



(10) **DE 694 32 610 T3** 2012.04.12

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 867 504 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 32 610.0**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 10 9967.4**

(96) Europäischer Anmeldetag: **10.02.1994**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **30.09.1998**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **02.05.2003**

(97) Veröffentlichungstag

des geänderten Patents beim EPA: **18.05.2011**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.04.2012**

(51) Int Cl.: **C12N 9/28 (2006.01)**

C12N 15/56 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert

(30) Unionspriorität:

16395

11.02.1993

US

(73) Patentinhaber:

Genencor International, Inc., Rochester, N.Y., US

(74) Vertreter:

**WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541, München, DE**

(84) Benannte Vertragsanstalten:

**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**Solheim, Leif, Clinton, Iowa 52732, US; Power,
Scott D., San Bruno, US; Requadt, Carol A.,
Tiburon, US; Mitchinson, Colin, Half Moon Bay,
US**

(54) Bezeichnung: **Oxidationsstabile Alpha-Amylase**

Beschreibung

[0001] Diese Anmeldung ist eine Teilanmeldung aus der europäischen Patentanmeldung Nr. 94 909 609.3, die am 10. Februar 1994 angemeldet wurde.

[0002] Die vorliegende Erfindung betrifft neue alpha-Amylasemutanten mit einer Aminosäuresequenz, die in der Natur nicht gefunden wird, wobei diese Mutanten eine Aminosäuresequenz aufweisen, in welcher ein oder mehrere Aminosäurerest(e) einer Vorläufer-alpha-Amylase, insbesondere eine oxidierbare Aminosäure, durch eine andere Aminosäure substituiert wurden. Die mutierten Enzyme der vorliegenden Erfindung zeigen veränderte Stabilitäts-/Aktivitätsprofile, einschließlich einer veränderten oxidativen Stabilität, einem veränderten pH-Leistungsprofil, einer veränderten spezifischen Aktivität und/oder einer veränderten Thermostabilität, aber nicht auf diese beschränkt. In einer besonderen Ausführungsform stellt die Erfindung Bacillus-alpha-Amylasen mit einer Substitution einer Aminosäure an einer Position, die M + 15 bei der alpha-Amylase von Bacillus licheniformis entspricht, bereit und stellt Anwendungen dieser alpha-Amylasen bereit.

[0003] Alpha-Amylasen (alpha-1,4-Glucan-4-glucanohydrolase, EC 3.2.1.1) hydrolysieren vorwiegend zufällig innere alpha-1,4-glycosidische Bindungen in Stärke, um Maltodextrine mit kleinerem Molekