CGTase-Varianten mit reduzierter Produktinhibierung

Positionen mittels CGTase-Nummerierung identifiziert

47	A, Q, L
89	G
100	A, I, L, F
185	R, E, D
186	A
196	A, L
232	Q, N, A, L
264	A, N, L
268	A
339	A
371	G, N, A, L, S, E, Q
375	G, Q, N, A, L, K
382	A, L, V
384	A, L, V
413	A, V, G
598	A, V, G, P
599a	P, R, H
600	X
603	A, V, L, G
616	A, I, L, G
626	A, I, V, L, G
627	A, V, L, G
628	A, V, L, G
633	A, V, L, I, G
636	I, L, A, G
649	A, G
651	A, G, V
662	A, L, I, G
667	A

X = jeder beliebige natürliche Aminosäurerest

[0164] Als die am stärksten bevorzugten Ausführungsformen stellt die Erfindung die folgenden CGTase-Varianten bereit:
Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 185 einen Argininrest (T185R) oder einen Glutaminsäurerest (T185E) oder einen Asparaginsäurerest (T185D) aufweist.
Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 186 einen Alaninrest (T186A) aufweist.
Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 196 einen Alaninrest (D196A) oder einen Leucinrest (D196L) aufweist.
Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 232 einen Glutaminrest (K232Q) oder einen Asparaginrest (K232N) oder einen Alaninrest (K232A) oder einen Leucinrest (K232L) aufweist.
Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 264 einen Alaninrest (E264A) oder einen Asparaginrest (E264N) oder einen Leucinrest (E264L) aufweist.
Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 268 einen Alaninrest (E268A) aufweist.
Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 371 einen Glycinrest (D371G) oder einen Asparaginrest (D371N) oder einen Alaninrest (D371A) oder einen Leucinrest (D371L) aufweist.
Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 375 einen Glycinrest (R375G) oder einen Glutaminrest (R375Q) oder einen Asparaginrest (R375N) oder einen Alaninrest (R375A) oder einen Leucinrest (R375L) aufweist.
Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 599a (über Insertion) einen Prolinrest (*599aP) oder einen Argininrest (*599aR) oder einen Histidinrest (*599aH) aufweist.
Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 616 einen Alaninrest (W616A) aufweist.

[0165] Bevorzugt sind die oben genannten CGTase-Varianten von einem Stamm von Bacillus autolyticus, ei-

nem Stamm von Bacillus cereus, einem Stamm von Bacillus circulars, einem Stamm von Bacillus circulans var. alkalophilus, einem Stamm von Bacillus coagulans, einem Stamm von Bacillus firmus, einem Stamm von Bacillus halophilus, einem Stamm von Bacillus macerans, einem Stamm von Bacillus megaterium, einem Stamm von Bacillus ohbensis, einem Stamm von Bacillus stearothermophilus oder einem Stamm von Bacillus subtilis abgeleitet.

[0166] Am stärksten bevorzugt sind die oben genannten CGTase-Varianten von dem Stamm Bacillus sp. Stamm 1011, dem Stamm Bacillus sp. Stamm 38-2, dem Stamm Bacillus sp. Stamm 17-1, dem Stamm Bacillus sp. 1-1, dem Stamm Bacillus sp. Stamm B1018, dem Stamm Bacillus circulars Stamm 8 oder dem Stamm Bacillus circulans Stamm 251 oder einer Mutante oder einer Variante davon abgeleitet.

[0167] In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die CGTase-Variante der Erfindung eine CGTase-Variante, die von einem Enzym, das von einem Stamm von Thermoanaerobacter erhältlich ist, abgeleitet ist, welches Enzym durch Substitution, Insertion und/oder Deletion an einer oder mehreren der Aminosäureposition, die den in der nachfolgenden Tabelle 13 angegebenen Positionen entsprechen, modifiziert worden ist. Eine solche Modifizierung führt zu CGTase-Varianten mit einer, wie in der Tabelle angezeigten, erhöhten Produktselektivität.

[0168] Bevorzugt ist die CGTase-Variante von einem Stamm von Thermoanaerobacter sp. ATCC 53627 oder einer Mutante oder einer Variante davon abgeleitet.

Tabelle 13

Von Thermoanaerobacter abgeleitete CGTase-Varianten mit erhöhter Produktselektivität

Positionen mittels CGTase-Nummerierung identifiziert

Position	α-Cyclodextrin	β-Cyclodextrin	γ-Cyclodextrin
21	F,Y	F,Y	F,Y
47	Q,L	A,Q,H,R,L	A,Q,H,R,L
87	I,H	I,H	I,H
88	N,K,H	N,K,H	N,K,H
89	G,A,Y,E,*	G,A,E,K,R,Y,P,*	G,A,Y,P,*
90	-	G,A	G,A
91	A,V,D,G	A,V,G,S	A,V,G,S
91a	A,V,G,Y,*	A,V,G,Y,*	A,V,G,Y,*
92	V,*	V,*	V,*
93	N,*	N,H,T,*	N,H,T,*
94	Q,K,R,W,F,N,* ,N,*	Q,K,R,W,F,N,*	Q,K,R,W,F
98	-	G,A	G,A
101	-	G,A	G,A,F,Y
135	L	L	L
140	A,R,N	A,R,N	A,R,N
143	G,S	-	-

144	K,R,D,N,E,Q	-	-
145	A,E,W,P,G,F,Y,P,R,K	A,E,L,W	A,E,L,W
145a	P,A,F,Q,S,W,I,R,*	P,A,I,Q,S	I,A,Q,P,S
146	P,A,F,Q,S,W,I,R,G,*	P,A,I,Q,S,K,D,N,R,F,W,*	I,A,Q,P,S
147	A,L,I,F,*	A,L,I,F,W,G,Y,R,D,*	S,A,D
147a	*	*	D,N,E,Q,T
148	G,A,N	G,A,N,Q	E,R,K,Y,F,N,Q
149	-	W	L,I,F,W
150	A,G	A,S	A,S,N
167	P,F	A,F	A,F,P
168	S	S	S
178	N	N	N
179	S,N,D	S,N,D	S,N,D
180	S,N,D	S,N,D	S,N,D
183	W,Y,A	W,Y,A	W,Y,A
185	P,H,R,E,D	P,H,R,E,D	P,H,R,E,D
192	K	K	K
193	G,D,E,Q	G,A	G,A
195	Y	L,I,W,Y	L,I,W,Y
196	A,S,N,G	A,S,N,G	A,S,N,G
197	D,E	D,E	D,E
232	Q,L	Q,L	Q,L
233	Q,N.I	Q,N,I	Q,N,I
259	F,W,A	F,W,A	F,W,A
264	Q	Q	Q
326	Q,F,L	Q,F,L	Q,F,L
370	-	T,N	T,N
371	A,S,N,G,E,Q	A,G,N,S	A,G,N,V,L,I,S
373	D,N	D,E	D,E
375	-	A,P,G,K	A,P,G,K
600	X	X	X

X = jeder beliebige natürliche Aminosäurerest

– konservierter Rest
* deletierter oder nicht vorhandener Rest

[0169] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist die CGTase-Variante der Erfindung eine CG-

Tase-Variante, die von einem Enzym, das von einem Stamm von Thermoanaerobacter erhältlich ist, abgeleitet ist, welches Enzym durch Substitution, Insertion und/oder Deletion an einem oder mehreren der Aminosäurereste, die den in der nachfolgenden Tabelle 14 angegebenen Positionen entsprechen, modifiziert worden ist. Solche Modifizierungen führen zu CGTase-Varianten mit reduzierter Produktinhibierung.

[0170] Bevorzugt ist die CGTase-Variante von einem Stamm von Thermoanaerobacter sp. ATCC 53627 oder einer Mutante oder einer Variante davon abgeleitet.

Tabelle 14

Von Thermoanaerobacter abgeleitete CGTase-Varianten mit reduzierter Produktinhibierung

Positionen mittels CGTase-Nummerierung identifiziert

47	A, Q, L
89	G
100	A, I, L, F
185	R, E, D
186	A
196	A, L
232	Q, N, A, L
264	A, N, L
268	A
339	A
371	G, N, A, L, S, E, Q
375	G, Q, NA, L, K
382	A, L, V
384	A, L, V
413	A, V, G
598	A, V, G, P
599a	P, R, H
600	X
603	A, V, L, G
616	A, I, L, G
626	A, I, V, L, G
627	A, V, L, G
628	A, V, L, G

[0171] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform ist die CGTase-Variante der Erfindung eine CGTase-Variante, die von einem Enzym, das von einem Stamm von Thermoanaerobacter erhältlich ist, abgeleitet ist, welches Enzym durch Substitution, Insertion und/oder Deletion an einem oder mehreren der Aminosäurereste, die den in der nachfolgenden Tabelle 14 angegebenen Positionen entsprechen, modifiziert worden ist. Solche Modifizierungen führen zu CGTase-Varianten mit reduzierter Produktinhibierung.

[0172] Bevorzugt ist die CGTase-Variante von einem Stamm von Thermoanaerobacter sp. ATCC 53627 oder einer Mutante oder einer Variante davon abgeleitet.

Tabelle 14

Von Thermoanaerobacter abgeleitete CGTase-Varianten mit reduzierter Produktinhibierung

Positionen mittels CGTase-Nummerierung identifiziert

47	A, Q, L
89	G
100	A, I, L, F
185	R, E, D
186	A
196	A, L
232	Q, N, A, L
264	A, N, L
268	A
339	A
371	G, N, A, L, S, E, Q
375	G, Q, NA, L, K
382	A, L, V
384	A, L, V
413	A, V, G
598	A, V, G, P
599a	P, R, H
600	X
603	A, V, L, G
616	A, I, L, G
626	A, I, V, L, G
627	A, V, L, G
628	A, V, L, G
633	A, V, L, I, G
636	I, L, A, G
649	A, G
651	A, G, V
662	A, L, I, G
667	A

X = jeder beliebige natürliche Aminosäurerest

[0173] Als die am stärksten bevorzugten Ausführungsformen stellt die Erfindung die folgenden CGTase-Varianten, die von einem Stamm von Thermoanaerobacter sp., bevorzugt dem Stamm von Thermoanaerobacter ATCC 53672 oder einer Mutante oder einer Variante davon abgeleitet sind, bereit:
Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 185 einen Argininrest (S185R) oder einen Glutaminsäurerest (S185E) oder einen Asparaginsäurerest (S185D) aufweist.
Eine CGTase-Variante, welche an Position 186 einen Alaninrest (Y186A) aufweist.
Eine CGTase-Variante, welche an Position 196 einen Alaninrest (D196A) oder einen Leucinrest (D196L) aufweist.
Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 232 einen Glutaminrest (K232Q oder einen Asparaginrest (K232N) oder einen Alaninrest (K232A) oder einen Leucinrest (K232L) aufweist.
Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 264 einen Alaninrest (E264A) oder einen Asparaginrest (E264N) oder einen Leucinrest (E264L) aufweist.
Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 268 einen Alaninrest (N268A) aufweist.
Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 371 einen Glycinrest (D371G) oder einen Asparaginrest (D371N) oder einen Alaninrest (D371A) oder einen Leucinrest (D371L) oder einen Glutaminsäurerest (D371E) aufweist.
Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 375 einen Glycinrest (R375G) oder einen Glutaminrest (R375Q) oder einen Asparaginrest (R375N) oder einen Alaninrest (R375A) oder einen Leucinrest (R375L) aufweist.
Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 599a (über Insertion) einen Prolinrest (*599aP) oder einen Argininrest (*599aR) oder einen Histidinrest (*599aH) aufweist.

Eine CGTase-Variante, welche Variante an Position 616 einen Alaninrest (W616A) aufweist.

Verfahren zum Herstellen von CGTase-Varianten

[0174] Die Herstellung von CGTase-Varianten der Erfindung folgt den allgemeinen Prinzipien der rekombinanten DNA-Technologie, z.B. wie beschrieben von Sambrook et al. [Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T; Molecular Cloning; A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, New York] und dem Fachmann bekannt.

[0175] Formal beginnt die Herstellung in der Bereitstellung eines DNA-Konstrukts, welches eine CGTase-Variante der Erfindung kodiert.

DNA-Konstrukte

[0176] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung ein DNA-Konstrukt bereit, welches eine CGTase-Variante der Erfindung kodiert. Wie hierin definiert, bezeichnet der Begriff „DNA-Konstrukt" jedes beliebige Nukleinsäuremolekül von cDNA-, genomischer DNA-, synthetischer DNA- oder RNA-Herkunft. Der Begriff „Konstrukt" bezeichnet ein Nukleinsäureabschnitt an, welcher einzel- oder doppelsträngig sein kann, und welcher auf einer vollständig oder teilweise natürlich vorkommenden Nukleotidsequenz, welche die CGTase-Variante von Interesse kodiert, basieren kann. Das Konstrukt kann optional andere Nukleinsäureabschnitte enthalten.

[0177] Das DNA-Konstrukt der Erfindung kann durch geeignetes Modifizieren einer DNA-Sequenz, welche die Vorläufer-CGTase kodiert, erstellt werden, welche Modifizierung verursachen kann:

(i) Einführung von einem oder mehreren Aminosäurerest(en) an einer oder mehreren verschiedenen Stelle(n) in der Aminosäuresequenz; und/oder

(ii) Substitution von einem oder mehreren Aminosäurerest(en) an einer oder mehreren verschiedenen Stelle(n) in der Aminosäuresequenz; und/oder

(iii) Deletion von einem oder mehreren Aminosäurerest(en) an einer oder mehreren Stelle(n) in der Aminosäuresequenz.

[0178] Die Modifizierung der DNA-Sequenz kann durch ortsgerichtete Mutagenese oder durch Zufalls-Mtagenese oder durch eine Kombination dieser Techniken gemäß gut bekannten Vorgehensweisen, z.B. wie von Sambrook et al., op cit, beschrieben, durchgeführt werden.

[0179] In stärker bevorzugten Ausführungsformen umfasst das DNA-Konstrukt der Erfindung eine oder mehrere der in den nachfolgenden Beispielen beschriebenen Oligonukleotidteilsequenzen (Primer). Diese Oligonukleotidteilsequenzen sind insbesondere

5'-G GTC GTT TAC CAG GCG CCG AAC TGG-3' (Y633A);

5'-GC GAG CTC GGG AAC GCG GAC CCG-3' (W616A:);

5'-CC GTC ACC GCG GAA GGC GGC-3' (W662A);

5'-GC ATC TAC AAG GGC CTG TACGAT CTC G-3' (N193G);

5'-GCA TCA TCA ATG GAT CCG GCG TAA AC-3' (Y89G);

5'-CAT ACG TCG CCC GCT AGC ATT TCC GAC CAG CCT TCC-3'

(145al);

5'-CG GGC GGG ACC GGT CCG GAC AAC CG-3' (D371G);

5'-G TCG GGC GGT ACC AAT CCG GAC AAC C-3' (D371N);

5'-CG TTC ATC GAT CAG CAT GAC ATG G-3' (N326Q);

5'-GC ATC ATC AAT GAT TCC GGA GTA AAC AAC ACG GC-3'

(Y89D); und

5'-G CCC GCC TCT CCG GAC CAG CCT TC-3' (S146P);

und die Oligonukleotidteilsequenzen (Primer), die als Primer A1 bis A24, Primer B1 bis B15 und C1 bis C9 in den Beispielen 5, 6 und 7 beschrieben sind.

Expressionsvektoren

[0180] Auf die Modifizierung folgend kann die CGTase-Variante erhalten werden, indem das DNA-Konstrukt, welches die CGTase-Variante der Erfindung kodiert, mit einem passenden Expressionssignal in einem passenden Expressionsvektor kombiniert wird.

[0181] Der Expressionsvektor der Erfindung kann jeder beliebige Expressionsvektor sein, der in geeigneter Weise in rekombinante DNA-Vorgehensweisen eingesetzt wird. Die Wahl des Vektors ist häufig von der Wirtszelle abhängig, in welche er einzuführen ist. Demnach kann der Vektor ein autonom replizierender Vektor sein, d.h. ein Vektor, welcher als eine extrachromosomale Einheit existiert, dessen Replikation unabhängig von der chromosomalen Replikation ist, z.B. ein Plasmid. Alternativ kann der Vektor einer sein, der, wenn er in eine Wirtszelle eingeführt wird, in das Wirtszellgenom integriert wird und zusammen mit dem/den Chromosom(en), in welches/welche er integriert worden ist, repliziert wird.

[0182] In dem Expressionsvektor der Erfindung ist die DNA-Sequenz, welche die CGTase-Variante kodiert, vorzugsweise mit zusätzlichen Abschnitten, welche für die Transkription der DNA erforderlich sind, funktionsfähig verknüpft. Im Allgemeinen ist der Expressionsvektor von einem Plasmid oder viraler DNA abgeleitet oder kann Elemente von beiden enthalten. Der Begriff „funktionsfähig verknüpft" zeigt an, dass die Abschnitte so arrangiert sind, dass sie für ihre beabsichtigten Zwecke zusammen funktionieren, z.B. beginnt die Transkription in einem Promotor und fährt entlang der DNA-Sequenz, welche die CGTase-Variante kodiert, fort.

[0183] Demnach sollte die DNA-Sequenz, welche die CGTase-Variante kodiert, in dem Expressionsvektor der Erfindung funktionsfähig mit einer geeigneten Promotor- und Terminatorsequenz verbunden sein. Der Promotor kann jede beliebige DNA-Sequenz sein, welche Transkriptionsaktivität in der gewählten Wirtszelle zeigt, und kann von Genen abgeleitet sein, die Proteine kodieren, welche entweder homolog oder heterolog zu der Wirtszelle sind. Die Vorgehensweisen, die verwendet werden, um die DNA-Sequenzen, welche für die CGTase-Variante kodieren, den Promotor bzw. den Terminator zu ligieren und sie in geeignete Vektoren zu insertieren, sind dem Fachmann gut bekannt (vgl. zum Beispiel Sambrook et al., op cit).

[0184] Der Promotor kann jede beliebige DNA-Sequenz sein, welche Transkriptionsaktivität in der gewählten Wirtszelle zeigt, und kann von Genen abgeleitet sein, welche Proteine kodieren, die entweder homolog oder heterolog zu der Wirtszelle sind.

[0185] Beispiele von geeigneten Promotoren zum Steuern der Transkription der DNA, welche die CGTase-Variante der Erfindung kodiert, in bakteriellen Wirtszellen, schließt den Promotor des maltogenen Amylase-Gens von Bacillus stearothermophilus, des alpha-Amylase-Gens von Bacillus licheniformis, des BAN-Amylase-Gens von Bacillus amyloliquefaciens, des Gens der alkalischen Protease von Bacillus subtilis oder des Xylanase- oder Xylosidase-Gens von Bacillus pumilus oder, bei dem Phagen Lambda, die P_R- oder P_L-Promotoren oder die lac-, trp- oder tac-Promotoren von E. coli ein.

[0186] Beispiele von geeigneten Promotoren zur Verwendung in Hefe-Wirtszellen schließen Promotoren von glycolytischen Hefe-Genen [Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 1980 255 12073–12080; Alber und Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1982 1 419–434] oder Alkoholdehydrogenase-Genen [Young et al., in Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals (Hollaender et al., Hrsg.), Plenum Press, New York, 1982] oder die TPI1-[US 4,599,311] oder ADH2-4c-[Russell et al., Nature 1983 304 652–654] Promotoren ein.

[0187] Beispiele von geeigneten Promotoren für die Verwendung in Wirtszellen eines filamentösen Pilzes sind zum Beispiel der ADH3-Promotor [McKnight et al., EMBO J. 1985 4 2093–2099] oder der tpi-Promotor. Beispiele von anderen verwendbaren Promotoren sind solche, die von dem Gen abgeleitet sind, das die TAKA-Amylase von A. oryzae, die Asparaginproteinase von Rhizomucor miehei, die neutrale α-Amylase von A. niger, die saure stabile α-Amylase von A. niger, die Glucoamylase (gluA) von A. niger oder A. awamori, die Lipase von Rhizomucor miehei, die alkalische Protease von A. oryzae, die Triosephosphatisomerase von A. oryzae oder die Acetamidase von A. nidulans kodiert. Bevorzugt sind die TAKA-Amylase- und gluA-Promotoren.

[0188] Der Expressionsvektor der Erfindung kann ferner eine DNA-Sequenz umfassen, welche es dem Vektor ermöglicht, in der besagten Wirtszelle zu replizieren. Der Expressionsvektor kann ebenfalls einen Selekti-

onsmarker umfassen, z.B. ein Gen, dessen Produkt einen Defekt in der Wirtszelle ausgleicht, wie das Gen, welches für Dihydrofolatreduktase (DHFR) kodiert oder das TPI-Gen von Schizosaccharomyces pombe [Russell P R; Gene 1985 40 125–130] oder eines, welches eine Resistenz gegenüber einem Wirkstoff, z.B. Ampicillin, Kanamycin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Neomycin, Hygromycin oder Methotrexat, verleiht. Für filamentöse Pilze schließen Selektionsmarker amdS, pyrG, argB, niaD und sC ein.

[0189] Um die CGTase in den Sekretionsweg der Wirtszelle zu lenken, kann in dem Expressionsvektor eine sekretorische Signalsequenz (ebenfalls bekannt als eine Leadersequenz, Präpro-Sequenz oder Prä-Sequenz) bereitgestellt werden. Die sekretorische Signalsequenz ist mit der DNA-Sequenz, welche die CGTase kodiert, in dem korrekten Leserahmen verbunden. sekretorische Signalsequenzen sind im Allgemeinen 5' zu der DNA-Sequenz, welche die CGTase-Variante kodiert, positioniert. Die sekretorische Signalsequenz kann die sein, die normalerweise mit der CGTase assoziiert ist, oder kann von einem Gen sein, welches ein anderes sekretiertes Protein kodiert.

[0190] In einer bevorzugten Ausführungsform kann der Expressionsvektor der Erfindung eine sekretorische Signalsequenz umfassen, die im Wesentlichen mit der das Sekretionssignal kodierenden Sequenz des α-Amylase-Gens von Bacillus licheniformis, z.B. wie in WO 86/05812 beschrieben, identisch ist.

[0191] Ebenfalls können Maßnahmen zur Amplifizierung der Expression vorgenommen werden, z.B. durch Tandem-Amplifikationstechniken, einschließlich Einzel- oder Doppel-„crossing-over", oder durch „multicopy"-Techniken, z.B. wie beschrieben in US 4,959,316 oder WO 91/09129. Alternativ kann der Expressionsvektor einen Temperatur-sensitiven Replikationsursprung einschließen, z.B. wie in EP 283,075 beschrieben.

[0192] Vorgehensweisen zum Ligieren der DNA-Sequenzen, welche die CGTase-Variante kodieren, des Promotors bzw. optional der Terminator- und/oder sekretorischen Signalsequenz, und zum Einbringen dieser in geeignete Vektoren, welche die für eine Replikation erforderliche Information enthalten, sind dem Fachmann gut bekannt (vgl. zum Beispiel Sambrook et al., op cit).

Wirtszellen

[0193] In noch einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung eine Wirtszelle bereit, welche das DNA-Konstrukt der Erfindung und/oder den rekombinanten Expressionsvektor der Erfindung umfasst.

[0194] Die Wirtszelle der Erfindung, in welche das DNA-Konstrukt oder der rekombinante Expressionsvektor der Erfindung einzuführen ist, kann jede beliebige Zelle sein, bevorzugt eine nicht-pathogene Zelle, welche in der Lage ist, die CGTase-Variante herzustellen, und schließt Bakterien-, Hefe-, Pilz- und höhere eukaryotische Zellen ein.

[0195] Beispiele von bakteriellen Wirtszellen, welche, bei einer Kultivierung, in der Lage sind, die CGTase-Variante der Erfindung herzustellen, sind grampositive Bakterien, wie Stämme von Bacillus, insbesondere ein Stamm von B. subtilis, B. licheniformis, B. lentus, B. brevis, B. stearothermophilus, B. alkalophilus, B. amyloliquefaciens, B. coagulans, B. circudans, B. lautus, B. megaterium, B. pumilus, B. thuringiensis oder B. agaradherens oder Stämme von Streptomyces, insbesondere ein Stamm von S. lividans oder S. murinus, oder gramnegative Bakterien, wie Escherichia coli. Die Transformation der Bakterien kann durch Protoplastentransformation oder durch Verwenden von kompetenten Zellen in einer per se bekannten Weise bewirkt werden (vgl. Sambrook et al., op cit).

[0196] Wenn die CGTase-Variante in Bakterien, wie E. coli, exprimiert wird, kann die CGTase in dem Cytoplasma verbleiben, typischer Weise als unlösliche Körnchen (bekannt als Einschlusskörper), oder kann durch eine bakterielle Sekretionssequenz in den periplasmatischen Raum gelenkt werden. In dem erstgenannten Fall werden die Zellen lysiert und die Körnchen werden gewonnen und denaturiert, wonach die CGTase durch Verdünnung des Denaturierungsmitgtels wieder gefaltet wird. In dem letztgenannten Fall kann die CGTase aus dem periplasmatischen Raum gewonnen werden, indem die Zellen zerstört werden, z.B. durch Ultraschallbehandlung oder osmotischen Schock, um die Inhalte des periplasmatischen Raumes freizusetzen und die CGTase-Variante zu gewinnen. Beispiele von geeigneten Hefezellen schließen Zellen von Saccharomyces spp. oder Schizosaccharomyces spp., insbesondere Stämme von Saccharomyces cerevisiae oder Saccharomyces kluyveri ein. Verfahren zum Transformieren von Hefezellen mit heterologer DNA und zum Herstellen von heterologen Polypeptiden hieraus werden z.B. in US 4,599,311, US 4,931,373, US 4,870,008, 5,037,743 und US 4,845,075 beschrieben, die alle hiermit durch Bezugnahme aufgenommen werden. Transformierte Zellen werden durch einen Phänotyp selektionert, der durch einen Selektionsmarker bestimmt wird, im Allgemeinen eine

Wirkstoffresistenz oder die Fähigkeit, in der Abwesenheit eines bestimmten Nährstoffs, z.B. Leucin, zu wachsen. Ein bevorzugter Vektor zur Verwendung in Hefe ist der POT1-Vektor, offenbart in US 4,931,373. Der DNA-Sequenz, welche die CGTase-Variante der Erfindung kodiert, kann eine Signalsequenz und optional eine Leadersequenz, z.B. wie oben beschrieben, vorangehen. Weitere Beispiele von geeigneten Hefezellen sind Stämme von Kluyveromyces, wie K. lactis, Hansenula, z.B. H. polymorpha, oder Pichia, z.B. P. pastoris [Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 1986 132 3459–3465; US 4,882,279].

[0197] Beispiele von anderen Pilz-Zellen sind Zellen von filamentösen Pilzen, z.B. Aspergillus spp., Neurospora spp., Fusarium spp. oder Trichoderma spp., insbesondere Stämme von A. oryzae, A. nidulans oder A. niger. Die Verwendung von Aspergillus spp. für die Expression von Proteinen ist z.B. in EP 272,277 und EP 230,023 beschrieben worden. Die Transformation von F. oxysporum kann zum Beispiel, wie von Malardier et al., Gene 1989 78 147–156 beschrieben, durchgeführt werden.

[0198] Die oben beschriebene transformierte oder transfizierte Wirtszelle wird dann in einem geeigneten Nährmedium unter Bedingungen, welche die Expression der CGTase erlauben, kultiviert, wonach die resultierende CGTase-Variante aus der Kultur gewonnen wird.

[0199] Das Medium, welches verwendet wird, um die Zellen zu kultivieren, kann jedes beliebige herkömmliche Medium sein, das für ein Wachstum der Wirtszellen geeignet ist, wie Minimal- oder Komplexmedien, die passende Ergänzungsstoffe enthalten. Geeignete Medien sind von kommerziellen Anbietern erhältlich oder können gemäß den veröffentlichten Rezepten (z.B. in den Katalogen der American Type Culture Collection) zubereitet werden. Die durch die Zellen hergestellte CGTase-Variante kann dann aus dem Kulturmedium durch herkömmliche Vorgehensweisen gewonnen werden, einschließlich dem Separieren der Wirtszellen aus dem Medium durch Zentrifugation oder Filtration, dem Präzipitieren der Protein-haltigen Komponenten aus dem Überstand oder des Filtrats mittels eines Salzes, z.B. Ammoniumsulfat, dem Aufreinigen mittels einer Vielzahl an chromatographischen Vorgehensweisen, z.B. Ionenaustauschchromatographie, Gelfiltrationschromatographie, Affinitätschromatographie oder dergleichen, abhängig von dem Typ der besagten CGTase.

Verfahren zum Herstellen von CGTase-Varianten

[0200] In einem noch weiteren Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zum Herstellen der CGTase-Variante der Erfindung bereit, in welchem eine geeignete Wirtszelle, welche mit einer DNA-Sequenz, welche die CGTase kodiert, transformiert worden ist, unter Bedingungen, welche die Herstellung des Enzyms erlauben, kultiviert wird, und das resultierende Enzym aus der Kultur gewonnen wird.

[0201] Das Medium, das verwendet wird, um die transformierten Wirtszellen zu kultivieren, kann jedes beliebige herkömmliche Medium sein, welches für ein Wachstum der besagten Wirtszellen geeignet ist. Die exprimierte CGTase kann in geeigneter Weise in das Kulturmedium sekretiert werden und kann daraus durch gut bekannte Vorgehensweisen gewonnen werden, einschließlich dem Separieren der Zellen von dem Medium durch Zentrifugation oder Filtration, dem Präzipitieren Protein-haltiger Komponenten aus dem Medium mittels eines Salzes, wie Ammoniumsulfat, gefolgt von chromatographischen Vorgehensweisen, wie Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie und dergleichen.

Gewerbliche Anwendungen

[0202] Die CGTase-Variante der Erfindung findet Anwendung in Verfahren für die Herstellung von Cyclodextrinen für verschiedene gewerbliche Anwendungen, insbesondere in der Nahrungsmittelindustrie, Kosmetikindustrie, chemischen, agrochemischen und pharmazeutischen Industrie.

[0203] Daher stellt die Erfindung in einem anderen Aspekt CGTase-Varianten zur Verwendung in einem Verfahren zur Herstellung von Cyclodextrinen, insbesondere α-, β-, γ-, δ-, ε-, und/oder ζ-Cyclodextrinen bereit. In einer stärker bevorzugten Ausführungsform stellt die Erfindung CGTase-Varianten für die Verwendung in einem Verfahren zur Herstellung von α-, β- und γ-Cyclodextrinen oder Mischungen davon bereit. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform stellt die Erfindung CGTase-Varianten für die Verwendung in einem Verfahren zur Herstellung von δ-, ε-, und ζ-Cyclodextrinen oder Mischungen davon bereit.

[0204] Die CGTase-Varianten der Erfindung können ebenfalls in einem Verfahren zur Herstellung von linearen Oligosacchariden, insbesondere linearen Oligosacchariden von 2 bis 12 Glucoseeinheiten, bevorzugt linearen Oligosacchariden von 2 bis 9 Glucoseeinheiten, verwendet werden.

[0205] In noch einer anderen bevorzugten Ausführungsform können die CGTase-Varianten der Erfindung zur in situ-Erzeugung von Cyclodextrinen verwendet werden. Auf diese Weise können die CGTase-Varianten der Erfindung zu einem Substrat-enthaltenden Medium hinzugefügt werden, in welchem die Enzymvarianten in der Lage sind, die gewünschten Cyclodextrine zu bilden. Diese Anwendung ist insbesondere gut geeignet, um in Verfahren zum Herstellen von gebackenen Produkten (Erzeugnissen), in Verfahren zur Stabilisierung von chemischen Produkten (Erzeugnissen) während ihrer Herstellung und in Detergenszusammensetzungen eingesetzt zu werden.

[0206] Von bestimmten Cyclodextrinen ist bekannt, dass sie die Qualität von gebackenen Produkten (Erzeugnissen) verbessern. Die CGTase-Varianten der Erfindung können daher ebenfalls zum Einsatz in Brot-verbessernden Zusätzen, z.B. Teigzusammensetzungen, Teigzusätzen, Teigverbesserern, Vormischungen und ähnlichen Zubereitungen, die herkömmlicherweise verwendet werden, um zu dem Mehl und/oder dem Teig während der Verfahren zum Herstellen von Brot oder anderen gebackenen Produkten (Erzeugnissen) zugegeben zu werden, verwendet werden.

[0207] Cyclodextrine besitzen eine Einschlussfähigkeit, die für eine Stabilisierung, Solubilisierung (Löslichmachung) usw. nützlich ist. Daher können Cyclodextrine oxidierende und photolytische Substanzen stabil machen, flüchtige Substanzen nicht-flüchtig machen, schwer lösliche Substanzen löslich machen und geruchsintensive Substanzen geruchslos machen usw., und sind daher nützlich, um Duftstoffe, Vitamine, Farbstoffe, Pharmazeutika, Pestizide und Fungizide einzukapseln. Cyclodextrine sind ebenfalls in der Lage, lipophile Substanzen, wie Cholesterol (Cholesterin), zu binden, um sie aus Eidotter, Butter usw. zu entfernen.

[0208] Cyclodextrine finden ebenfalls Verwertung in Produkten (Erzeugnissen) und Verfahren, die sich auf Kunststoffe und Gummi beziehen, wo sie für verschiedene Zwecke in Kunststofflaminaten, Filmen, Membranen usw. verwendet worden sind. Cyclodextrine sind ebenfalls für die Herstellung von biologisch abbaubaren Kunststoffen verwendet worden.

BEISPIELE

[0209] Die Erfindung wird ferner unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele, welche nicht dazu gedacht, in irgendeiner Weise den Umfang der Erfindung, wie beansprucht, zu beschränken.

BEISPIEL 1

Kristallstruktur und Molecular Modelling von CGTase-Enzymen

[0210] Die CGTase von Bacillus circulars Stamm 251 [vgl. Lawson C L, van Montfort R, Strokopytov B, Rozeboom H J, Kalk K H, de Vries G E, Penninga D, Dijkhuizen L und Dijkstra B W; J. Mol. Biol. 1994 236 590–600] wurde in einer Pufferlösung eingeweicht, welche das nicht-hydrolysierbare Tetrasaccharid Acarbose enthält, und es wurde eine Röntgenstruktur der CGTase, einschließlich des an dem katalytischen Zentrum lokalisierten Pseudo-Tetrasaccharids, erhalten, vgl. Strokopytov et al., [Strokopytov B, Penninga D, Rozeboom H J; Kalk K H, Dijkhuizen L und Dijkstra B W; Biochemistry 1995 34 2234–2240]. Die Koordinaten dieser Struktur sind bei der Protein Data Bank, Biology Department, Bldg. 463, Brookhaven National Laboratory, P. O. Box 5000, Upton, NY 11973-5000, USA, unter dem Zugriffscode 1CXG hinterlegt worden.

[0211] Durch zusätzliches Einweichen in einem Puffer, der Maltoheptaose enthielt, wurde ein Nonasaccharid (A bis I) in einer Enzym-Substrat-Komplexstruktur gebildet. Die Koordinaten dieser Struktur sind bei der Protein Data Bank, Biology Department, Bldg. 463, Brookhaven National Laboratory, P. O. Box 5000, Upton, NY 11973-5000, USA, unter dem Zugriffscode 1DIJ hinterlegt worden. Durch weiteres Hinzufügen eines Trisaccharids (J bis L) zu dem nicht-reduzierenden Ende des Nonasaccharids durch Computer-Modelling, sind die Substratbindungsspalte und die hierin involvierten Reste in der A- und B-Domäne lokalisiert worden.

[0212] Mit Hilfe eines Computerprogramms, Insight™ Software Package von Biosym, unter Verwenden einer Teilmengen-Funktion („subset-zone function"), konnten Positionen innerhalb von ausgewählten Abständen festgelegt werden. Auf diese Weise wurden die Tabellen 1 bis 4 erzeugt.

[0213] Die in Fig. 1 aufgelisteten Reste beziehen sich auf die CGTase von Bacillus circulans Stamm 251 und umfassen lediglich die am nächsten gelegenen Kontakte zwischen dem Substrat und dem Enzym. Durch Verändern der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen und anderen Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und dem Substrat, kann die Produktselektivität geändert werden. Normalerweise erfolgt die Spaltung der Stär-

ke in dem Modell zwischen der Glucoseeinheit B und C.

[0214] Durch Computer-Modelling ist ein Trisaccharid zu dem reduzierenden Ende der Acarbose (A) und dem nicht-reduzierenden Ende eines Pentasaccharids, lokalisiert in der E-Domäne, hinzugefügt worden, und hierdurch die Substratbindungsstellen in den A-B- und E-Domänen miteinander verbunden worden. Insgesamt ist ein Substrat von 20 Glucoseeinheiten in dem Enzym lokalisiert worden.

[0215] Die Struktur einer CGTase von Thermoanaerobacter wurde auf der Basis der bekannten Struktur der CGTase von Bacillus circulars modelliert. Auch hier wurde das Computerprogramm Insight™ angewendet, unter Verwenden des Homologie-Moduls („homology module"), gemäß den Anweisungen des Herstellers. Das in Bacillus circulars gefundene Substrat wurde in das Thermoanaerobacter-Modell eingebracht („docked") und die in den Tabellen 5 bis 7 angegebenen Positionen identifiziert.

BEISPIEL 2

Konstruktion von α-Cyclodextrin-herstellenden CGTase-Varianten von Bacillus

[0216] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion von drei α-Cyclodextrin-herstellenden CGTase-Varianten, in denen eine ortsgerichtete Mutagenese zu einer geänderten Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen in den Subsites der Spalte des aktiven Zentrums geführt hat. Die Varianten sind von einer CGTase von Bacillus circulans Stamm 251 (d.h. dem Wildtyp-Enzym) abgeleitet, die erhalten wurde, wie von Lawson et al. [Lawson C L, van Montfort R, Strokopytov B, Rozeboom H J, Kalk K H, de Vries G. E, Penninga D, Dijkhuizen L und Dijkstra B W; J. Mol. Biol. 1994 236 590–600] beschrieben.

[0217] Für die Konstruktion der Varianten wurde ein Verfahren auf der Basis einer PCR für ortsgerichtete Mutagenese verwendet. Die folgenden Oligonukleotide (Primer) wurden verwendet, um die Mutationen herzustellen:

Y89G: 5'-GCA TCA TCA ATG GAT CCG GCG TAA AC-3' (Bam HI); und

S146P: 5'-G CCC GCC TCT CCG GAC CAG CCT TC-3' (BspE I).

[0218] Eine erfolgreiche Mutagenese ergab das Auftreten der unterstrichenen Restriktionsstellen, was ein schnelles Screenen nach potentiellen Mutanten ermöglichte.

[0219] Die Mutationen wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestätigt. Die mutierten Proteine wurden unter der Verwenden eines Amylase- und Protease-negativen Bacillus subtilis Stamms hergestellt und unter Verwenden von Affinitätschromatographie aufgereinigt.

[0220] Die CGTase-Aktivität wurde bestimmt, indem passend verdünnte Enzymlösungen mit Substrat in 10 mM Natriumcitrat, pH 6,0, für 5 bis 10 Minuten bei 50°C inkubiert wurden.

[0221] Die Cyclodextrin-Bildungsaktivität (Transglycosylierungsaktivität) wurde unter Verwenden von 5% Paselli™ SA2 (d.h. teilweise hydrolysierte Kartoffelstärke mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 50, erhältlich von AVEBE, Foxhol, Niederlande) als Substrat bestimmt. Das gebildete β-Cyclodextrin wurde mit Phenolphthalein bestimmt. Eine Aktivitätseinheit ist definiert als die Menge an Enzym, die in der Lage ist, 1 µmol β-Cyclodextrin pro Minute herzustellen. Die α- und β-Cyclodextrin-Bildung wurde anschließend unter Verwendung von HPLC (vgl. nachfolgend) bestimmt.

[0222] Die Cyclodextrin-Bildung wurde ebenfalls unter den Bedingungen eines industriellen Herstellungsverfahrens bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 0,1 U/ml CGTase mit 10% Paselli™ WA4 (d.h. mit einem Düsenkocher gekochte ("jet-cooked"), prä-gelatinierte Trommel-getrocknete Stärke) in einem 10 mM Natriumcitrat-Puffer (pH 6,0) bei 50°C für 45 Stunden inkubiert. Die Proben wurden in regelmäßigen Zeitintervallen gesammelt, für 5 Minuten gekocht, und die gebildeten Produkte durch HPLC analysiert, unter Verwenden einer 25 cm Econosil-NH_2 10 Micron-Säule (Alltech Associates Inc., USA) und mit Acetonitril/Wasser (60/40% Vol/Vol) bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml pro Minute eluiert.

Ergebnisse

[0223] Es wurden Varianten entwickelt, um die α-Cyclodextrin-Bildung zu erhöhen. In dem ersten Experiment wurde ein Tyrosinrest an Position 89 in einen Asparaginsäurerest verändert (Y89D), was eine zusätzliche Was-

serstoffbrückenbindung mit der Subsite F des Substrat einführt, vgl. Fig. 1. Dies hat eine stärkere Bindung der Amylosekette in der Spalte des aktiven Zentrums mit der Bildung von kleineren Cyclodextrinen zur Folge. Als Ergebnis wurde ein Anstieg der α-Cyclodextrin-Bildungsaktivitäten detektiert, mit einer gleichzeitigen Abnahme der β-Cyclodextrin-Bildungsaktivität, wie aus dem Verhältnis der aus Paselli™ WA4 hergestellten Cyclodextrine, vgl. nachfolgende Tabelle 16, und in den Cyclodextrin-Bildungsprofilen, vgl. **Fig.** 2B, zu ersehen ist.

[0224] In einem zweiten Experiment wurde Serin an Position 146 in einen Prolinrest verändert (S146P). Dies hatte eine tiefgreifende Veränderung in dem Wasserstoff-Netzwerk an der Subsite I des Substrats, vgl. Fig. 1, zur Folge. Wie aus der nachfolgenden Tabelle 15 zu sehen ist, hat diese Mutation einen wesentlichen Einfluss auf die Cyclodextrin-Bildungsaktivitäten. Die α-Cyclodextrin-Bildungsaktivität stieg drastisch an, auf Kosten der β-Cyclodextrin-Bildungsaktivität. Es lag eine geringe Wirkung auf die γ-Cyclodextrin-Bildungsaktivität vor. Dies entspricht ebenfalls dem Verhältnis der Cyclodextrine, das bestimmt und in Tabelle 16 und in **Fig.** 2C dargestellt wird.

[0225] In einem dritten Experiment wurde eine Doppelmutation ausgeführt. In diesem Experiment wurde Tyrosin an Position 89 in einen Asparaginsäurerest verändert und Serin an Position 146 in einen Prolinrest verändert (Y89D/S146P). Diese Mutationen ergeben eine Kombination der Wirkungen, die bei den, wie oben beschrieben durchgeführten, zwei Einzelmutationen zu sehen waren. Diese Variante besitzt die größte α-Cyclodextrin-Bildungsaktivität, vgl. Tabelle 15, und die größte Bildung von α-Cyclodextrin, vgl. Tabelle 16 und **Fig.** 2D.

Tabelle 15

Spezifische Aktivitäten von α-, β- und γ-CD-bildenden CGTasen

Enzym	Cyclisierungsaktivität (U/mg)		
	α	β	γ
Wildtyp	2	280	80
Y89D	5	270	47
S146P	25	104	82
Y89D/S146P	35	109	79

Tabelle 16

Verhältnis der Cyclodextrin-Bildung aus 10% Paselli™ WA4 (bei 50°C und für 50 Stunden)

Enzym	Hergestelltes Cyclodextrin (%)		
	α	β	γ
Wildtyp	14	63	23
Y89D	17	63	20
S146P	26	55	19
Y89D/S146P	31	51	18

BEISPIEL 3

Mutationen in der E-Domäne einer CGTase von Bacillus

[0226] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion von zwei CGTase-Varianten, die Mutationen in der Spalte der E-Domänen aufweisen. Die Varianten sind von einer CGTase von Bacillus circulars Stamm 251 (d.h. dem Wildtyp-Enzym) abgeleitet, die erhalten wurden, wie von Lawson et al. [Lawson C L, van Montfort R, Strokopytov B, Rozeboom H J, Kalk K H, de Vries G E, Penninga D, Dijkhuizen L und Dijkstra B W; J. Mol. Biol. 1994

236 590–600] beschrieben.

[0227] Es sind zwei Maltose-Bindungsstellen (MBS) in der E-Domäne identifiziert worden und in diesem Experiment ist gefunden worden, dass diese Stellen von besonderer Bedeutung für die Rohstärke-Bindungseigenschaften des Enzyms sind. Die erste Stelle (MBS1) schließt Tryptophan an den Positionen 616 und 662 ein, welche eine Maltoseeinheit durch van der Waals-Kontakte ihrer Indolgruppen mit den Glucoseringen des Substrats binden. An der zweiten Stelle (MBS2) bildet das in den meisten Fällen konservierte Tyrosin an Position 633 van der Waals-Kontakte mit einem Glucoserest des Substrats. Wasserstoffbrückenbindungen mit umliegenden Resten verstärken die Bindung an diesen Stellen. MBS2 ist in der Nähe der Furche lokalisiert, die zu dem aktiven Zentrum führt.

[0228] Es wurden Mutationen eingeführt durch ein Verfahren, das auf zwei PCR-Reaktionen unter Verwenden der VENT-DNA-Polymerase basiert. Für jede Mutation wurden spezifische Oligonukleotide entwickelt. Die Mutationen wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzierung bestätigt. Die Varianten wurden von einem Amylase- und Protease-negativen Bacillus subtilis Stamm erhalten und wurden unter Verwenden von Affinitätschromatographie aufgereinigt.

[0229] Bakterienstämme und Plasmide: Escherichia coli MC1061 [Meissner P S, Sisk W P, Berman M L; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987 84 4171–4175] wurde für rekombinanten DNA-Manipulationen und ortsgerichtete Mutagenese verwendet. E. coli DH5α [Hanahan D; J. Mol. Biol. 1983 166 557] wurde für die Herstellung von monomerer supercoiled Plasmid-DNA für die Sequenzierung verwendet. CGTase-Varianten wurden mit dem α-Amylase- und Protease-negativen Bacillus subtilis Stamm DB104A hergestellt [Smith H, de Jong A, Bron S, Venema G; Gene 1988 70 351–361]. Das Fragment, welches den Kanamycin-Resistenzmarker enthielt, wurde mit dem größten Fragment des Plasmids pDP66S [Penninga D, Strokopytov B, Rozeboom H J, Lawson C L, Dijkstra B W, Bergsma J, Dijkhuizen L; Biochemistry 1995 34 3368–3376] ligiert, welches das CGTase-Gen von Bacillus circulars enthielt, verdaut mit HindIII und XbaI (ergibt mit der Klenow-Polymerase stumpfe Enden). Der sich ergebende CGTase-Proteinexpressions-Shuttle-Vektor pDP66K, mit dem CGTase-Gen unter der Kontrolle des Erythromycin-induzierbaren p32-Promotors [van der Vossen J M B M, Kodde J, Haandrikman A J, Venema G, Kok J; Appl. Environ. Microbiol. 1992 58 3142–3149] wurde in E. coli MC1061 unter Selektion für eine Erythromycin- und Kanamycin-Resistenz transformiert, vgl. **Fig. 3**.

[0230] Konstruktion von CGTase-Varianten: Da eine relativ geringe Stabilität mit dem Plasmid pDP66S (8,5 Kb) [Saenger W; Angew. Chem. 1980 19 344–362] festgestellt wurde, wurde pDP66K (7,7 Kb) konstruiert, vgl. **Fig. 3**, mit dem CGTase-Gen unter der Kontrolle des starken p32-Promotors [van der Vossen J M B M, Kodde J, Haandrikman A J, Venema G, Kok J; Appl. Environ. Microbiol. 1992 58 3142–3149]. Das Plasmid pDP66K, welches den zusätzlichen Antibiotika-Resistenzmarker für Kanamycin enthielt, erschien beträchtlich stabiler, sowohl in E. coli Zellen als auch in B. subtilis Zellen, als das Plasmid pDP66S, welches die Streptomycin/Spectinomycin-Resistenzkassette enthielt. Unter Verwenden dieses Shuttle-Vektors wurde eine hohe extrazelluläre Herstellung des Wildtyp-Enzyms und der CGTase-Varianten, in Batch-Fermentationen mit dem α-Amylase- und Protease-negativen B. subtilis Stamm DB104A reproduzierbar, erhalten. Ein einzelner 5 l Erlenmeyer-Kolben mit 1 l B. subtilis Stamm DB104A-Kultur ermöglichte eine Aufreinigung bis zur Homogenität von bis zu 25 mg der CGTase-Varianten. Die Mutationen wurden über ortsgerichtete (PCR) Mutagenese konstruiert. Unter Verwenden von spezifischen Oligonukleotid-Primern, wurde eine Mutationshäufigkeit von nahezu 70% beobachtet. Alle Mutationen wurden durch Restriktionsanalyse und DNA-Sequenzierung bestätigt.

[0231] Wachstumsbedingungen: Das Plasmid, welches die Bakterienstämme trägt, wurde auf LB-Medium in der Gegenwart der Antibiotika Erythromycin und Kanamycin bei Konzentrationen von 100 und 5 µg/ml für E. coli bzw. Bacillus subtilis wachsen gelassen [Sambrook et al., op cit]. Sofern es geeignet war, enthielten die Agarplatten 1% Stärke zum Screenen nach einer Halo-Bildung. Der Bacillus subtilis Stamm DB104A wurde in einem 5 l Kolben wachsen gelassen, der 1 l Medium mit 2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1% Natriumchlorid und 1% Casaminosäuren (pH 7,0) mit 10 µg/ml Erythromycin und 5 µg/ml Kanamycin enthielt.

[0232] DNA-Manipulationen: Die Restriktionsendonukleasen und das Klenow-Enzym wurden von Pharmacia LKB Biotechnology, Schweden, bezogen und gemäß den Instruktionen des Herstellers verwendet. DNA-Manipulationen und die Calciumchlorid-Transformation von E. coli-Stämmen wurden wie beschrieben ausgeführt [Sambrook et al., op cit]. Die Transformation von Bacillus subilis wurde durchgeführt, wie von Bron [Harwood C R und Cutting S M, Hrsg.; Modern Microbiological Methods for Bacillus, 1990, Wiley & Sons, New York/Chichester; „Plasmids", S. 146–147] beschrieben.

[0233] Ortsgerichtete Mutagenese: Um Mutationen einzuführen, verwendeten wir ein Verfahren, das auf 2

PCR-Reaktionen unter Verwenden der VENT-DNA-Polymerase (New-England Biolabs, Beverly, MA, USA) basiert, in welchem eine erste PCR unter Verwenden eines Mutagenese-Primers auf dem kodierenden Strang, plus einem Primer, 910 bis 1050 Bp stromabwärts auf dem Template-Strang (Matrizenstrang), durchgeführt wurde. Das Produkt dieser Reaktion (910 bis 1050 Bp) wurde nachfolgend als Primer in der zweiten PCR, zusammen mit einem Primer, 760 bis 900 Bp stromaufwärts auf dem kodierenden Strang verwendet. Das Produkt der letzten Reaktion (1800 Bp) wurde mit BglI und HindIII geschnitten und gegen das entsprechende Fragment (600 Bp) aus dem Vektor pDP66K ausgetauscht. Das sich ergebende (mutierte) Plasmid wurde in E. coli-MC1061-Zellen transformiert. Die folgenden Oligonukleotide wurden verwendet, um diese Mutationen herzustellen:

Y633A: 5'-G GTC GTT TAC CAG GCG CCG AAC TGG-3'

W616A: 5'-GC GAG CTC GGG AAC GCG GAC CCG-3'

W662A: 5'-CC GTC ACC GCG GAA GGC GGC-3'

[0234] Eine erfolgreiche Mutagenese ergab das Auftreten der unterstrichenen Restriktionsstellen, was ein schnelles Screenen nach potentiellen Mutationen ermöglicht. Für Y633A war diese Restriktionsstelle NarI, für W616A SacI und für W662A SacII.

[0235] DNA-Sequenzierung: Das Plasmid pDP66K, welches die richtige Restriktionsstelle trägt, wurde in E. coli DH5α-Zellen transformiert. Die DNA-Sequenz-Bestimmung wurde anhand von supercoiled Plasmid-DNA unter Verwenden des Didesoxy-Kettenabbruch-Verfahrens [Sanger F, Coulsan A R; J. Mol. Biol. 1975 94 441–448] und des T7-Sequenzierungs-Kits von Pharmacia LKB Biotechnology, Schweden, durchgeführt.

[0236] Herstellung und Aufreinigung von CGTase-Varianten: Das Plasmid pDP66K, welches positiv charakterisierte mutierte CGTase-Gene trägt, wurde in Bacillus subtilis Stamm DB104A transformiert. Der Organismus wurde bis zu einer optischen Dichte von 4,5 bestimmt bei 600 nm in einem 5 l Kolben (für ungefähr 36 Stunden) wachsen gelassen. Unter diesen Bedingungen wurden hohe Spiegel an extrazelluläre CGTase hergestellt. Die Kultur wurde bei 4°C für 30 Minuten zentrifugiert (×10.000 g). Die (mutierten) CGTasen wurden weiter bis zur Homogenität mittels Affinitätschromatographie unter Verwenden einer 30 ml α-Cyclodextrin-Sepharose-6FF-Säule (Pharmacia, Schweden) aufgereinigt [Sundberg L, Porath J; J. Chromatogr. 1974 90 87–98], mit einer maximalen Kapazität von 3,5 mg Protein pro ml. Nach einem Waschen mit 10 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5) wurde die gebundene CGTase mit dem gleichen Puffer, enthaltend 10 mg/ml α-Cyclodextrin, eluiert.

Enzym-Tests

[0237] β-Cyclodextrin-Bildungsaktivität Die β-Cyclodextrin-Bildungsaktivität wurde unter Verwenden von 5% Paselli™ SA2 (d.h. teilweise hydrolysierte Kartoffelstärke mit einer durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 50, erhältlich von AVEBE, Foxhol, Niederlande) als Substrat und nach einer Inkubation für 3 Minuten bei 50°C bestimmt. 0,1–0,1-Aktivitätseinheiten wurden verwendet. Das gebildete β-Cyclodextrin wurde, basierend auf seiner Fähigkeit, einen stabilen farblosen Einschlusskomplex mit Phenolphtalein zu bilden, bestimmt. Eine Aktivitätseinheit ist definiert als die Menge an Enzym, die in der Lage ist, 1 µmol β-Cyclodextrin pro Minute zu bilden.

[0238] Rohstärke-Bindungseigenschaften: Die Rohstärke-Bindungseigenschaften wurden untersucht, indem 6 µg/ml Enzym mit ansteigenden Mengen (0 bis 10%) körniger Kartoffelstärke (Paselli™ SA2, erhältlich von AVEBE, Foxhol, Niederlande) für eine Stunde bei 4°C mit und ohne 0,1 mM β-Cyclodextrin (Gleichgewicht wurde innerhalb von 10 Minuten erreicht) inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurde das Protein, das an die Stärkekörnchen gebunden war, für 1 Minute bei 4°C und bei 10.000 × g abzentrifugiert, und die verbleibende β-Cyclodextrin-Bildungsaktivität des Überstandes wurde bestimmt, wie oben beschrieben.

[0239] Kinetische Untersuchungen: Kinetische Untersuchungen anhand von Paselli™ SA2 (AVEBE, Foxhol, Niederlande) wurden durchgeführt, indem die β-Cyclodextrin-Bildungsaktivität des Enzyms anhand von Paselli™-Konzentrationen im Bereich von 0 bis 5%, mit und ohne Zugabe von 0,1 oder 0,2 mM β-Cyclodextrin bestimmt wurde. In diesen Experimenten wurde ungefähr 0,6 µg/ml (0,15 bis 0,18 Einheiten) des Enzyms verwendet.

[0240] Kinetische Untersuchungen: Alternativ wurden die kinetischen Untersuchungen anhand von Rohstärke durch Inkubieren von 6 µg/ml Enzym für 10 Minuten mit Rohstärke-Konzentrationen in dem Bereich von 0

bis 50% durchgeführt. Die β-Cyclodextrin-Bildung wurde wie oben beschrieben bestimmt.

[0241] Die aus diesen kinetischen Untersuchungen und Bindungs-Untersuchungen gesammelten Daten wurden unter Verwendung der Hill-Gleichung ausgewertet („fitted"), was Y_{max}- und K_{50}-Werte für die Bindungs-Untersuchungen und V_{max}- und K_{50}-Werte für die kinetischen Untersuchungen ergab. K_i-Werte wurden wie folgt berechnet.

[0242] Für nicht-kompetitive Inhibierung:

$$K_i = \frac{[I]}{\frac{V_{max}}{V_{maxi}} - 1}$$

[0243] Für kompetitive Inhibierung:

$$K_i = \frac{[I]}{\frac{K_{50}}{K_{50}} - 1}$$

Ergebnisse

[0244] Da die Maltose-Bindungsstelle 1 (MBS1) zwei Tryptophan-Reste einschließt, wurde die Doppelmutation W616A/W662A konstruiert. Auf diese Weise verursachten wir vergleichbare Änderungen in den zwei Bindungsstellen, welche entwickelt wurden, um die hydrophoben Wechselwirkungen der aromatischen Reste mit den Glucoseeinheiten des Substrats vollständig zu entfernen. Die zwei separaten CGTase-Varianten W616A und W662A, ergaben dazwischenliegende Ergebnisse, verglichen mit der Doppelmutante W616A/W662A.

[0245] Aus den in Fig. 4 bis Fig. 6 dargestellten Ergebnissen, in denen die Kurven eher an eine Hill-Gleichung als an eine Michaelis-Menten-Gleichung besser anzupassen sind („better fitted"), ist ersichtlich, dass es eine Form von Kooperativität, die in die Reaktions- und Bindungskinetiken einbezogen ist, gibt.

[0246] Die Ergebnisse der Rohstärke-Bindungsexperimente werden in Tabelle 17 und Fig. 4 dargestellt. Die Bestimmung der Rohstärke-Bindung ergab eine scharfe Abnahme für die W616A/W662A-Variante, was anzeigt, dass MBS1 erforderlich ist und die höchste Affinität für eine Substratbindung besitzt. Die Y633A-Variante zeigt lediglich geringe Abnahmen in der Affinität und Y_{max}, was darauf hinweist, dass MBS2 lediglich eine geringe Mitwirkung an der Rohstärke-Bindung besitzt.

[0247] Die Wirkung von β-Cyclodextrin auf die Rohstärke-Bindung zeigt an, dass es die Bindung durch eine Kompetition mit einer Stärkekette um die Bindungsstellen des Enzyms inhibieren kann. Diese Wirkung erfolgte stärker ausgeprägt für die hergestellten Varianten, im Vergleich zum Wildtyp, was anzeigt, dass, wenn eine MBS deletiert wird, die Konkurrenz von β-Cyclodextrin mit Rohstärke um die verbleibende Stelle stärker ist. Dieses zeigt ebenfalls eine Form der Kooperativität zwischen den MBSs an.

[0248] Der Hill-Faktor "n", welcher den Grad der Kooperativität, der in die Rohstärke-Bindung involviert ist, anzeigt, ist stark herabgesetzt in der W616A/W662A-Variante, was anzeigt, dass MBS2 stark zu einer kooperativen Bindung beiträgt. Die Y633A-Variante besitzt den gleichen "n"-Wert wie das Wildtyp-Enzym. Dieses weist darauf hin, dass andere Stellen als MBS2 mit MBS1 in der Bindung kooperieren.

[0249] Die Ergebnisse der Reaktions-Kinetiken anhand von hydrolysierter Kartoffelstärke (Paselli™ SA2) sind in Tabelle 18 und Fig. 5 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen eine andere Rolle für MBS2 in dem Wildtyp-Enzym. Die geringere Affinität der Y633A-Variante für Paselli™ weist darauf hin, dass das Substrat in der Abwesenheit dieser Bindungsstelle weniger effizient zu dem aktiven Zentrum geführt werden könnte. Dies wird ebenfalls durch die Abnahme des Faktors "n" auf ungefähr 1 belegt, was zeigt, dass die in den Reaktions-Kinetiken beobachtete Kooperativität in dieser Variante verloren gegangen ist. Die Verschiebung von einer nicht-kompetitiven zu einer kompetitiven Inhibierung durch β-Cyclodextrin impliziert, dass MBS2 für die nicht-kompetitive Produktinhibierung verantwortlich ist. Die Ergebnisse mit der W616A/W662A-Variante zeigen, dass MBS1 lediglich leicht in den Abbau von Paselli™ involviert ist.

[0250] Die Ergebnisse der Reaktions-Kinetiken gegenüber Rohstärke sind in Tabelle 19 und Fig. 6 dargestellt. Die Ergebnisse zeigen eine hohe Abnahme der Affinität, wenn eine der beiden MBS deletiert sind, was anzeigt, dass für die Aktivität gegenüber Rohstärke beide MBS gleichsam wichtig sind. Bei hohen Rohstärke-Konzentrationen passt sich jedoch die Kurve, welche die W616A/W662A-Variante darstellt, an die des Wildtyp-Enzyms an, was darauf hinweist, dass eine andere Bindungsstelle als MBS1 ihre Funktion übernimmt. Diese Stelle könnte die MBS3 in der C-Domäne sein.

[0251] Aus diesen Experimenten wird gefolgert, dass die E-Domäne mit ihren Bindungsstellen für die Umwandlung von Rohstärke in Cyclodextrine erforderlich ist. Das Enzym bindet an die Rohstärkekörnchen über MBS1, während MBS2 die aus dem Körnchen herausragende Stärkekette zu dem aktiven Zentrum führt.

Tabelle 17

Bindungs-Eigenschaften gegenüber Rohstärke

Enzym	Y_{max}		K_{50} (% RS)		n	
	0 mM β-CD	0,1 mM β-CD	0 mM β-CD	0,1 mM β-CD	0 mM β-CD	0,1 mM β-CD
Wildtyp	96,2 ± 3,3	76,4 ± 1,3	0,70 ± 0,05	0,89 ± 0,04	1,71 ± 0,19	1,25 ± 0,06
W616A/W662A	48,7 ± 1,3	33,4 ± 2,0	2,36 ± 0,13	2,27 ± 0,30	1,19 ± 0,06	1,07 ± 0,07
Y633A	90,8 ± 2,2	58,4 ± 5,9	0,99 ± 0,05	2,70 ± 0,58	1,73 ± 0,12	1,34 ± 0,20

Tabelle 18

Kinetische Eigenschaften, bestimmt gegenüber Paselli™ SA2

Enzym	V_{max} (Einheiten/mg)			K_{50} (% Paselli™ SA2)			n	K_i (nM)
	0 mM β-CD	0,1 mM β-CD	0,2 mM β-CD	0 mM β-CD	0,1 mM β-CD	0,2 mM β-CD		
Wildtyp	280,4 ± 2,6	221,0 ± 3,7	184,5 ± 1,6	0,098 ± 0,003	0,077 ± 0,005	0,071 ± 0,002	1,40 ± 0,12	0,38 ± 0,02
W616A/W662A	247,2 ± 3,0	224,5 ± 1,6	212,6 ± 1,2	0,115 ± 0,005	0,104 ± 0,002	0,109 ± 0,002	1,26 ± 0,12	1,11 ±0,14
Y633A	316,2 ± 3,6	316,5 ± 6,1	317,2 ± 5,5	0,23 ± 0,01	0,35 ± 0,02	0,44 ± 0,03	0,98 ± 0,15	0,21 ± 0,04

Tabelle 19

Kinetische Eigenschaften, bestimmt gegenüber Rohstärke

Enzym	V_{max} (Einheiten/mg)	K_{50} (% RS)
Wildtyp	153,1 ± 4,8	18,4 ± 1,3
W616A/W662A	(153,1)	(42,5)
Y633A	159,5 ± 5,0	42,5 ± 2,7

Beispiel 4

Konstruktion von β- und γ-Cyclodextrin-herstellenden CGTase-Varinanten von Bacillus

[0252] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion von mehreren β- und γ-Cyclodextrin-herstellenden CGTase-Varianten, bei denen eine ortsgerichtete Mutagenese zu einer geänderten Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen in der Spalte des aktiven Zentrums geführt hat. Die Varianten sind von einer CGTase von Bacillus circulans Stamm 251 (d.h. dem Wildtyp-Enzym) abgeleitet, erhalten wie von Lawson et al. [Lawson C L, van Montfort R, Strokopytov B, Rozeboom H J, Kalk K H, de Vires G E, Penninga D, Dijkhuizen L und Dijkstra B W; J. Mol. Biol. 1994 236 590–600] beschrieben.

[0253] Die Mutationen wurden mit einem PCR-Verfahren unter Verwenden der VENT-DNA-Polymerase (New-England Biolabs, Beverly, MA, USA) eingeführt. Eine erste PCR-Reaktion wurde mit einem Mutagenese-Primer für den kodierenden Strang, plus einem Primer stromabwärts auf dem Template-Strang durchgeführt. Das Reaktionsprodukt wurde nachfolgend als Primer in einer zweiten PCR-Reaktion zusammen mit einem Primer stromaufwärts auf dem kodierenden Strang verwendet. Das Produkt der letzten Reaktion wurde mit PvuII und SalI geschnitten und durch das entsprechende Fragment (1200 Bp) des Vektors pDP66K ausgetauscht (vgl. Fig. 3). Das resultierende (mutierte) Plasmid wurde in E. coli MC1061-Zellen transformiert [Meissner P S, Sisk W P, Berman M L; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1978 84 4171–4175].

[0254] Die folgenden Oligonukleotide (Primer) wurden verwendet, um die Mutationen herzustellen:

N193G: 5'-GC ATC TAC AAG GGC CTG TAC GAT CTC G-3' (Dra II);

Y89G: 5'-GCA TCA TCA ATG GAT CCG GCG TAA AC-3' (Bam HI);

*145aI: 5'-CAT ACG TCG CCC GCT AGC ATT TCC GAC CAG CCT TCC-3' (Nhe I);

D371G: 5-'CG GGC GGG ACC GGT CCG GAC AAC CG-3' (Pin AI);

D371N: 5'-G TCG GGC GGT ACC AAT CCG GAC AAC C-3' (Kpn I); und

N326Q: 5'-CG TTC ATC GAT CAG CAT GAC ATG G-3' (Cla I).

[0255] Eine erfolgreiche Mutagenese ergab das Auftreten der unterstrichenen Restriktionsstellen, welches ein schnelles Screening nach potentiellen Mutanten ermöglichte.

[0256] Das Plasmid pDP66K, welches die richtige Restriktionsstelle trägt, wurde in E. coli DH5α-Zellen transformiert [Hanahan D; J. Mol. Biol. 1983 166 557]. Eine Bestimmung der DNA-Sequenz wurde anhand von supercoiled Plasmid-DNA unter Verwenden des Didesoxy-Kettenabbruchverfahrens [Sanger F, Coulson A R; J. Mol. Biol. 1975 94 441–448] und des T7-Sequenzierungs-Kits von Pharmacia-LKB Biotechnology, Schweden, durchgeführt.

[0257] Das Plasmid pDP66K, welches positiv charakterisierte mutierte cgt-Gene trägt, wurde in den B. subtilis Stamm DB104A transformiert [Smith H, de Jong A, Bron S, Venema G; Gene 1988 70 351–361]. Der Organismus wurde bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 4,5 in einem 5 l Kolben (für etwa 36 Stunden) wachsen gelassen. Unter diesen Bedingungen wurden hohe Spiegel an extrazellulärer CGTase hergestellt. Die Kultur wurde bei 4°C für 30 Minuten bei 10.000 × g zentrifugiert. Die CGTase-Varianten in den Kulturüberständen wur-

den weiter bis zur Homogenität durch Affinitätschromatographie unter Verwenden einer 30 ml α-Cyclodextrin-Sepharose-6FF-Säule (Pharmacia, Schweden) aufgereinigt [Sundberg L, Porath J; J. Chromatogr. 1974 90 87–98], mit einer maximalen Kapazität von 3,5 mg Protein pro ml. Nach einem Waschen mit 10 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5) wurde die gebundene CGTase mit dem gleichen Puffer, enthaltend 10 mg/ml α-Cyclodextrin, eluiert.

[0258] Die β-Cyclodextrin-Bildungsaktivität wurde bestimmt, indem eine passend verdünnte Enzymprobe (0,1 bis 0,2 Aktivitätseinheiten) für 3 Minuten bei 50°C inkubiert wurde. Paselli™ SA2 (5%-Lösung), teilweise hydrolysierte Kartoffelstärke mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 50 (AVEBE, Foxhol, Niederlande), wurde als Substrat verwendet. Das gebildete β-Cyclodextrin wurde, basierend auf seiner Fähigkeit, einen stabilen farblosen Einschlusskomplex mit Phenolphtalein zu bilden, bestimmt. Eine Aktivitätseinheit ist definiert als die Menge an Enzym, die in der Lage ist, 1 µmol β-Cyclodextrin pro Minute herzustellen.

[0259] Die Cyclodextrin-Bildungsaktivität wurde ebenfalls unter den Bedingungen eines Produktionsverfahrens gemessen. Zu diesem Zweck wurde 0,1 U/ml CGTase mit 10 Paselli™ WA4 (d.h. mit einem Düsenkocher gekochte („jet-cooked"), prä-gelatinierte, Trommel-getrocknete Stärke) in einem 10 mM Natriumcitratpuffer (pH 6,0) bei 50°C für 45 Minuten inkubiert. Die Proben wurden in regelmäßigen Zeitabständen gesammelt, 10-fach verdünnt, für 8 Min. gekocht und die gebildeten Produkte durch HPLC unter Verwenden einer 25 cm Econosphere-NH_2 5 Micronsäule (Alltech Associates Inc., USA), eluiert mit Acetonitril/Wasser (60/40 Vol/Vol) mit 1 ml pro Min., analysiert.

Ergebnisse

[0260] Die Varianten dieses Beispiels wurden entwickelt, um die β- und γ-Cyclodextrin-Bildung zu erhöhen. Die N193G-, Y89G-, D371G-, D371N- und die Y89G/N193G-CGTase-Varianten wurden alle mit der Absicht entwickelt, die Wechselwirkungen zwischen der Amylosekette und dem ersten Teil der Spalte des aktiven Zentrums (Subsites C bis G) herabzusetzen. Als Ergebnis würde die Amylosekette in der Lage sein, sich weiter in die Spalte des aktiven Zentrums zu bewegen, und dadurch das Verhältnis der Cyclodextrine in Richtung auf die β- und γ-Cyclodextrine zu ändern.

[0261] Die N193G-CGTase-Variante zeigt einen schnellen Anstieg an β-Cyclodextrin (Fig. 7 und Fig. 9). Als Ergebnis wird das Verhältnis bereits nach 5 Stunden Inkubation drastisch geändert (Tabelle 20) in Richtung auf α- und β-Cyclodextrin. Nach 45 Stunden (Tabelle 21) ist das Verhältnis jedoch in eine Bildung von lediglich α-Cyclodextrin verändert worden. Die Mutation scheint insbesondere für eine Kombination mit anderen Mutationen, z.B. D371G oder D371N, gut geeignet zu sein.

[0262] Die Y89G-CGTase-Variante ergibt eine geringe Änderung in Richtung auf β-Cyclodextrin nach 45 Stunden Inkubation auf Kosten von α-Cyclodextrin (vgl. Fig. 7 und Tabelle 21).

[0263] Die D371N- und D371G-CGTase-Varianten zeigen beide eine Verschiebung in Richtung auf die Bildung von längeren Cyclodextrinen (vgl. Fig. 8 und Tabelle 21). Der Anstieg von sowohl β- als auch γ-Cyclodextrin erfolgt auf Kosten von α-Cyclodextrin. Diese Verschiebung ist bei frühen Inkubationszeiten stärker ausgeprägt (vgl. Tabelle 20 und Fig. 10).

[0264] Die Y89G/N193G-CGTase-Doppelmutante resultierte in einer Verschiebung von β-Cyclodextrin zu sowohl α- als auch γ-Cyclodextrin (vgl. Tabelle 21). In Kombination mit anderen Mutationen, insbesondere D371G oder D371N, könnte diese zu einer einzelnen Verschiebung zu β-Cyclodextrin führen.

[0265] Die *145aI-CGTase-Variante wurde auf der Basis von Abgleich-Untersuchungen konstruiert. Die Insertionsmutation scheint besonders vorteilhaft zum Erhalten von β-Cyclodextrin-herstellenden CGTase-Varianten zu sein. Sowohl kurze Inkubationszeiten (vgl. Fig. 10 und Tabelle 20) als auch lange Inkubationszeiten (vgl. Fig. 8 und Tabelle 21) ergaben eine Verschiebung von β-Cyclodextrin zu sowohl α- als auch γ-Cyclodextrin. Diese Mutation scheint ebenfalls insbesondere für eine Kombination mit anderen Mutationen, z.B. D371G oder D371N, gut geeignet zu sein, um eine einzelne Verschiebung zu β-Cyclodextrin zu erhalten.

[0266] Die N326Q-CGTase-Variante wurde konstruiert und zeigte, eine Verschiebung von α-Cyclodextrin zu β- und γ-Cyclodextrin-Bildung zu bewirken (vgl. Tabelle 21).

[0267] Schließlich scheinen Kombinationen der obigen Mutationen direkt dazu zu führen, CGTase-Varianten mit einer erhöhten β- und/oder γ-Cyclodextrin-Bildung zu erhalten.

Tabelle 20

Verhältnis der Cyclodextrin-Bildung aus 10% Paselli™ WA4 (bei 50°C für 5 Stunden)

Enzym	Hergestellte Cyclodextrine (%)		
	α	β	γ
Wildtyp	7,4 ± 1,4	70,8 ± 1,8	21,8 ± 0,5
N193G	13,5 ± 0,2	57,5 ± 0,7	29,0 ± 0,8
Y89G	9,5 ± 1,2	72,4 ± 2,1	18,0 ± 1,0
*145aI	18,8 ± 1,2	46,3 ± 1,3	34,3 ± 1,5
D371G	2,4 ± 0,2	71,8 ± 1,6	25,9 ± 1,4

Tabelle 21

Verhältnis der Cyclodextrin-Bildung aus 10% Paselli™ WA4 (bei 50°C für 45 Stunden)

Enzym	Hergestellte Cyclodextrine (%)		
	α	β	γ
Wildtyp	14,4 ± 1,0	67,7 ± 0,7	18,0 ± 0,8
N193G	25,5 ± 0,1	60,4 ± 0,2	14,1 ± 0,4
Y89G	12,7 ± 0,3	69,3 ± 0,6	18,0 ± 0,3
*145aI	24,6 ± 0,5	53,5 ± 0,8	21,9 ± 0,7
D371G	4,4 ± 0,1	73,9 ± 0,1	21,7 ± 0,1
D371N	6,5 ± 0,5	73,4 ± 0,5	20,1 ± 0,4
N326Q	5,0 ± 0,1	75,4 ± 0,1	19,6 ± 0,2
Y89G/N193G	18,8 ± 0,6	53,8 ± 0,7	27,4 ± 0,3
N193G/Q148E	17,5 ± 0,5	60,9 ± 0,7	21,6 ± 0,8

Tabelle 22

Spezifische Aktivitäten einer anfänglichen Cyclisierung

Enzym	Cyclisierungs-Aktivität (U/mg)		
	α	β	γ
Wildtyp	2	280	53
*145aI		111	59
N193G		132	66
N326Q	3	63	14
D371N	25	108	30
D371G	7	81	29

Beispiel 5

Konstruktion von α-Cyclodextrin-herstellenden CGTase-Varianten von Thermoanaerobacter

[0268] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion von 24 α-Cyclodextrin-herstellenden CGTase-Varianten (A1 bis A24) bei welchen eine ortsgerichtete Mutagenese entweder zu einer geänderten Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen in den Subsites der aktiven Spalte oder, alternativ, zu einer sterischen Behinderung in Teilen der Substratbindungsspalte geführt hat.

[0269] Die Varianten sind von einer CGTase von Thermoanaerobacter sp. abgeleitet, die gemäß WO 89/03421 erhalten wurde, und besitzen die als SEQ ID NR: 1–2 dargestellten Nukleotid- und Aminosäuresequenzen (d.h. das Wildtyp-Enzym).

[0270] Die Mutationen wurden durch ein auf PCR basierendem Verfahren unter der Verwendung der PWO-Polymerase eingeführt. Für jede Mutation wurden spezifische Oligonukleotide (Primer) entwickelt. Die Mutationen wurden durch Restriktionsanalysen, wann immer dies möglich war, und durch Sequenzierung bestätigt. Die mutierten Proteine wurden entweder in Escherichia coli MC1061 [Meissner P S, Sisk W P, Berman M L; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987 84 4171–4175], oder in dem α-Amylase- und Protease-negativen Bacillus subtilis Stamm DB104A exprimiert [Smith H, de Jong A, Bron S, Venema G; Gene 1988 70 351–361]. Die Proteine wurden aus dem Medium unter Verwendung von Affinitätschromatographie (AfC) und/oder Anionenaustauschchromatographie (anionexchange-chromatography, AEC) aufgereinigt.

Enzym-Tests

[0271] Die enzymatische Aktivität wurde mittels einer leicht modifizierten Vorgehensewise des Phadebas-Amylase-Tests (Pharmacia) gemessen. Es wurden Phadebas-Tabletten (Phadebas™ Amylase Test, Pharmacia) als Substrat verwendet. Dieses Substrat ist ein quervernetztes, unlösliches, blauer Stärkepolymer, welches mit Rinderserumalbumin und einer Puffersubstanz gemischt ist. Nach einer Suspension in Wasser wird die Stärke durch das Enzym hydrolysiert, und wodurch blaue Fragmente erhalten werden. Die Bestimmung wird nach einer Inkubation bei 60°C, pH 6,2 in 0,15 nM Calcium für 15 Minuten durchgeführt. Das Absorbtionsmaß der sich ergebenden blauen Lösung, die bei 620 nm bestimmt wird, entspricht der enzymatischen Aktivität.

[0272] Die Enzymaktivität wird mit der eines Enzymstandards verglichen und die Aktivität wird in derselben Einheit ausgedrückt, wie der des Enzymstandards. Der Enzymstandard war Thermamyl™ (Novo Nordisk A/D, Dänemark), dessen amylolytische Aktivität unter Verwendung von Kartoffelstärke als Substrat bestimmt worden ist. Dieses Verfahren basiert auf der Spaltung von modifizierter Kartoffelstärke durch das Enzym und auf die Reaktion folgt eine Mischung der Proben der Stärke/Enzym-Lösung mit einer Jodlösung. Am Anfang wird eine schwärzlich-blaue Farbe gebildet, während der Spaltung der Stärke wird die blaue Farbe jedoch schwächer und verändert sich graduell in ein rötlich-braun, welches mit einem fargbigen Glasstandard verglichen

wird.

[0273] Ein Kilo Novo alfa Amylase-Einheit (Kilo Novo alfa Amylase Unit, KNU) ist definiert als die Menge an Enzym, die unter Standardbedingungen (d.h. bei 37°C +/– 0,05; 0,0003 M Ca^{2+}; und pH 5,6) 5,26 g Stärke-Trockensubstanz Merck Amylum löslich dextriniert ("dextrinizes"). Nachfolgend wird diese Aktivität in Novo Einheiten (Novo Units, NU) pro ml ausgedrückt.

[0274] Die CGTase-Aktivität wurde durch Inkubieren von verdünntem Enzym mit Substrat in 10 mM Natriumcitrat, pH 6,0 für 4 bis 10 Minuten bei 60°C bestimmt.

[0275] Die Cyclodextrin-Bildungsaktivität wurde unter Verwenden von 5% Paselli™ SA2 (d.h. teilweise hydrolysierte Kartoffelstärke mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 50, erhältlich von AVEBE, Foxhol, Niederlande) als Substrat bestimmt. Das gebildete α-Cyclodextrin wurde mit Methylorange bestimmt, das gebildete β-Cyclodextrin wurde mit Phenolphtalein bestimmt, und das gebildete γ-Cyclodextrin wurde mit Bromkresolgrün bestimmt. Die Aktivität wird in Einheiten pro mg (Units per mg, U/mg) ausgedrückt. Eine Einheit Enzymaktivität ist definiert als die Menge an Enzym, die in der Lage ist, ein µmol des spezifischen Cyclodextrins pro Minuten herzustellen.

[0276] Die Cyclodextrinbildung wurde ebenfalls unter herkömmlichen Bedingungen für industrielle Produktionsverfahren bestimmt. Eine vorgekochte 10% Amylopektinlösung in 0,5 mM $CaCl_2$ bei pH 5,5 wurde mit 50 NU CGTase pro Gramm Substrat bei 60°C und für 24 Stunden inkubiert. Es wurden regelmäßig Proben entnommen und für 10 Minuten bei einem pH von 2,5 bis 3 gekocht, vor einer Analyse durch HPLC.

[0277] Die Ergebnisse dieser Experimente werden diskutiert und dargestellt in den nachfolgenden Tabellen 23 bis 25. In Tabelle 25 stellen die Zahlen den Anteil bei einem maximalen Gesamtspiegel an Cyclodextrin dar.

Oligonukleotid-Primer

[0278] Die folgenden Oligonukleotide wurden synthetisiert, um die ortsgerichtete Mutagenese zu initiieren (die Zahlen zeigen die Positionen gemäß der CGTase-Nummerierung an):

A1: 143–151 (GRAGTNPG);

5'-AATCATACATCTGGACGAGCAGGTACCAACCCGACTTTGGGGAA-
AATGGTAC-3';

A2: 87–94 (IKYSG-VNN) + 143–151 (GRAGTNPG);
Bei Verwenden der B9-Variante (87–94 (IKYSG-VNN)),- beschrieben in dem nachfolgenden Beispiel 6, als Ausgangspunkt, wurden die 143–151(GRAGTNPG)-Mutationen unter Verwenden des A1-Primers eingeführt;
A3: F195Y + 143–151 (GRAGTNPG);
5'-TTACCGTAATTTATATGACTTAGCAG-3' wurde verwendet, um die F195Y-Mutation einzuführen und beim Verwenden dieser Variante als Ausgangspunkt, wurden die 87–94(IKYSG-VNN)-Mutationen unter Verwendung des A1-Primers eingeführt;
A4: F195Y + 87–94 (IKYSG-VNN) + 143–151 (GRAGTNPG);
Das Spe I-Bst X I-Fragment von A2 wurde mit dem CGTase-Gen ligiert, welches die F195Y-Mutation aufweist. Die F195Y wurde durch die Verwendung des A3-Primers eingeführt;
A5: P143G-A144R-S145W;

5'-ATCATACATCCGGACGATGGGAGACAGACCCTACC-3';

A6: 87–94 (INDSG-VNN);

5'-CATTTACGCAGTTATCAATGATTCCGGAGTTAACAATACATCCTATCATGG-3'

A7: 87–94 (INDSG-VNN) + 146–150 (SDQPS);
Bei Verwenden der A6-Variante (87–94 (INDSG-VNN) als Ausgangspunkt wurden die 146–150(SDQPS)-Mutationen unter Verwenden des Primers 5'-CTCCTGCATCATCTGATCAAC-CGTCCTTTGGGGAAAATGG-3' eingeführt;
A8: 143–148 (GRGPAA);

5'-CAAATCATACATCTGGACGAGGACCGGCCGCACCTACCTATGGGG-3';

A9: 143–148 (GRAPAA);

5'-CAAATCATACATCTGGACGAGCACCGGCCGCACCTACCTATGGGG-3';

A10: 143–148 (GRA**A);

5'-CAAATCATACATCTGGACGAGCAGCACCTACCTATGGGG-3';

A11: 143–148 (GRPAAA);

5'-CAAATCATACATCTGGACGACCTGCAGCAGCTCCTACCTATGGGG-3'

A12: G180S;

5'-CCATCATTACGGATCCACTAATTTTTCATC-3';

A13: A144R;

5'-CATACATCTCCTCGATCGGAGACAGACCC-3';

A14: P143A-A144R;

5'-CATACATCTGCTCGATCGGAGACAGACCC-3';

A15: G180N;

5'-CCATCATTACGGAAACACTAATTTTTCATC-3';

A16: G180D;

5'-CCATCATTACGGAGACACTAATTTTTCATC-3';

A17: G180N + P143G-A144R-S145W;
Bei Verwenden der A5 Variante (P143G-A144R-S145W) als Ausgangspunkt wurde die G180N-Mutation unter Verwenden des Primers 5'-CCATCATTACGGAAACACTAATTTTTCATC-3' eingeführt;
A18: G180D + P143G-A144R-S145W;
Bei Verwenden der A5-Variante (P143G-A144R-S145W) als Ausgangspunkt, wurde die G180N-Mutation unter Verwenden des Primers 5'-CCATCATTACGGAGACACTAATTTTTCATC-3' eingeführt;
A19: G179N;

5'-CCATCATTATAATGGAACTAATTTTTCATC-3';

A20: G179S;

5'-CCATCATTATAGTGGAACTAATTTTTCATC-3';

A21: G179D;

5'-CCATCATTATGATGGAACTAATTTTTCATC-3';

A22: G179N + P143G-A144R-S145W;
Bei Verwenden der A5-Variante (P143G-A144R-S145W) als Ausgangspunkt, wurde die G180N-Mutation unter Verwenden des Primers 5'-CCATCATTATAATGGAACTAATTTTTCATC-3' eingeführt;
A23: G179S + P143G-A144R-S145W;
Bei Verwenden der A5-Variante (P143G-A144R-S145W) als Ausgangspunkt, wurde die G180N-Mutation unter Verwenden des Primers 5'-CCATCATTATAGTGGAACTAATTTTTCATC-3' eingeführt; und
A24: G179D + P143G-A144R-S145W;
Bei Verwenden der A5-Variante (P143G-A144R-S145W) als Ausgangspunkt, wurde die G180N-Mutation unter Verwenden des Primers 5'-CCATCATTATGATGGAACTAATTTTTCATC-3' eingeführt.

Ergebnisse

[0279] Die Varianten dieses Beispiels wurden entwickelt, um die α-Cyclodextrin-Bildung zu erhöhen.

[0280] In dem Experiment A1 wurde der Loop an den Positionen 143 bis 151 durch (GRAGTNPG) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten I und J herabzusetzen (vgl. Fig. 1). Die Anfangsgeschwindigkeit von sowohl der β-CD-Bildung als auch der γ-CD-Bildung hat abgenommen. In dem CD-Herstellungs-Test hat der Anteil an α-CD zugenommen, während der β-CD-Anteil abgenommen hat.

[0281] In Experiment A2 wurde der Loop an den Positionen 87 bis 94 durch (IKYSG*VNN) ersetzt und gleichzeitig wurde der Loop an den Positionen 143 bis 151 durch (GRAGTNPG) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten E, F und H zu erhöhen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten I und J herabzusetzen (vgl. Fig. 1). Die Anfangsgeschwindigkeit von sowohl der β-CD-Bildung als auch der γ-CD-Bildung hat abgenommen.

[0282] In Experiment A3 wurde der Loop an den Positionen 143 bis 151 durch (GRAGTNPG) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten I und J herabzusetzen (vgl. Fig. 1). Gleichzeitig wurde der F195 durch 195Y ersetzt, um den Kontakt zwischen Enzym und Substrat herabzusetzen. Die Anfangsgeschwindigkeit von sowohl der β-CD-Bildung als auch der γ-CD-Bildung hat abgenommen. In dem CD-Herstellungs-Test hat der Anteil an α-CD zugenommen, während der β-CD-Anteil abgenommen hat.

[0283] In Experiment A4 wurde der Loop an den Positionen 87 bis 94 durch (IKYSG*VNN) ersetzt und gleichzeitig wurde der Loop an den Positionen 143 bis 151 durch (GRAGTNPG) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeiheiten E, F und H zu erhöhen und um die Wechelwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten I und J herabzusetzen (vgl. Fig. 1). Gleichzeitig wurde der F195 durch 195Y ersetzt, um den Kontakt zwischen Enzym und Substrat herabzusetzen. Die Anfangsgeschwindigkeit der β-CD-Bildung hat abgenommen. In dem CD-Herstellungs-Test hat der β-CD-Anteil abgenommen.

[0284] In Experiment A5 wurde die Region an den Positionen 143 bis 145 durch (GRW) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten I und J durch Bilden einer sterischen Behinderung herabzusetzen (vgl. Fig. 1). Die Anfangsgeschwindigkeit der α-CD-Bildung hat zugenommen, während die Anfangsgeschwindigkeit von sowohl der β-CD-Bildung als auch der γ-CD-Bildung abgenommen hat. In dem CD-Herstellungs-Test hat der Anteil an α-CD zugenommen, während der β-CD-Anteil abgenommen hat.

[0285] In Experiment A6 wurde der Loop an den Positionen 87 bis 94 durch (IKDSG*VNN) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten E und F zu erhöhen (vgl. Fig. 1).

[0286] In Experiment A7 wurde der Loop an den Positionen 87 bis 94 durch (IKDSG*VNN) ersetzt und gleichzeitig wurde der Loop an den Positionen 146 bis 150 durch (SDQPS) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten E und F zu erhöhen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten I und J herabzusetzen (vgl. Fig. 1).

[0287] In Experiment A8 wurde der Loop an den Positionen 143 bis 148 durch (GRGPAA) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten I und J herabzusetzen (vgl. Fig. 1).

[0288] In Experiment A9 wurde der Loop an den Positionen 143 bis 148 durch (GRAPAA) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten I und J herabzusetzen (vgl. Fig. 1).

[0289] In Experiment A10 wurde der Loop an den Positionen 143 bis 148 durch (GRA**AA) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten I und J herabzusetzen (vgl. Fig. 1).

[0290] In Experiment A11 wurde der Loop an den Positionen 143 bis 148 durch (GRW) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten I und J herabzusetzen (vgl. Fig. 1). Die Anfangsgeschwindigkeit

von sowohl der β-CD-Bildung als auch der γ-CD-Bildung hat abgenommen, signifikanter als die Anfangsgeschwindigkeit von der α-CD-Bildung, was ein erhöhtes Verhältnis zwischen der α-CD-Bildung und der β-CD-Bildung ergibt.

[0291] In Experiment A12 wurde G180 durch 1805 ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen (vgl. Fig. 1).

[0292] In Experiment A13 wurde A144 durch 144R ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen (vgl. Fig. 1).

[0293] In Experiment A14 wurde P143-A144 durch 143A-144R ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen (vgl. Fig. 1).

[0294] In Experiment A15 wurde G180 durch 180N ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen (vgl. Fig. 1).

[0295] In Experiment A16 wurde G180 durch 180D ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen (vgl. Fig. 1).

[0296] In Experiment A17 wurde G180 durch 180N ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen (vgl. Fig. 1). Gleichzeitig wurde die Region an den Positionen 143 bis 145 durch (GRW) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten I und J durch Bilden einer sterischen Behinderung herabzusetzen (vgl. Fig. 1).

[0297] In Experiment A18 wurde G180 durch 180D ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen (vgl. Fig. 1). Gleichzeitig wurde die Region an den Positionen 143 bis 145 durch (GRW) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten I und J durch Bilden einer sterischen Behinderung herabzusetzen (vgl. Fig. 1).

[0298] In Experiment A19 wurde G179 durch 179N ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen (vgl. Fig. 1).

[0299] In Experiment A20 wurde G179 durch 1795 ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen (vgl. Fig. 1).

[0300] In Experiment A21 wurde G179 durch 179D ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen (vgl. Fig. 1).

[0301] In Experiment A22 wurde G179 durch 179N ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen (vgl. Fig. 1). Gleichzeitig wurde die Region an den Positionen 143 bis 145 durch (GRW) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten I und J durch Bilden einer sterischen Behinderung herabzusetzen (vgl. Fig. 1).

[0302] In Experiment ABBE wurde G179 durch 179S ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen (vgl. Fig. 1). Gleichzeitig wurde die Region an den Positionen 143 bis 145 durch (GRW) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten I und J durch Bilden einer sterischen Behinderung herabzusetzen (vgl. Fig. 1).

[0303] In Experiment A24 wurde G179 durch 179D ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen (vgl. Fig. 1). Gleichzeitig wurde die Region an den Positionen 143 bis 145 durch (GRW) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H zu erhöhen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten I und J durch Bilden einer sterischen Behinderung herabzusetzen (vgl. Fig. 1).

Tabelle 23

Herstellung, Aufreinigung und Enzymaktivitäten von CGTasen

Enzym	Wirt	Aufreinigungsverfahren	Enzymaktivität (NU/mg)
Wildtyp	E. coli	AfC	1513
A1	E. coli	AfC	432
A2	E. coli	AfC	1009
A	E. coli	AfC	1404
A4	E. coli	AfC	1082
A5	E. coli	AfC + AEC	2100
A9	E. coli		
A10	E. coli		
A11	E. coli	AfC + AEC	2200

Tabelle 24

Spezifische Aktivitäten von α-, β- und γ-CD-bildenden CGTasen

Enzym	Cyclisierungsaktivität (U/mg)		
	α	β	γ
Wildtyp	39	49	40
A1		26	29
A2		32	36
A		24	26
A4		32	39
A5	43	27	27
A11	20	6	13

Tabelle 25

Verhältnis der Cyclodextrin-Bildung bei optimaler CD-Bildung

Enzym	Hergestelltes Cyclodextrin (%)		
	α	β	γ
Wildtyp	39	45	17
A1	42	38	20
A2	38	45	17
A	42	38	20
A4	39	41	20
A5	42	37	20

BEISPIEL 6

Konstruktion von β-Cyclodextrin-herstellenden CGTase-Varianten von Thermoanaerobacter

[0304] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion von 15 β-Cyclodextrin-herstellenden CGTase-Varianten (B1 bis B9), bei denen eine ortsgerichtete Mutagenese entweder zu einer geänderten Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen in den Substites der aktiven Spalte oder, alternativ, zu einer sterischen Behinderung in Teilen der Substratbindungsspalte geführt hat.

[0305] Die Varianten sind von einer CGTase von Thermoanaerobacter sp. abgeleitet, die gemäß WO 89/03421 erhalten wurde, und besitzen die als SEQ ID NR: 1–2 dargestellten Nukleotid- und Aminosäuresequenzen (d.h. das Wildtyp-Enzym).

[0306] Die Mutationen wurden durch ein Verfahren, das auf PCR basiert, unter Verwendung der PWO-Polymerase eingeführt. Für jede Mutation wurden spezifische Oligonukleotide (Primer) entwickelt. Die Mutationen wurden durch Restriktionsanalyse, wann immer dies möglich war, und durch Sequenzierung bestätigt. Die mutierten Proteine wurden entweder in Escherichia coli MC1061 [Meissner P S, Sisk W P, Berman M L; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987 84 4171–4175] oder in dem α-Amylase- und Protease-negativen Bacillus subtilis Stamm DB104A [Smith H, de Jong A, Bron S, Venema G; Gene 1988 70 351–361] exprimiert. Die Proteine wurden aus dem Medium unter Verwendung von Affinitätschromatographie (AfC) und/oder Anionenaustauschchromatographie (anion exchange chromatography, AEC) aufgereinigt.

Enzym-Tests

[0307] Die enzymatische Aktivität wurde mittels einer leicht modifizierten Vorgehensweise des Phadebas-Amylase-Tests (Pharmacia) gemessen. Es wurden Phadebas-Tabletten (Phadebas™ Amylase Test, Pharmacia) als Substrat verwendet. Dieses Substrat ist ein quervernetztes, unlösliches, blauer Stärkepolymer, welches mit Rinderserumalbumin und einer Puffersubstanz gemischt ist. Nach einer Suspension in Wasser wird die Stärke durch das Enzym hydrolysiert, und wodurch blaue Fragmente erhalten werden. Die Bestimmung wird nach einer Inkubation bei 60°C, pH 6,2 in 0,15 nM Calcium für 15 Minuten durchgeführt. Das Absorbtionsmaß der sich ergebenden blauen Lösung, die bei 620 nm bestimmt wird, entspricht der enzymatischen Aktivität.

[0308] Die Enzymaktivität wird mit der eines Enzymstandards verglichen und die Aktivität wird in derselben Einheit ausgedrückt, wie der des Enzymstandards. Der Enzymstandard war Thermamyl™ (Novo Nordisk A/D, Dänemark), dessen amylolytische Aktivität unter Verwendung von Kartoffelstärke als Substrat bestimmt worden ist. Dieses Verfahren basiert auf der Spaltung von modifizierter Kartoffelstärke durch das Enzym und auf die Reaktion folgt eine Mischung der Proben der Stärke/Enzym-Lösung mit einer Jodlösung. Am Anfang wird eine schwärzlich-blaue Farbe gebildet, während der Spaltung der Stärke wird die blaue Farbe jedoch schwächer und verändert sich graduell in ein rötlich-braun, welches mit einem fargbigen Glasstandard verglichen wird.

[0309] Ein Kilo Novo alfa Amylase-Einheit (Kilo Novo alfa Amylase Unit, KNU) ist definiert als die Menge an Enzym, die unter Standardbedingungen (d.h. bei 37°C +/– 0,05; 0,0003 M Ca^{2+}; und pH 5,6) 5,26 g Stärke-Trockensubstanz Merck Amylum löslich dextriniert ("dextrinizes"). Nachfolgend wird diese Aktivität in Novo Einheiten (Novo Units, NU) pro ml ausgedrückt.

[0310] Die CGTase-Aktivität wurde durch Inkubieren von verdünntem Enzym mit Substrat in 10 mM Natriumcitrat, pH 6,0 für 4 bis 10 Minuten bei 85°C bestimmt.

[0311] Die Cyclodextrin-Bildungsaktivität wurde unter Verwenden von 5% Paselli™ SA2 (d.h. teilweise hydrolysierte Kartoffelstärke mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 50, erhältlich von AVEBE, Foxhol, Niederlande) als Substrat bestimmt. Das gebildete α-Cyclodextrin wurde mit Methylorange bestimmt, das gebildete β-Cyclodextrin wurde mit Phenolphtalein bestimmt, und das gebildete γ-Cyclodextrin wurde mit Bromkresolgrün bestimmt. Die Aktivität wird in Einheiten pro mg (Units per mg, U/mg) ausgedrückt. Eine Einheit Enzymaktivität ist definiert als die Menge an Enzym, die in der Lage ist, ein µmol des spezifischen Cyclodextrins pro Minuten herzustellen.

[0312] Die Cyclodextrinbildung wurde ebenfalls unter herkömmlichen Bedingungen für industrielle Produktionsverfahren bestimmt. Eine vorgekochte 10% Amylopektinlösung in 0,5 mM $CaCl_2$ bei pH 5,5 wurde mit 50

NU CGTase pro Gramm Substrat bei 85°C und für 24 Stunden inkubiert. Es wurden regelmäßig Proben entnommen und für 10 Minuten bei einem pH von 2,5 bis 3 gekocht, vor einer Analyse durch HPLC.

[0313] Die Ergebnisse dieser Experimente werden diskutiert und dargestellt in den nachfolgenden Tabellen 26 bis 28. In Tabelle 28 stellen die Zahlen den Anteil bei einem maximalen Gesamtspiegel an Cyclodextrin dar.

Olinukleotid-Primer

[0314] Die folgenden Oligonukleotide wurden synthetisiert, um die ortsgerichtete Mutagenese zu initiieren (die Zahlen zeigen die Positionen gemäß der CGTase-Nummerierung an):

B1: S145A;

5'-CTCCTGCAGCTGAGACAGACCC-3';

B2: E146S;

5'-CTCCTGCATCGTCGACAGACCC-3';

B3: T147A;

5'-TCAGAGGCGGATCCTACCTATGG-3';

B4: T147L;

5'-TCAGAGCTCGACCCTACCTATGG-3';

B5: D148A;

5'-CAGAGACGGCGCCTACCTATGGGG-3';

B6: D89A;

5'-CGCAGTTTTGCCGGCTTCCAC-3';

B7: F91aA;

5'-TCCACTGCCGGCGGAAGCAC-3';

B8: F91a*;

5'-AGATTCTACCGGTGGAAGCAC-3';

B9: 87–94(IKYSG-VNN);

5'-TTTACGCAGTTATTAAATATTCCGGCGTTAACAACACATCCTATCATGG-3'.

Diese Variante wird ebenfalls in der Konstruktion von A2 aus dem obigen Beispiel 5 verwendet;
B10: F195Y + 87–94(IKYSG-VNN);
5'-TTACCGTAATTTATATGACTTAGCAG-3' wurde verwendet, um die F195Y-Mutation einzuführen. Beim Verwenden dieser Variante als Ausgangspunkt, wurden die 87–94(IKYSG-VNN)-Mutationen unter Verwenden des Primers B9 eingeführt.
Gleichzeitig wurde das F195 durch 195Y ersetzt, um den Kontakt zwischen Enzym und Substrat herabzusetzen;
B11: D196S;

5'-CGTAATTTATTCTCGCTAGCAGATTTAG-3';

B12: D196A;

5'-CGTAATTTATTCGCGCTAGCAGATTTAG-3';

B13: D371N;

5'-CAGGTAATGGTAACCCTTATAATAGAGC-3';

B14: D371G;

5'-CAGGTAATGGAGGGCCTTATAATAGAGC-3'; and

B15: D371A;

5'-CAGGTAATGGAGCGCCTTATAATAGAGC-3'.

Ergebnisse

[0315] Die Varianten dieses Beispiels wurden entwickelt, um die β-Cyclodextrin-Bildung zu erhöhen.

[0316] In Experiment B1 wurde S145 durch 145A ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit J herabzusetzen (vgl. Fig. 1). Die Anfangsgeschwindigkeit von sowohl der β-CD-Bildung als auch der γ-CD-Bildung hat zugenommen. In dem CD-Herstellungs-Test hat der Anteil an α-CD abgenommen, während der β-CD-Anteil zugenommen hat.

[0317] In Experiment B2 wurde E146 durch 146S ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit I zu erhöhen (vgl. Fig. 1). Die Anfangsgeschwindigkeit von sowohl der β-CD-Bildung als auch der γ-CD-Bildung hat zugenommen. In dem CD-Herstellungs-Test hat der Anteil an α-CD abgenommen.

[0318] In Experiment B3 wurde T147 durch 147A ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit J herabzusetzen (vgl. Fig. 1). In dem CD-Herstellungs-Test hat der Anteil an α-CD abgenommen, während der β-CD-Anteil zugenommen hat.

[0319] In Experiment B4 wurde T147 durch 147L ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit J herabzusetzen (vgl. Fig. 1). In dem CD-Herstellungs-Test hat der Anteil an α-CD abgenommen, während der β-CD-Anteil zugenommen hat.

[0320] In Experiment B5 wurde D148 durch 148A ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit J herabzusetzen (vgl. Fig. 1). In dem CD-Herstellungs-Test hat der Anteil an α-CD abgenommen, während der β-CD-Anteil zugenommen hat.

[0321] In Experiment B6 wurde D89 durch 89A ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit F herabzusetzen (vgl. Fig. 1). Die Anfangsgeschwindigkeit von sowohl der β-CD-Bildung als auch der γ-CD-Bildung hat abgenommen.

[0322] In Experiment B7 wurde Y91a durch 91aA ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit F herabzusetzen (vgl. Fig. 1). Die Anfangsgeschwindigkeit von sowohl der β-CD-Bildung als auch der γ-CD-Bildung hat abgenommen.

[0323] In Experiment B8 wurde Y91a durch Y91a* (deletiert) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit F herabzusetzen. Die Anfangsgeschwindigkeit von der β-CD-Bildung hat abgenommen.

[0324] In Experiment B9 wurde der Loop an Positionen 87 bis 94 durch (IKYSG * VNN) ersetzt, um die Kontakte zwischen dem Enzym und den Glucoseeinheiten E und F zu erhöhen (vgl. Fig. 1).

[0325] In Experiment B10 wurde 5'-TTACCGTAATTTATATGACTTAGCAG-3' verwendet, um die F195Y-Mutation einzuführen. Beim Verwenden dieser Variante als Ausgangspunkt wurden die 87-94 (IKYSG-VNN)-Mutationen unter Verwendung des Primers B9 eingeführt. Gleichzeitig wurde F195 durch 195Y ersetzt, um den Kontakt zwischen Enzym und Substrat herabzusetzen.

[0326] In Experiment B11 wurde D196 durch 196S ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit E und der Glucoseeinheit F herabzusetzen.

[0327] In Experiment B12 wurde D196 durch 196A ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit E und der Glucoseeinheit F herabzusetzen.

[0328] In Experiment BBB wurde D371 durch 371N ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit E und der Glucoseeinheit F herabzusetzen.

[0329] In Experiment B14 wurde D371 durch 371G ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit E und der Glucoseeinheit F herabzusetzen.

[0330] In Experiment B15 wurde D371 durch 371A ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit E und der Glucoseeinheit F herabzusetzen.

Tabelle 26

Herstellung, Aufreinigung und Enzymaktivitäten von CGTasen

Enzym	Wirt	Aufreinigungsverfahren	Enzymaktivität (NU/ml)
Wildtyp	Bacillus	AfC	1513
B1	Bacillus	AfC	1925
B2	Bacillus	AfC	2290
B3	Bacillus	AfC	1636
B4	Bacillus	AfC	1949
B5	Bacillus	AfC	1839
B6	E. coli	AfC	1908
B7	E. coli	AfC	1686
B8	E. coli	AfC	1212
B9	E. coli	AfC	1862

Tabelle 27

Spezifische Aktivitäten von α-, β- und γ-CD-bildenden CGTasen

Enzym	Cyclisierungsaktivität (U/mg)		
	α	β	γ
Wildtyp	39	131	96
B1		150	140
B2		140	120
B3		120	84
B4		110	97
B5		120	82
B6		101	84
B7		107	80
B8		118	97
B9		131	63

Tabelle 28

Verhältnis der Cyclodextrin-Bildung bei optimaler CD-Bildung

Enzym	Hergestelltes Cyclodextrin (%)		
	α	β	γ
Wildtyp	39	45	17
B1	35	49	16
B2	35	46	18
B3	35	48	16
B4	35	49	16
B5	35	49	16
B9	35	48	17

BEISPIEL 7

Konstruktion von β-Cyclodextrin-herstellenden CGTase-Varianten von Thermoanaerobacter

[0331] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion von 9 β-Cyclodextrin-herstellenden CGTase-Varianten (C1 bis C9), bei welchen eine ortsgerichtete Mutagenese entweder zu einer geänderten Anzahl von Wasserstoffbrückenbindungen in den Subsites der aktiven Spalte oder, alternativ, zu einer sterischen Behinderung in Teilen der Substratbindungsspalte geführt hat.

[0332] Die Varianten wurden von einer CGTase von Thermoanaerobacter sp. abgeleitet, die gemäß WO 89/03421 erhalten wurde, und besitzen die als SEQ ID NR: 1 bis 2 dargestellten Nukleotid- und Aminosäuresequenzen (d.h. das Wildtyp-Enzym).

[0333] Die Varianten wurden durch ein Verfahren, basierend auf „Unique Site Elimination" (USE), dem Protokoll des Anbieters (Stratagene®) folgend, eingeführt. Die einzige Restriktionsstelle BsaMI in dem Plasmid gegenüber dem CGTase-Gen wurde durch die Verwendung des Oligonukleotids 5'p-CACTGTTCCTTCGAACG-CGTAACCTTAAATACC-3' entfernt. In diesem Oligonukleotid zeigt „P" eine 5'-Phosphorylierung an, die für die Vorgehensweise erforderlich ist. Für jede Mutation wurden spezifische Oligonukleotide entwickelt. Die Mutationen wurden durch Restriktionsanalyse, wann immer dies möglich war, und durch Sequenzierung bestätigt. Die mutierten Proteine wurden entweder in Escherichia coli MC1061 [Meissner P S, Sisk W P, Berman M L; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987 84 4171 -4175] exprimiert. Die Proteine wurden aus dem Medium unter Verwenden von Affinitätschromatographie (AfC) aufgereinigt.

Enzym-Tests

[0334] Die enzymatische Aktivität wurde mittels einer leicht modifizierten Vorgehensweise des Phadebas-Amylase-Tests (Pharmacia) gemessen. Es wurden Phadebas-Tabletten (Phadebas™ Amylase Test, Pharmacia) als Substrat verwendet. Dieses Substrat ist ein quervernetztes, unlösliches, blauer Stärkepolymer, welches mit Rinderserumalbumin und einer Puffersubstanz gemischt ist. Nach einer Suspension in Wasser wird die Stärke durch das Enzym hydrolysiert, und wodurch blaue Fragmente erhalten werden. Die Bestimmung wird nach einer Inkubation bei 60°C, pH 6,2 in 0,15 nM Calcium für 15 Minuten durchgeführt. Das Absorbtionsmaß der sich ergebenden blauen Lösung, die bei 620 nm bestimmt wird, entspricht der enzymatischen Aktivität.

[0335] Die Enzymaktivität wird mit der eines Enzymstandards verglichen und die Aktivität wird in derselben Einheit ausgedrückt, wie der des Enzymstandards. Der Enzymstandard war Thermamyl™ (Novo Nordisk A/D, Dänemark), dessen amylolytische Aktivität unter Verwendung von Kartoffelstärke als Substrat bestimmt worden ist. Dieses Verfahren basiert auf der Spaltung von modifizierter Kartoffelstärke durch das Enzym und auf die Reaktion folgt eine Mischung der Proben der Stärke/Enzym-Lösung mit einer Jodlösung. Am Anfang wird

eine schwärzlich-blaue Farbe gebildet, während der Spaltung der Stärke wird die blaue Farbe jedoch schwächer und verändert sich graduell in ein rötlich-braun, welches mit einem fargbigen Glasstandard verglichen wird.

[0336] Ein Kilo Novo alfa Amylase-Einheit (Kilo Novo alfa Amylase Unit, KNU) ist definiert als die Menge an Enzym, die unter Standardbedingungen (d.h. bei 37°C +/– 0,05; 0,0003 M Ca^{2+}; und pH 5,6) 5,26 g Stärke-Trockensubstanz Merck Amylum löslich dextriniert ("dextrinizes"). Nachfolgend wird diese Aktivität in Novo Einheiten (Novo Units, NU) pro ml ausgedrückt.

[0337] Die CGTase-Aktivität wurde durch Inkubieren von verdünntem Enzym mit Substrat in 10 mM Natriumcitrat, pH 6,0 für 4 bis 10 Minuten bei 85°C bestimmt.

[0338] Die Cyclodextrin-Bildungsaktivität wurde unter Verwenden von 5% Paselli™ SA2 (d.h. teilweise hydrolysierte Kartoffelstärke mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von 50, erhältlich von AVEBE, Foxhol, Niederlande) als Substrat bestimmt. Das gebildete α-Cyclodextrin wurde mit Methylorange bestimmt, das gebildete β-Cyclodextrin wurde mit Phenolphtalein bestimmt, und das gebildete γ-Cyclodextrin wurde mit Bromkresolgrün bestimmt. Die Aktivität wird in Einheiten pro mg (Units per mg, U/mg) ausgedrückt. Eine Einheit Enzymaktivität ist definiert als die Menge an Enzym, die in der Lage ist, ein µmol des spezifischen Cyclodextrins pro Minuten herzustellen.

[0339] Die Cyclodextrinbildung wurde ebenfalls unter herkömmlichen Bedingungen für industrielle Produktionsverfahren bestimmt. Eine vorgekochte 10% Amylopektinlösung in 0,5 mM $CaCl_2$ bei pH 5,5 wurde mit 50 NU CGTase pro Gramm Substrat bei 60°C und für 24 Stunden inkubiert. Es wurden regelmäßig Proben entnommen und für 10 Minuten bei einem pH von 2,5 bis 3 gekocht, vor einer Analyse durch HPLC.

[0340] Die Ergebnisse dieser Experimente werden diskutiert und dargestellt in den nachfolgenden Tabellen 29 bis 31. In Tabelle 31 stellen die Zahlen den Anteil bei einem maximalen Gesamtspiegel an Cyclodextrin dar.

Oligonukleotid-Primer

[0341] Die folgenden Oligonukleotide wurden synthetisiert, um die ortsgerichtete Mutagenese zu initiieren (die Zahlen zeigen die Positionen gemäß der CGTase-Nmmerierung an):

C1: N193A;

5'P-TTACCGTGCACTATTTGACTTAGC-3';

C2: 146–150(SDQPS);

5'P-CTCCTGCATCATCTGATCAACCGTCCTTTGGGGAAAATGG-3';

C3: 145–148(AELA);

5'P-CATCTCCTGCAGCAGAGCTCGCACCTACCTATGGG-3';

C4: 145–148(AEWA);

5'P-CATCTCCTGCAGCAGAGTGGGCACCTACCTATGGG-3';

C5: 87–94(INYSG*VNN);

5'P-CATTTACGCAGTTATCAATTATTCCGGAGTTAACAATACATCCTA-TCATGG-3';

C6: 87–94(HP*SGY***);

5'P-CATTTACGCAGTTCATCCTTCCGGGTATACATCCTATCATGG-3';

C7: 145–148(LETN);

5'P-TACATCTCCTGCACTCGAGACAAATCCTACCTATGG-3';

C8: 87–94(HP*SGY***) + 145–148(LETN);
Die beiden als C6 und C7 aufgelisteten Primer wurden gleichzeitig verwendet;
C9: 87–94(INYSG*VNN) + 146–150(SDQPS);

[0342] Die beiden als C2 und C5 aufgelisteten Primer wurden gleichzeitig verwendet.

Ergebnisse

[0343] Die Varianten aus diesem Beispiel wurden entwickelt, um die β-Cyclodextrin-Bildung zu erhöhen.

[0344] In Experiment C1 wurde N193 durch 193A ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit H herabzusetzen. In dem CD-Herstellungs-Test hat der Anteil an α-CD abgenommen und der Anteil an β-CD hat zugenommen.

[0345] In Experiment C2 wurde die Region an den Positionen 146–150 durch (SDQPS) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit J herabzusetzen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit I zu erhöhen.

[0346] In Experiment C3 wurde die Region an den Positionen 145–148 durch (AELA) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit J herabzusetzen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit I zu erhöhen.

[0347] In Experiment C4 wurde die Region an den Positionen 145–148 durch (AEWA) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit J herabzusetzen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit I zu erhöhen.

[0348] In Experiment C5 wurde der Loop an den Positionen 87–94 durch (INYSG*VNN) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit E und der Glucoseeinheit F herabzusetzen.

[0349] In Experiment C6 wurde der Loop an den Positionen 87–94 durch (HP*SGY***) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit E und der Glucoseeinheit F herabzusetzen.

[0350] In Experiment C7 wurde die Region an den Positionen 145–148 durch (LETN) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit J herabzusetzen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit I zu erhöhen.

[0351] In Experiment C8 wurde der Loop an den Positionen 87–94 durch (HP*SGY***) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit E und der Glucoseeinheit F herabzusetzen. Gleichzeitig wurde die Region an den Positionen 145–148 durch (LETN) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit J herabzusetzen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit I zu erhöhen.

[0352] In dem Experiment C9 wurde der Loop an den Positionen 87–94 durch (INYSG*VNN) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit E und der Glucoseeinheit F herabzusetzen. Gleichzeitig wurde die Region an den Positionen 145–148 durch (SDQPS) ersetzt, um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit J herabzusetzen und um die Wechselwirkungen zwischen dem Enzym und der Glucoseeinheit I zu erhöhen.

Tabelle 29

Herstellung, Aufreinigung und Enzymaktivitäten von CGTasen

Enzym	Wirt	Aufreinigungsverfahren	Enzymaktivität (NU/ml)
Wildtyp	E. coli	AfC	1513
C1	E. coli	AfC	1643

Tabelle 30

Spezifische Aktivitäten von α-, β- und γ-CD-bildenden CGTasen

Enzym	Cyclisierungsaktivität (U/mg)		
	α	β	γ
Wildtyp	39	131	96
C1		102	90

Tabelle 31

Verhältnis der Cyclodextrin-Bildung bei optimaler CD-Bildung

Enzym	Hergestelltes Cyclodextrin (%)		
	α	β	γ
Wildtyp	39	45	17
C1	35	49	16

SEQUENZPROTOKOLL

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:
(A) LÄNGE: 2133 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANG: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: cDNA

(iv) ORIGINALQUELLE:
(A) ORGANISMUS: Thermoanaerobacter sp.
(B) STAMM: ATCC 53627

(ix) MERKMAL:
(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) ORT: 82..2130

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 1:

```
ATGAAGAAAA CGCTTAAACT TCTGTCGATT CTGTTGATAA CCATTGCTCT TCTTTTCAGC      60

TCAATTCCAT CCGTACCGGC A GCA CCG GAT ACT TCA GTT TCC AAT GTT GTC       111
                        Ala Pro Asp Thr Ser Val Ser Asn Val Val
                          1               5                  10
AAT TAT TCA ACA GAT GTA ATC TAC CAG ATA GTC ACA GAC CGT TTT TTA       159
Asn Tyr Ser Thr Asp Val Ile Tyr Gln Ile Val Thr Asp Arg Phe Leu
                 15                  20                  25

GAT GGG AAT CCC AGT AAT AAT CCA ACA GGC GAC TTA TAT GAC CCT ACC       207
Asp Gly Asn Pro Ser Asn Asn Pro Thr Gly Asp Leu Tyr Asp Pro Thr
             30                  35                  40

CAT ACT AGT TTA AAG AAA TAT TTT GGT GGC GAT TGG CAG GGT ATT ATT       255
His Thr Ser Leu Lys Lys Tyr Phe Gly Gly Asp Trp Gln Gly Ile Ile
         45                  50                  55

AAC AAA ATT AAT GAT GGT TAT CTT ACT GGT ATG GGA ATT ACA GCT ATA       303
Asn Lys Ile Asn Asp Gly Tyr Leu Thr Gly Met Gly Ile Thr Ala Ile
     60                  65                  70

TGG ATT TCG CAA CCT GTA GAA AAC ATT TAC GCA GTT TTG CCA GAT TCC       351
Trp Ile Ser Gln Pro Val Glu Asn Ile Tyr Ala Val Leu Pro Asp Ser
 75                  80                  85                  90

ACT TTT GGC GGA AGC ACA TCC TAT CAT GGT TAC TGG GCA CGA GAC TTC       399
Thr Phe Gly Gly Ser Thr Ser Tyr His Gly Tyr Trp Ala Arg Asp Phe
                 95                 100                 105

AAA AAG ACA AAT CCC TTT TTT GGA AGC TTT ACA GAT TTT CAA AAT CTC       447
Lys Lys Thr Asn Pro Phe Phe Gly Ser Phe Thr Asp Phe Gln Asn Leu
             110                 115                 120

ATA GCA ACA GCT CAT GCT CAC AAT ATA AAA GTT ATA ATA GAC TTT GCA       495
Ile Ala Thr Ala His Ala His Asn Ile Lys Val Ile Ile Asp Phe Ala
         125                 130                 135

CCA AAT CAT ACA TCT CCT GCA TCA GAG ACA GAC CCT ACC TAT GGG GAA       543
Pro Asn His Thr Ser Pro Ala Ser Glu Thr Asp Pro Thr Tyr Gly Glu
     140                 145                 150

AAT GGT AGA TTA TAT GAC AAT GGA GTA TTA CTT GGT GGT TAT ACC AAT       591
Asn Gly Arg Leu Tyr Asp Asn Gly Val Leu Leu Gly Gly Tyr Thr Asn
155                 160                 165                 170

GAT ACA AAT GGA TAT TTC CAT CAT TAT GGA GGA ACT AAT TTT TCA TCA       639
Asp Thr Asn Gly Tyr Phe His His Tyr Gly Gly Thr Asn Phe Ser Ser
                 175                 180                 185
```

```
TAT GAA GAT GGA ATT TAC CGT AAT TTA TTT GAC TTA GCA GAT TTA GAT        687
Tyr Glu Asp Gly Ile Tyr Arg Asn Leu Phe Asp Leu Ala Asp Leu Asp
            190                 195                 200

CAG CAG AAT AGC ACT ATT GAT TCA TAT TTA AAA GCG GCA ATT AAA CTA        735

Gln Gln Asn Ser Thr Ile Asp Ser Tyr Leu Lys Ala Ala Ile Lys Leu
        205                 210                 215

TGG TTA GAC ATG GGG ATT GAT GGT ATA CGC ATG GAT GCA GTC AAA CAC        783
Trp Leu Asp Met Gly Ile Asp Gly Ile Arg Met Asp Ala Val Lys His
    220                 225                 230

ATG GCA TTT GGA TGG CAA AAG AAC TTT ATG GAT TCT ATT TTA AGT TAT        831
Met Ala Phe Gly Trp Gln Lys Asn Phe Met Asp Ser Ile Leu Ser Tyr
235                 240                 245                 250

AGA CCA GTT TTT ACA TTT GGC GAG TGG TAC CTT GGA ACC AAT GAA GTA        879
Arg Pro Val Phe Thr Phe Gly Glu Trp Tyr Leu Gly Thr Asn Glu Val
                255                 260                 265

GAT CCT AAT AAT ACG TAT TTT GCA AAT GAA AGT GGT ATG AGC CTT CTT        927
Asp Pro Asn Asn Thr Tyr Phe Ala Asn Glu Ser Gly Met Ser Leu Leu
            270                 275                 280

GAT TTT AGA TTT GCT CAA AAA GTT CGT CAA GTA TTC AGA GAC AAT ACA        975
Asp Phe Arg Phe Ala Gln Lys Val Arg Gln Val Phe Arg Asp Asn Thr
        285                 290                 295

GAC ACT ATG TAT GGA CTT GAT TCG ATG ATT CAG TCT ACT GCA GCA GAT       1023
Asp Thr Met Tyr Gly Leu Asp Ser Met Ile Gln Ser Thr Ala Ala Asp
    300                 305                 310

TAT AAT TTC ATA AAT GAT ATG GTT ACA TTT ATA GAT AAT CAT GAC ATG       1071
Tyr Asn Phe Ile Asn Asp Met Val Thr Phe Ile Asp Asn His Asp Met
315                 320                 325                 330

GAC AGA TTT TAT ACA GGA GGC AGT ACA CGG CCT GTT GAG CAA GCG TTA       1119
Asp Arg Phe Tyr Thr Gly Gly Ser Thr Arg Pro Val Glu Gln Ala Leu
                335                 340                 345

GCA TTT ACT TTA ACT TCT CGC GGT GTA CCT GCT ATA TAT TAC GGT ACA       1167
Ala Phe Thr Leu Thr Ser Arg Gly Val Pro Ala Ile Tyr Tyr Gly Thr
            350                 355                 360

GAG CAA TAT ATG ACA GGT AAT GGA GAC CCT TAT AAT AGA GCT ATG ATG       1215
Glu Gln Tyr Met Thr Gly Asn Gly Asp Pro Tyr Asn Arg Ala Met Met
        365                 370                 375

ACG TCA TTT GAC ACC ACA ACG ACG GCA TAT AAT GTG ATA AAA AAG CTT       1263
Thr Ser Phe Asp Thr Thr Thr Thr Ala Tyr Asn Val Ile Lys Lys Leu
    380                 385                 390

GCT CCA CTG CGT AAA TCT AAC CCT GCA ATT GCT TAC GGT ACA CAA AAA       1311
Ala Pro Leu Arg Lys Ser Asn Pro Ala Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Lys
395                 400                 405                 410

CAG CGA TGG ATA AAT AAT GAT GTT TAC ATT TAT GAA AGA CAA TTT GGT       1359
Gln Arg Trp Ile Asn Asn Asp Val Tyr Ile Tyr Glu Arg Gln Phe Gly
                415                 420                 425

AAT AAC GTT GCT CTT GTT GCT ATT AAT CGT AAT CTT TCA ACG AGC TAT       1407
Asn Asn Val Ala Leu Val Ala Ile Asn Arg Asn Leu Ser Thr Ser Tyr
            430                 435                 440

TAC ATT ACC GGC TTG TAC ACC GCA TTG CCT GCG GGA ACA TAT TCT GAC       1455
Tyr Ile Thr Gly Leu Tyr Thr Ala Leu Pro Ala Gly Thr Tyr Ser Asp
        445                 450                 455

ATG CTT GGC GGA TTA TTA AAT GGC AGT AGT ATT ACA GTA TCT AGT AAT       1503
```

```
Met Leu Gly Gly Leu Leu Asn Gly Ser Ser Ile Thr Val Ser Ser Asn
    460                 465                 470

GGT TCT GTA ACA CCG TTT ACC CTT GCG CCT GGT GAA GTT GCA GTA TGG      1551
Gly Ser Val Thr Pro Phe Thr Leu Ala Pro Gly Glu Val Ala Val Trp
475                 480                 485                 490

CAG TAT GTC AGT ACA ACT AAT CCT CCA TTG ATA GGA CAT GTA GGA CCG      1599
Gln Tyr Val Ser Thr Thr Asn Pro Pro Leu Ile Gly His Val Gly Pro
                495                 500                 505

ACA ATG ACA AAG GCA GGG CAG ACT ATA ACC ATA GAT GGA AGG GGA TTT      1647
Thr Met Thr Lys Ala Gly Gln Thr Ile Thr Ile Asp Gly Arg Gly Phe
            510                 515                 520

GGC ACA ACA GCA GGT CAA GTA TTA TTT GGG ACA ACT CCT GCA ACT ATT      1695
Gly Thr Thr Ala Gly Gln Val Leu Phe Gly Thr Thr Pro Ala Thr Ile
        525                 530                 535

GTG TCA TGG GAA GAT ACT GAA GTA AAA GTA AAA GTT CCT GCT TTA ACT      1743
Val Ser Trp Glu Asp Thr Glu Val Lys Val Lys Val Pro Ala Leu Thr
    540                 545                 550

CCT GGA AAA TAT AAC ATT ACA TTA AAA ACA GCA TCA GGA GTT ACA AGC      1791
Pro Gly Lys Tyr Asn Ile Thr Leu Lys Thr Ala Ser Gly Val Thr Ser
555                 560                 565                 570

AAT AGC TAT AAC AAT ATC AAT GTT TTA ACG GGA AAT CAG GTA TGT GTT      1839
Asn Ser Tyr Asn Asn Ile Asn Val Leu Thr Gly Asn Gln Val Cys Val
                575                 580                 585

AGA TTT GTA GTA AAT AAT GCT ACA ACC GTG TGG GGA GAA AAT GTA TAT      1887
Arg Phe Val Val Asn Asn Ala Thr Thr Val Trp Gly Glu Asn Val Tyr
            590                 595                 600

CTT ACG GGC AAT GTA GCT GAA CTT GGC AAC TGG GAT ACA TCG AAG GCA      1935
Leu Thr Gly Asn Val Ala Glu Leu Gly Asn Trp Asp Thr Ser Lys Ala
        605                 610                 615

ATA GGA CCA ATG TTT AAC CAG GTT GTG TAT CAA TAT CCT ACG TGG TAT      1983
Ile Gly Pro Met Phe Asn Gln Val Val Tyr Gln Tyr Pro Thr Trp Tyr
    620                 625                 630

TAC GAT GTA AGT GTG CCT GCT GGT ACT ACT ATA GAG TTT AAG TTT ATA      2031
Tyr Asp Val Ser Val Pro Ala Gly Thr Thr Ile Glu Phe Lys Phe Ile
635                 640                 645                 650

AAG AAA AAT GGT AGT ACT GTA ACC TGG GAA GGT GGA TAC AAC CAC GTA      2079
Lys Lys Asn Gly Ser Thr Val Thr Trp Glu Gly Gly Tyr Asn His Val
                655                 660                 665

TAT ACT ACA CCC ACT TCT GGT ACA GCT ACT GTA ATT GTA GAC TGG CAA      2127
Tyr Thr Thr Pro Thr Ser Gly Thr Ala Thr Val Ile Val Asp Trp Gln
            670                 675                 680

CCG TGA                                                             2133
Pro
```

(2) INFORMATION FÜR SEQ ID NR: 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

(A) LÄNGE: 683 Aminosäuren

(B) TYP: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLTYP: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 2:

```
Ala Pro Asp Thr Ser Val Ser Asn Val Val Asn Tyr Ser Thr Asp Val
```

```
  1               5                  10                  15
Ile Tyr Gln Ile Val Thr Asp Arg Phe Leu Asp Gly Asn Pro Ser Asn
            20                  25                  30

Asn Pro Thr Gly Asp Leu Tyr Asp Pro Thr His Thr Ser Leu Lys Lys
        35                  40                  45

Tyr Phe Gly Gly Asp Trp Gln Gly Ile Ile Asn Lys Ile Asn Asp Gly
    50                  55                  60

Tyr Leu Thr Gly Met Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Ser Gln Pro Val
65                  70                  75                  80

Glu Asn Ile Tyr Ala Val Leu Pro Asp Ser Thr Phe Gly Gly Ser Thr
                85                  90                  95

Ser Tyr His Gly Tyr Trp Ala Arg Asp Phe Lys Lys Thr Asn Pro Phe
            100                 105                 110

Phe Gly Ser Phe Thr Asp Phe Gln Asn Leu Ile Ala Thr Ala His Ala
        115                 120                 125

His Asn Ile Lys Val Ile Ile Asp Phe Ala Pro Asn His Thr Ser Pro
    130                 135                 140

Ala Ser Glu Thr Asp Pro Thr Tyr Gly Glu Asn Gly Arg Leu Tyr Asp
145                 150                 155                 160

Asn Gly Val Leu Leu Gly Gly Tyr Thr Asn Asp Thr Asn Gly Tyr Phe
                165                 170                 175

His His Tyr Gly Gly Thr Asn Phe Ser Ser Tyr Glu Asp Gly Ile Tyr
            180                 185                 190

Arg Asn Leu Phe Asp Leu Ala Asp Leu Asp Gln Gln Asn Ser Thr Ile
        195                 200                 205

Asp Ser Tyr Leu Lys Ala Ala Ile Lys Leu Trp Leu Asp Met Gly Ile
    210                 215                 220

Asp Gly Ile Arg Met Asp Ala Val Lys His Met Ala Phe Gly Trp Gln
225                 230                 235                 240

Lys Asn Phe Met Asp Ser Ile Leu Ser Tyr Arg Pro Val Phe Thr Phe
                245                 250                 255

Gly Glu Trp Tyr Leu Gly Thr Asn Glu Val Asp Pro Asn Asn Thr Tyr
            260                 265                 270

Phe Ala Asn Glu Ser Gly Met Ser Leu Leu Asp Phe Arg Phe Ala Gln
        275                 280                 285

Lys Val Arg Gln Val Phe Arg Asp Asn Thr Asp Thr Met Tyr Gly Leu
    290                 295                 300

Asp Ser Met Ile Gln Ser Thr Ala Ala Asp Tyr Asn Phe Ile Asn Asp
305                 310                 315                 320

Met Val Thr Phe Ile Asp Asn His Asp Met Asp Arg Phe Tyr Thr Gly
                325                 330                 335

Gly Ser Thr Arg Pro Val Glu Gln Ala Leu Ala Phe Thr Leu Thr Ser
            340                 345                 350

Arg Gly Val Pro Ala Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Met Thr Gly
        355                 360                 365

Asn Gly Asp Pro Tyr Asn Arg Ala Met Met Thr Ser Phe Asp Thr Thr
    370                 375                 380
```

```
Thr Thr Ala Tyr Asn Val Ile Lys Lys Leu Ala Pro Leu Arg Lys Ser
385                 390                 395                 400

Asn Pro Ala Ile Ala Tyr Gly Thr Gln Lys Gln Arg Trp Ile Asn Asn
                405                 410                 415

Asp Val Tyr Ile Tyr Glu Arg Gln Phe Gly Asn Asn Val Ala Leu Val
            420                 425                 430

Ala Ile Asn Arg Asn Leu Ser Thr Ser Tyr Tyr Ile Thr Gly Leu Tyr
        435                 440                 445

Thr Ala Leu Pro Ala Gly Thr Tyr Ser Asp Met Leu Gly Gly Leu Leu
    450                 455                 460

Asn Gly Ser Ser Ile Thr Val Ser Ser Asn Gly Ser Val Thr Pro Phe
465                 470                 475                 480

Thr Leu Ala Pro Gly Glu Val Ala Val Trp Gln Tyr Val Ser Thr Thr
                485                 490                 495

Asn Pro Pro Leu Ile Gly His Val Gly Pro Thr Met Thr Lys Ala Gly
            500                 505                 510

Gln Thr Ile Thr Ile Asp Gly Arg Gly Phe Gly Thr Thr Ala Gly Gln
        515                 520                 525

Val Leu Phe Gly Thr Thr Pro Ala Thr Ile Val Ser Trp Glu Asp Thr
    530                 535                 540

Glu Val Lys Val Lys Val Pro Ala Leu Thr Pro Gly Lys Tyr Asn Ile
545                 550                 555                 560

Thr Leu Lys Thr Ala Ser Gly Val Thr Ser Asn Ser Tyr Asn Asn Ile
                565                 570                 575

Asn Val Leu Thr Gly Asn Gln Val Cys Val Arg Phe Val Val Asn Asn
            580                 585                 590

Ala Thr Thr Val Trp Gly Glu Asn Val Tyr Leu Thr Gly Asn Val Ala
        595                 600                 605

Glu Leu Gly Asn Trp Asp Thr Ser Lys Ala Ile Gly Pro Met Phe Asn
    610                 615                 620

Gln Val Val Tyr Gln Tyr Pro Thr Trp Tyr Tyr Asp Val Ser Val Pro
625                 630                 635                 640

Ala Gly Thr Thr Ile Glu Phe Lys Phe Ile Lys Lys Asn Gly Ser Thr
                645                 650                 655

Val Thr Trp Glu Gly Gly Tyr Asn His Val Tyr Thr Thr Pro Thr Ser
            660                 665                 670

Gly Thr Ala Thr Val Ile Val Asp Trp Gln Pro
        675                 680
```

Patentansprüche

1. Verfahren zum Modifizieren der Substratbindung eines Vorläufer-CGTase-Enzyms, welches Verfahren eine Substitution, Insertion und/oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäurerest(en) des Vorläufer-Enzyms umfasst, welche(r) Aminosäurerest(e) eine Position einnimmt bzw. einnehmen, welche den Positionen in Tabelle 1, CGTase-Nummerierung, entspricht; wobei das modifizierte CGTase-Enzym an Position 185 einen Argininrest (X185R) oder einen Glutaminsäurerest (X185E) oder einen Asparaginsäurerest (X185D) aufweist; oder
an Position 186 einen Alaninrest (X186A) aufweist; oder
an Position 196 einen Alaninrest (X196A) oder einen Leucinrest (X196L) aufweist; oder
an Position 232 einen Glutaminrest (X232Q) oder einen Asparaginrest (X232N) oder einen Alaninrest (X232A) oder einen Leucinrest (X232L) aufweist; oder

an Position 264 einen Alaninrest (X264A) oder einen Asparaginrest (X264N) oder einen Leucinrest (X264L) aufweist; oder
welches modifizierte CGTase-Enzym an Position 268 einen Alaninrest (X268A) aufweist; oder an Position 371 einen Glycinrest (X371G) oder einen Asparaginrest (X371N) oder einen Alaninrest (X371A) oder einen Leucinrest (X371L) oder einen Glutaminsäurerest (X371E) aufweist; oder
an Position 375 einen Glycinrest (X375G) oder einen Glutaminrest (X375Q) oder einen Asparaginrest (X375N) oder einen Alaninrest (X375A) oder einen Leucinrest (X375L) aufweist; oder an Position 599a (z.B. über Insertion) einen Prolinrest (X599aP oder *599aP) oder einen Argininrest (X599aR oder *599aR) oder einen Histidinrest (X599aH oder *599aH) aufweist; oder an Position 616 einen Alaninrest (X616A) aufweist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die CGTase von einem Stamm von Bacillus, einem Stamm von Brevibacterium, einem Stamm von Clostridium, einem Stamm von Corynebacterium, einem Stamm von Klebsiella, einem Stamm von Micrococcus, einem Stamm von Thermoanaerobium, einem Stamm von Thermoanaerobacterium, einem Stamm von Thermoanaerobacter oder einem Stamm von Thermoactinomyces abgeleitet ist.

3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die CGTase von einem Stamm von Bacillus autolyticus, einem Stamm von Bacillus cereus, einem Stamm von Bacillus circulans, einem Stamm von Bacillus circulans var. alkalophilus, einem Stamm von Bacillus coagulans, einem Stamm von Bacillus firmus, einem Stamm von Bacillus halophilus, einem Stamm von Bacillus macerans, einem Stamm von Bacillus megaterium, einem Stamm von Bacillus ohbensis, einem Stamm von Bacillus stearothermophilus oder einem Stamm von Bacillus subtilis abgeleitet ist.

4. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die CGTase von dem Stamm Bacillus sp. Stamm 1011, dem Stamm Bacillus sp. Stamm 38-2, dem Stamm Bacillus sp. Stamm 17-1, dem Stamm Bacillus sp. 1-1, dem Stamm Bacillus sp. Stamm B1018, dem Stamm Bacillus circulans Stamm 8 oder dem Stamm Bacillus circulans Stamm 251 oder einer Mutante oder Variante davon abgeleitet ist.

5. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die CGTase von einem Stamm von Klebsiella pneumonia, einem Stamm von Thermoanaerobacter ethanolicus, einem Stamm von Thermoanaerobacter finnii, einem Stamm von Clostridium thermoamylolyticum, einem Stamm von Clostridium thermosaccharolyticum oder einem Stamm von Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes abgeleitet ist.

6. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die CGTase von dem Stamm Bacillus circulans Stamm 251 abgeleitet ist.

7. Verfahren nach Anspruch 2, wobei die CGTase von dem Stamm Thermoanaerobacter sp. ATCC 53627 abgeleitet ist.

8. CGTase-Variante, welche von einem Vorläufer-CGTase-Enzym durch Substitution, Insertion und/oder Deletion von einem oder mehreren Aminosäurerest(en) abgeleitet ist, welche(r) Aminosäurerest(e) eine Position einnimmt bzw. einnehmen, welche den Positionen in Tabelle 1, CGTase-Variante, entspricht; wobei die CGTase-Variante an Position 185 einen Argininrest (X185R) oder einen Glutaminsäurerest (X185E) oder einen Asparaginsäurerest (X185D) aufweist; oder
an Position 186 einen Alaninrest (X186A) aufweist; oder
an Position 196 einen Alaninrest (X196A) oder einen Leucinrest (X196L) aufweist; oder
an Position 232 einen Glutaminrest (X232Q) oder einen Asparaginrest (X232N) oder einen Alaninrest (X232A) oder einen Leucinrest (X232L) aufweist; oder
an Position 264 einen Alaninrest (X264A) oder einen Asparaginrest (X264N) oder einen Leucinrest (X264L) aufweist; oder
an Position 371 einen Glycinrest (X371G) oder einen Asparaginrest (X371N) oder einen Alaninrest (X371A) oder einen Leucinrest (X371L) oder einen Glutaminsäurerest (X371E) aufweist; oder
an Position 375 einen Glycinrest (X375G) oder einen Glutaminrest (X375Q) oder einen Asparaginrest (X375N) oder einen Alaninrest (X375A) oder einen Leucinrest (X375L) aufweist; oder
an Position 599a (z.B. über Insertion) einen Prolinrest (X599aP oder *599aP) oder einen Argininrest (X599aR oder *599aR) oder einen Histidinrest (X599aH oder *599aH) aufweist; oder an Position 616 einen Alaninrest (X616A) aufweist.

9. CGTase-Variante nach Anspruch 8, welche von einem Stamm von Bacillus, einem Stamm von Brevibacterium, einem Stamm von Clostridium, einem Stamm von Corynebacterium, einem Stamm von Klebsiella, einem Stamm von Micrococcus, einem Stamm von Thermoanaerobium, einem Stamm von Thermoanaerobac-

terium, einem Stamm von Thermoanaerobacter oder einem Stamm von Thermoactinomyces abgeleitet ist.

10. CGTase-Variante nach Anspruch 9, welche von einem Stamm von Bacillus autolyticus, einem Stamm von Bacillus cereus, einem Stamm von Bacillus circulans, einem Stamm von Bacillus circulans var. alkalophilus, einem Stamm von Bacillus coagulans, einem Stamm von Bacillus firmus, einem Stamm von Bacillus halophilus, einem Stamm von Bacillus macerans, einem Stamm von Bacillus megaterium, einem Stamm von Bacillus ohbensis, einem Stamm von Bacillus stearothermophilus oder einem Stamm von Bacillus subtilis abgeleitet ist.

11. CGTase-Variante nach Anspruch 9, welche von dem Stamm Bacillus sp. Stamm 1011, dem Stamm Bacillus sp. Stamm 38-2, dem Stamm Bacillus sp. Stamm 17-1, dem Stamm Bacillus sp. 1-1, dem Stamm Bacillus sp. Stamm B1018, dem Stamm Bacillus circulans Stamm 8 oder dem Stamm Bacillus circulans Stamm 251 oder einer Mutante oder Variante davon abgeleitet ist.

12. CGTase-Variante nach Anspruch 9, welche von dem Stamm Bacillus circulans Stamm 251 abgeleitet ist.

13. CGTase-Variante nach Anspruch 9, welche von einem Stamm von Klebsiella pneumonia, einem Stamm von Thermoanaerobacter ethanolicus, einem Stamm von Thermoanaerobacter finnii, einem Stamm von Clostridium thermoamylolyticum, einem Stamm von Clostridium thermosaccharolyticum oder einem Stamm von Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes abgeleitet ist.

14. CGTase-Variante nach Anspruch 9, welche von dem Stamm Thermoanaerobacter sp. ATCC 53627 abgeleitet ist.

15. DNA-Konstrukt, welches eine CGTase-Variante nach einem der Ansprüche 8–14 kodiert.

16. Rekombinanter Expressionsvektor, welcher das DNA-Konstrukt nach Anspruch 15 umfasst.

17. Wirtszelle, welche ein DNA-Konstrukt nach Anspruch 15 oder den rekombinanten Expressionsvektor nach Anspruch 16 umfasst.

18. Verfahren zum Herstellen einer CGTase-Variante nach einem der Ansprüche 8–14, welches Verfahren umfasst, die Zelle nach Anspruch 17 unter Bedingungen, die die Produktion der CGTase-Variante erlauben, zu kultivieren und das Enzym aus der Kultur zu gewinnen.

19. Verwendung einer CGTase-Variante nach einem der Ansprüche 8–14 in einem Verfahren für die Herstellung von Cyclodextrinen.

20. Verwendung der CGTase-Variante nach Anspruch 19 in einem Verfahren zur Herstellung von α-, β- und γ-Cyclodextrinen oder Mischungen davon.

21. Verwendung der CGTase-Variante nach Anspruch 19 in einem Verfahren zur Herstellung von δ-, ε- und ζ-Cyclodextrinen oder Mischungen davon.

22. Verwendung einer CGTase-Variante nach einem der Ansprüche 8–14 in einem Verfahren zur Herstellung von linearen Oligosacchariden.

23. Verwendung einer CGTase-Variante nach einem der Ansprüche 8–14 in einem Verfahren zur in situ-Erzeugung von Cyclodextrinen.

24. Verwendung der CGTase-Variante nach Anspruch 23 in einem Verfahren für die Herstellung eines gebackenen Erzeugnisses.

25. Verwendung der CGTase-Variante nach Anspruch 23 in einem Verfahren zur Stabilisierung von chemischen Erzeugnissen während deren Herstellung.

26. Verwendung einer CGTase-Variante nach einem der Ansprüche 7–14 in einem Verfahren zur in situ-Erzeugung von linearen Oligosacchariden.

Es folgen 10 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

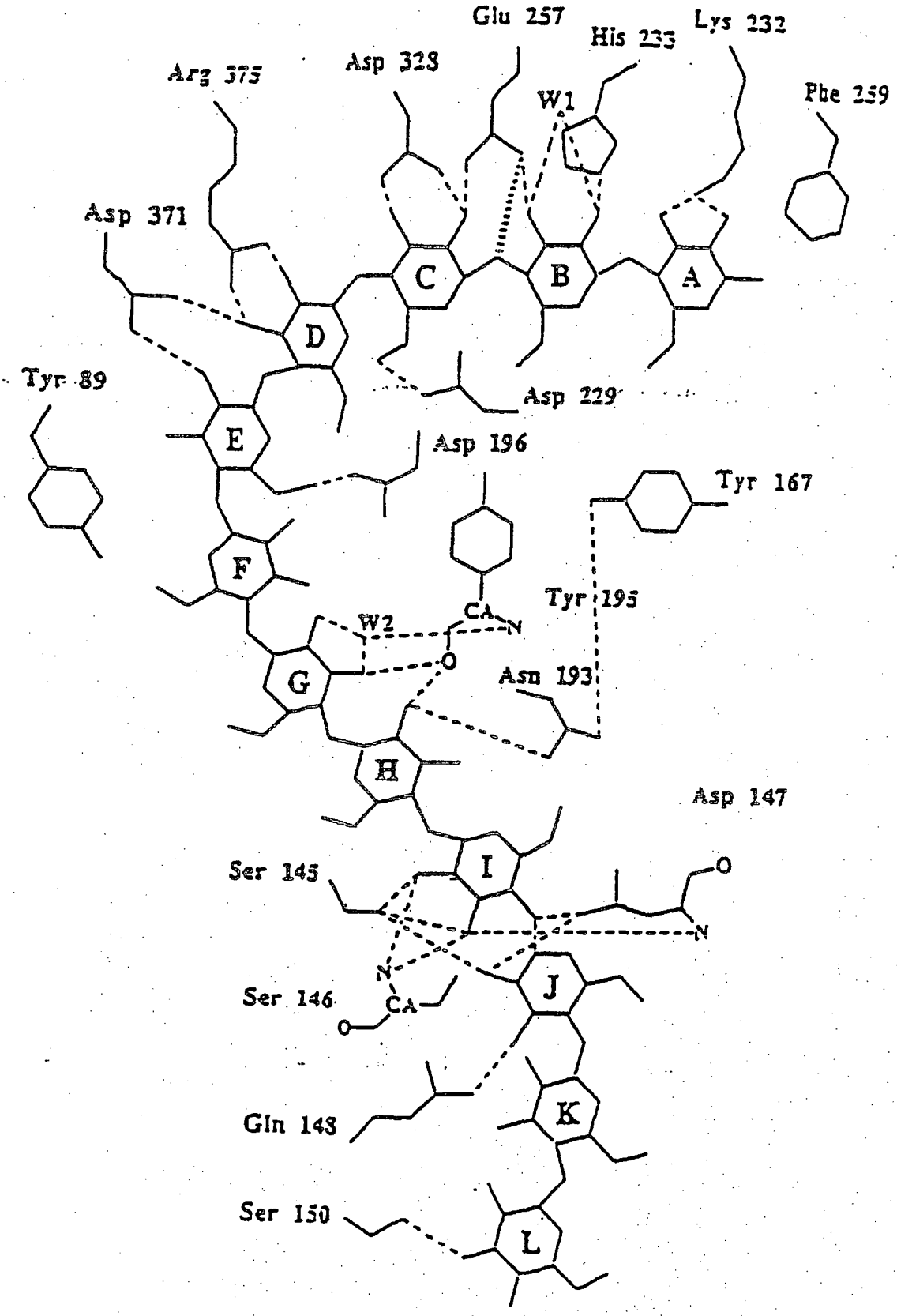

FIG. 1

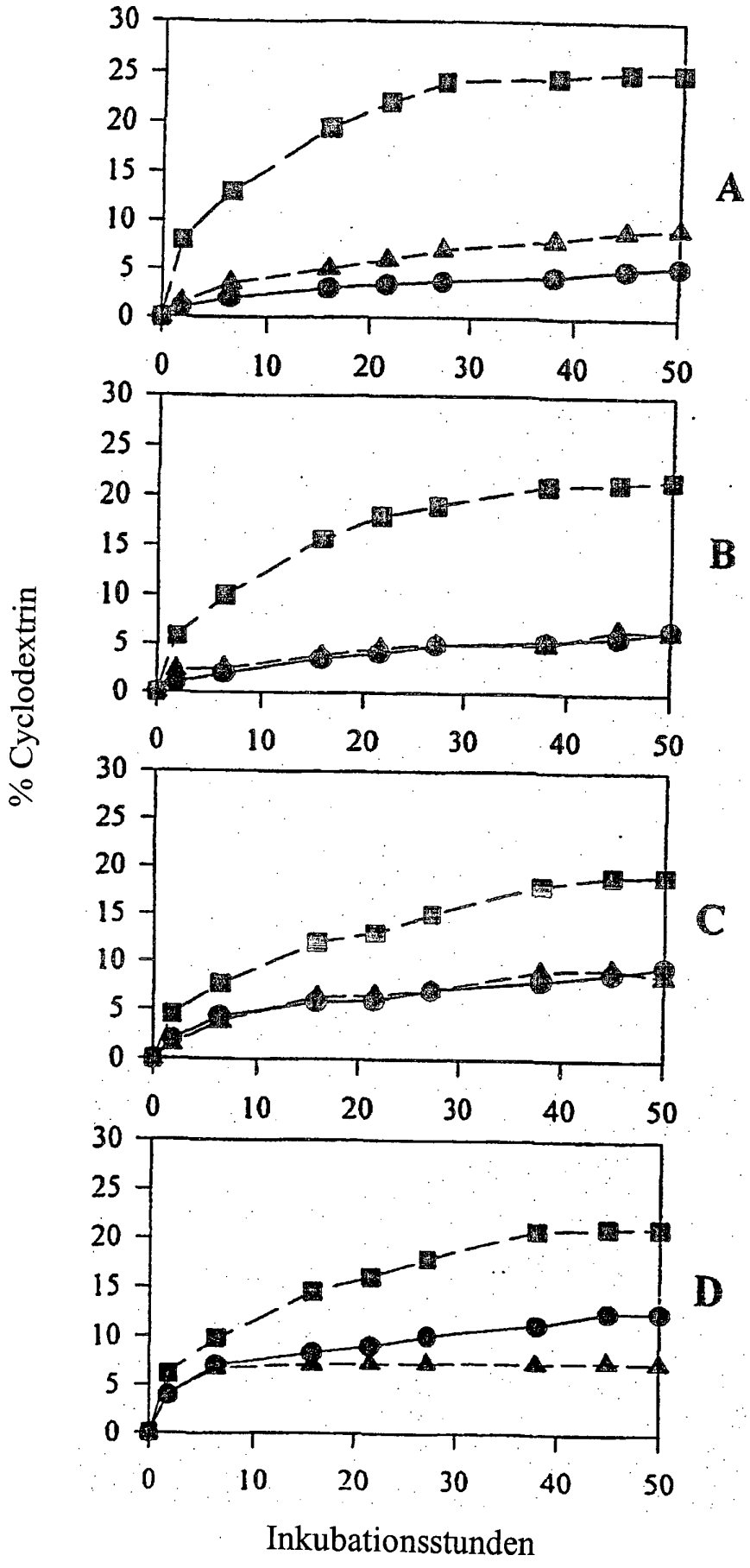
% Cyclodextrin
A
B
C
D
0
5
10
15
20
25
30
0
10
20
30
40
50
Inkubationsstunden

FIG. 2

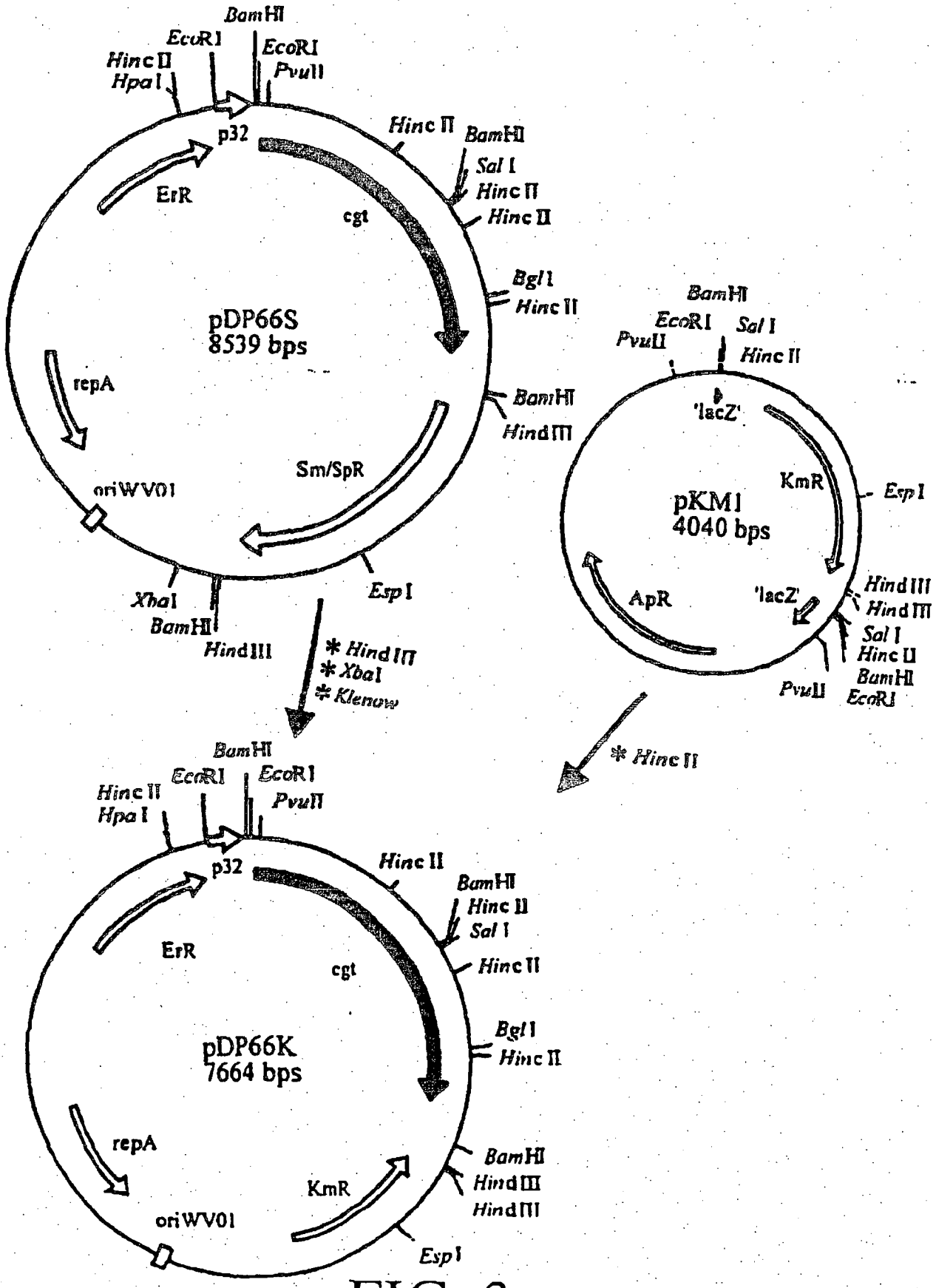
BamHI
EcoRI
HincII
HpaI
EcoRI
PvuII
p32
ErR
cgt
HincII
BamHI
SalI
HincII
HincII
BglI
HincII
pDP66S
8539 bps
repA
BamHI
HindIII
Sm/SpR
oriWV01
XbaI
BamHI
HindIII
EspI
*HindIII
*XbaI
*Klenow
BamHI
EcoRI
SalI
PvuII
HincII
'lacZ'
KmR
EspI
pKM1
4040 bps
ApR
'lacZ'
HindIII
HindIII
SalI
HincII
BamHI
PvuII
EcoRI
*HincII
BamHI
EcoRI
EcoRI
HincII
HpaI
PvuII
p32
ErR
cgt
HincII
BamHI
HincII
SalI
HincII
BglI
HincII
pDP66K
7664 bps
repA
KmR
BamHI
HindIII
HindIII
oriWV01
EspI

FIG. 3

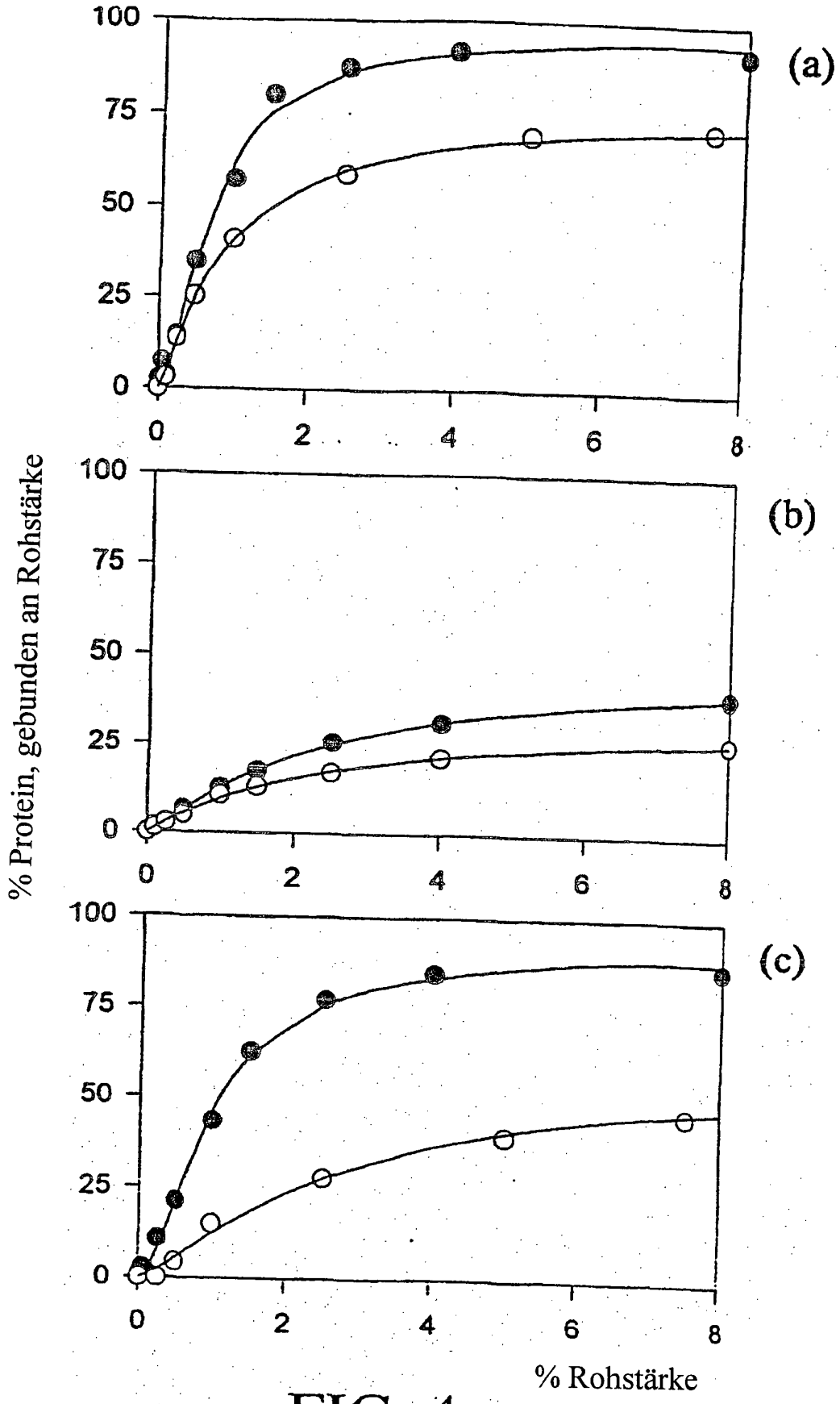
100
75
50
25
0
0
2
4
6
8
(a)
(b)
(c)
% Protein, gebunden an Rohstärke
% Rohstärke

FIG. 4

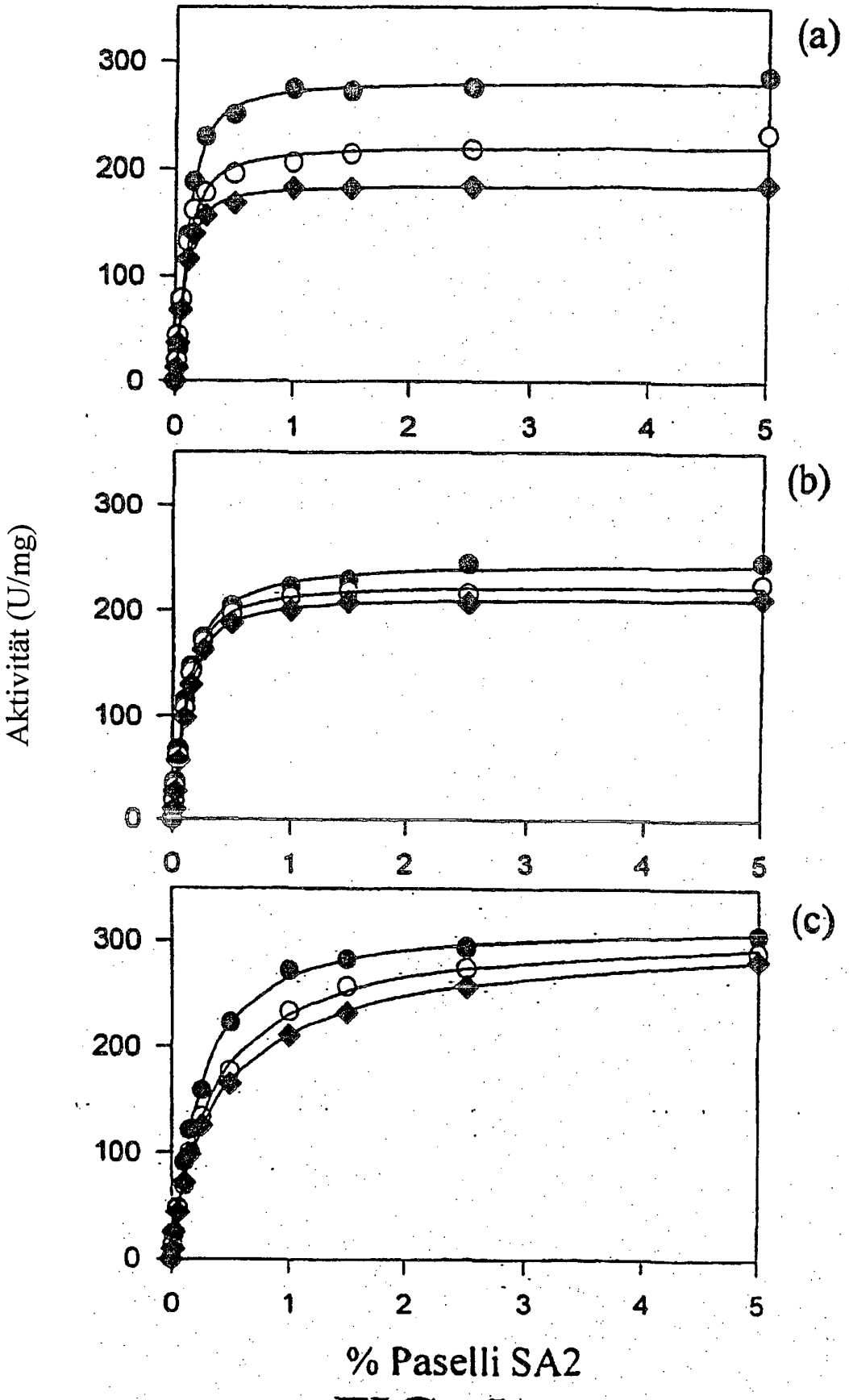

FIG. 5

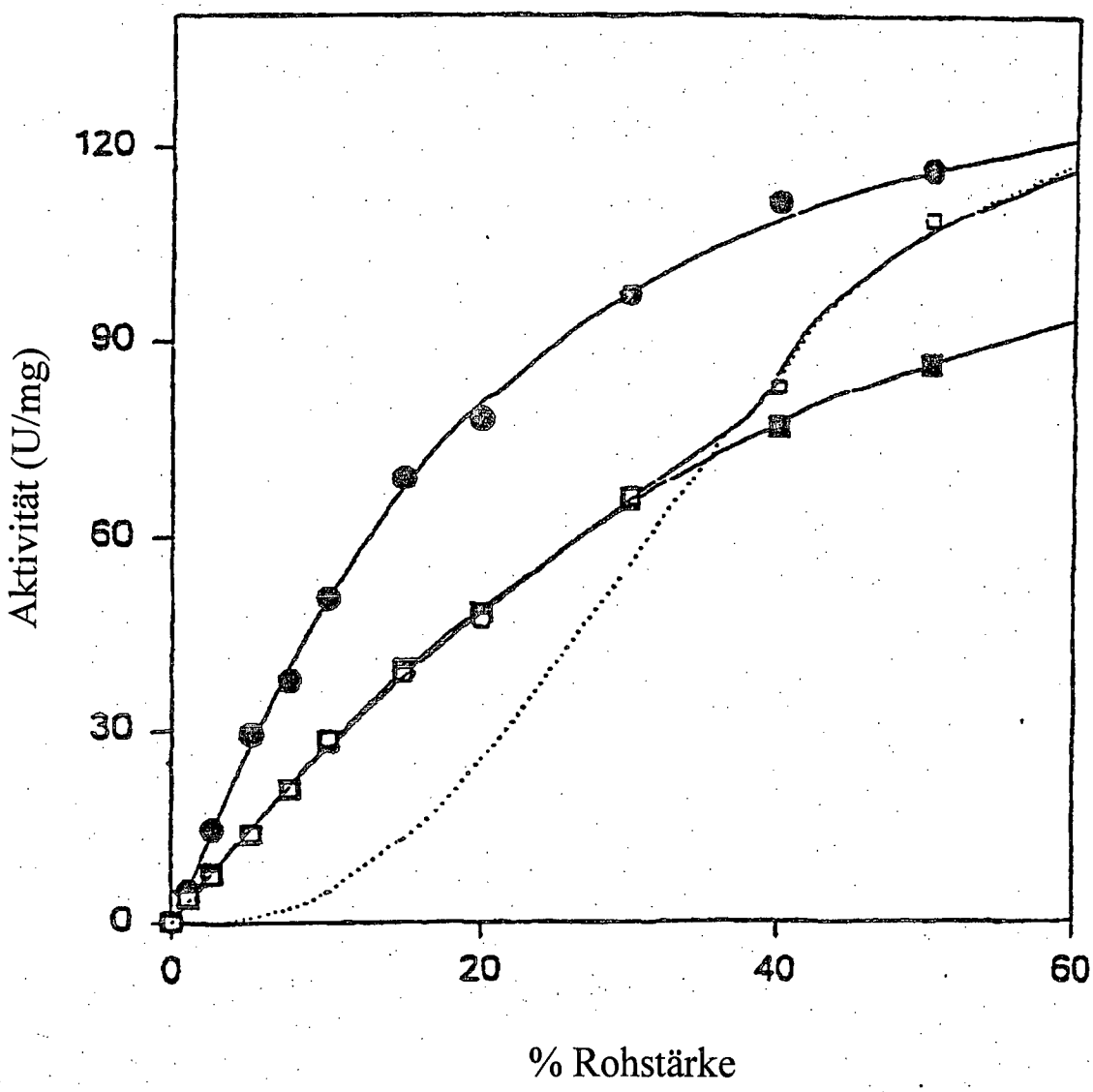

FIG. 6

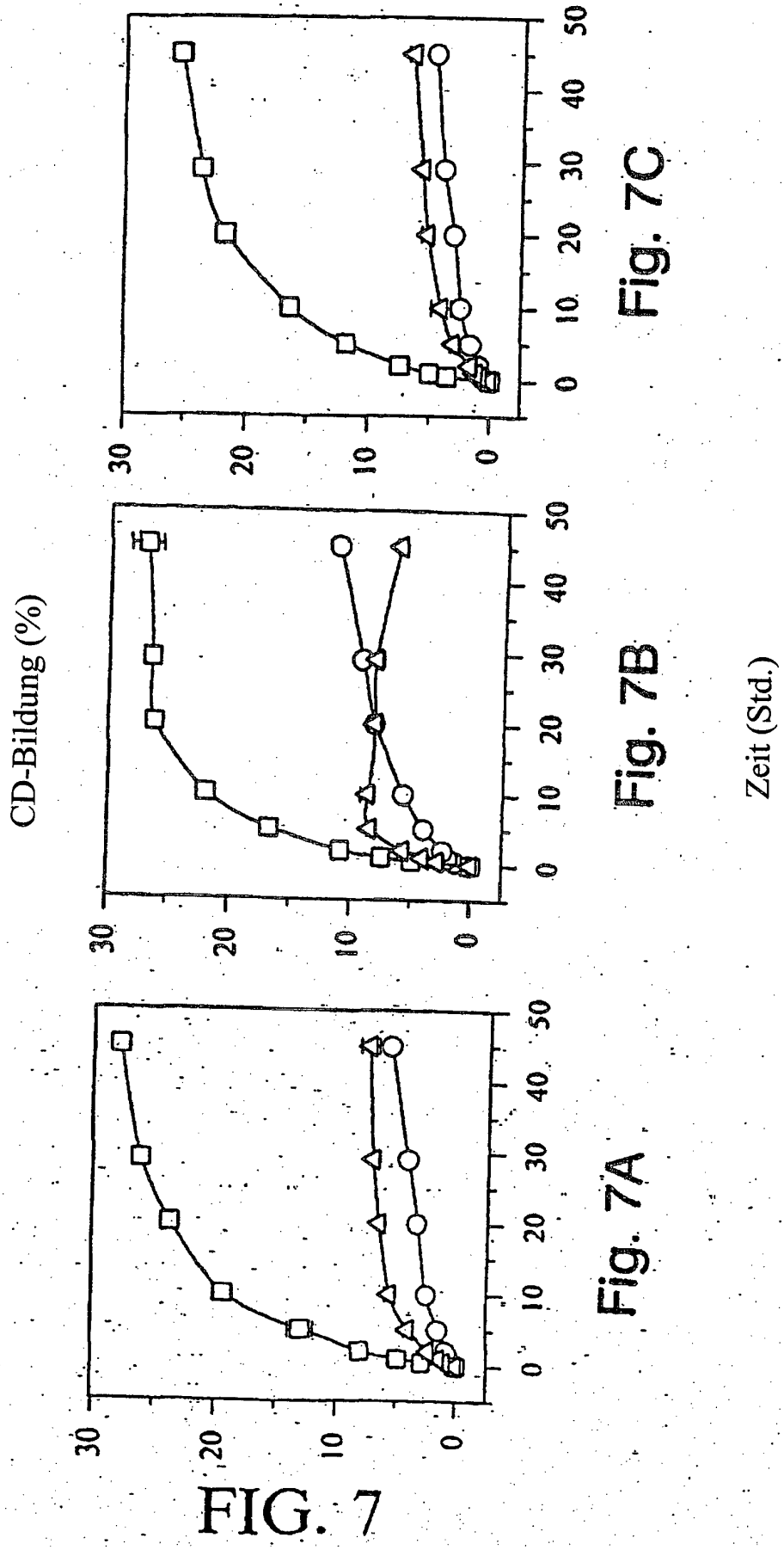

Fig. 7C

Fig. 7B

Fig. 7A

FIG. 7

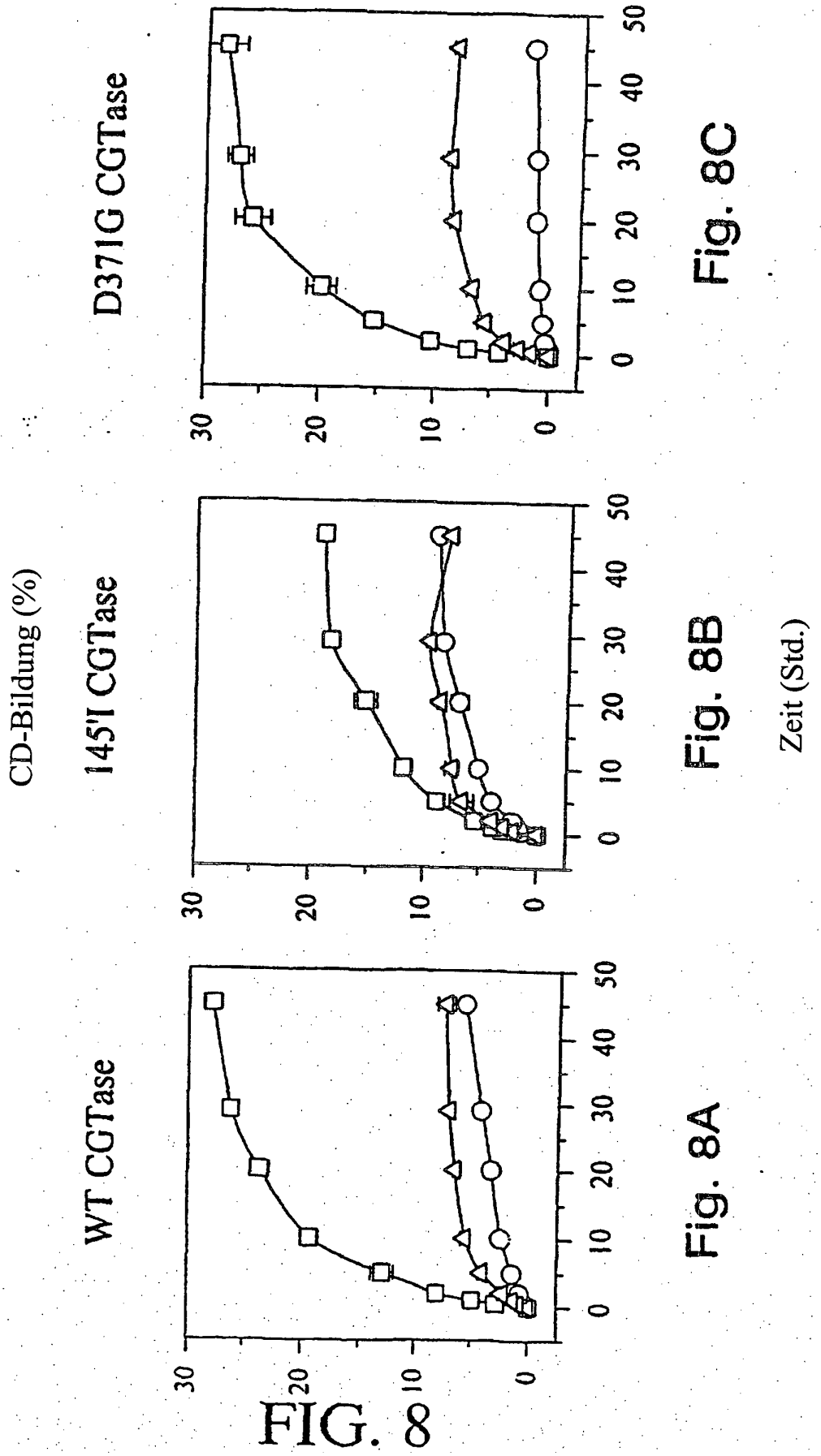

Fig. 8A

Fig. 8B

Fig. 8C

FIG. 8

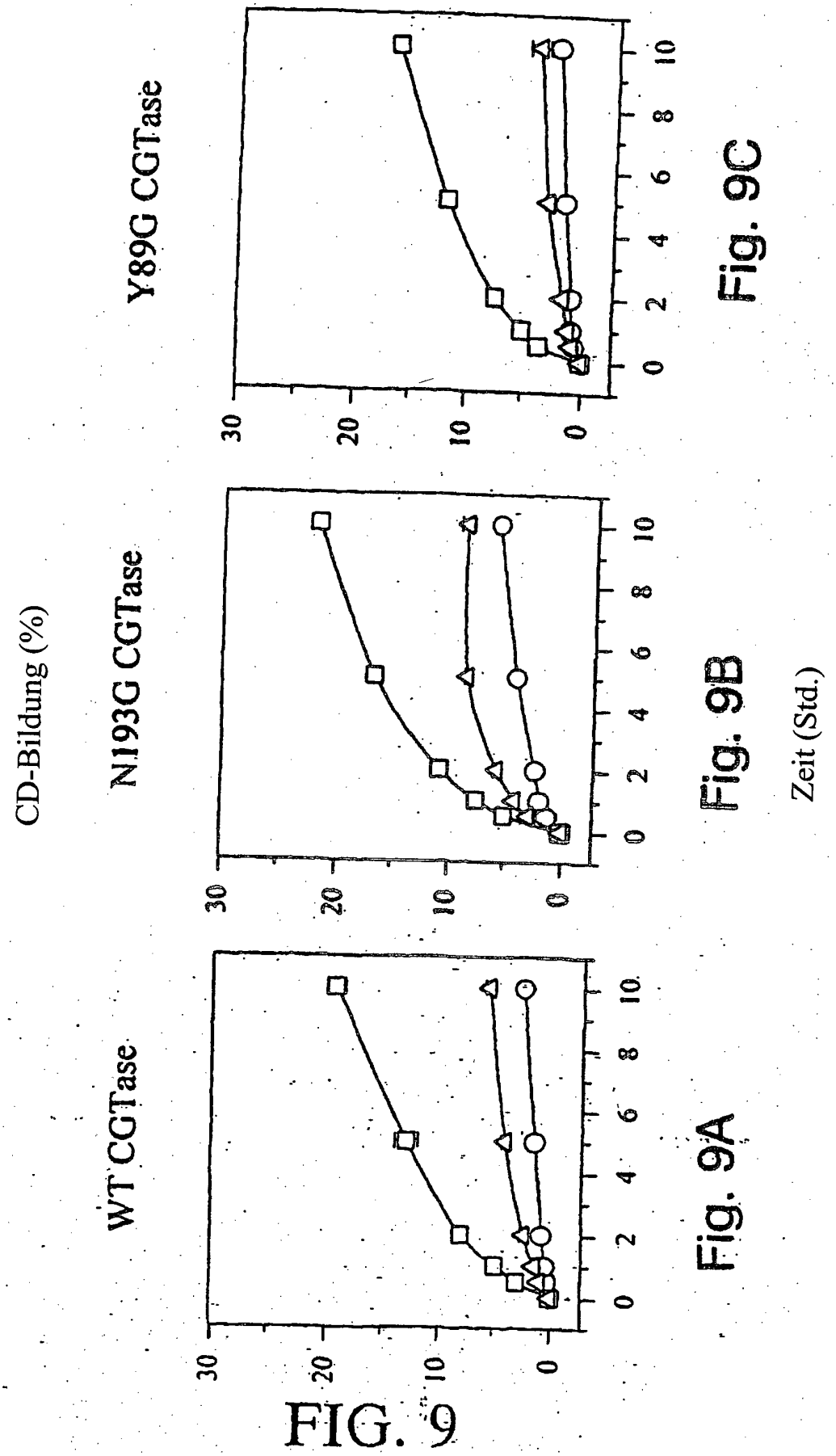

Fig. 9A

Fig. 9B

Fig. 9C

FIG. 9

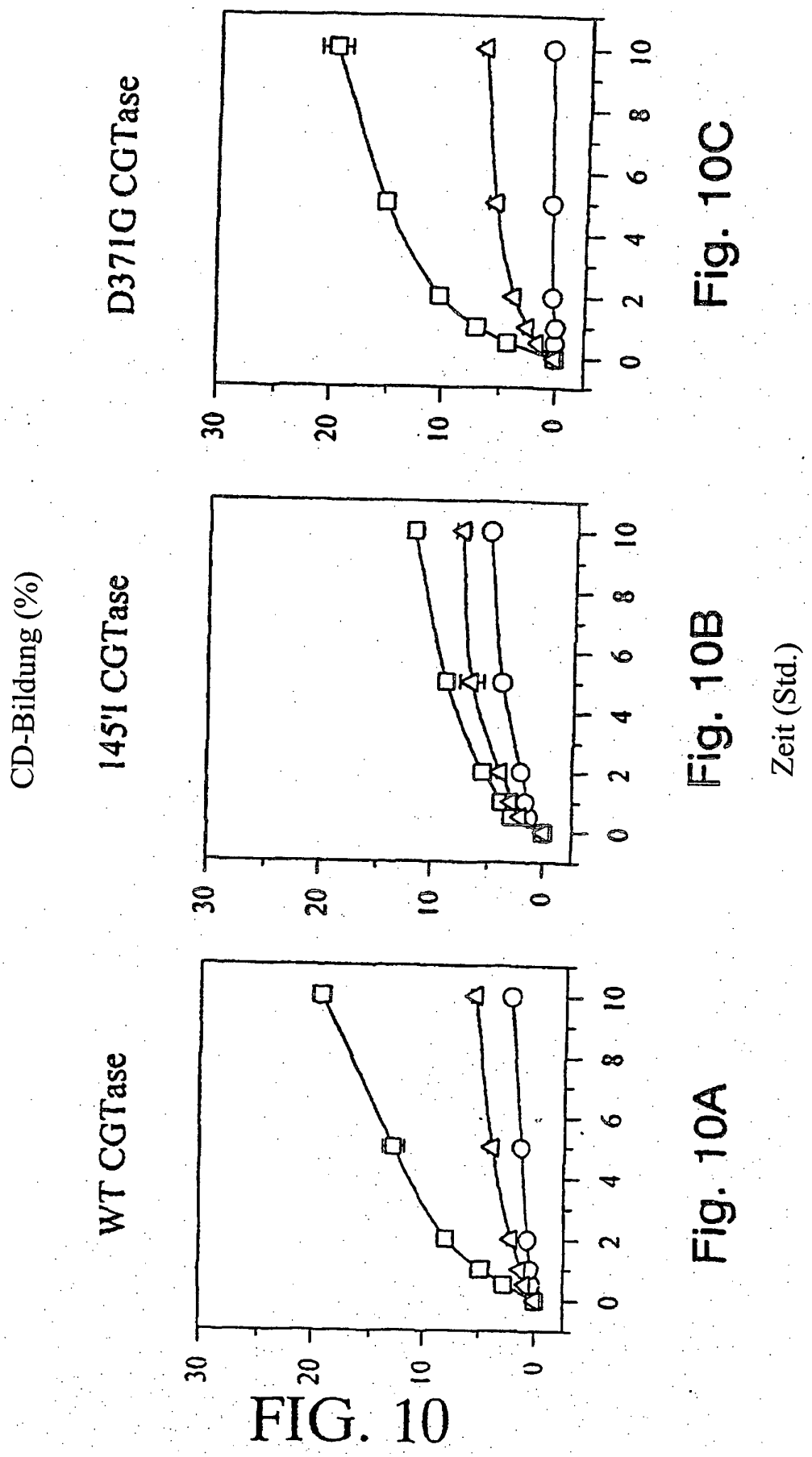

Fig. 10A

Fig. 10B

Fig. 10C

FIG. 10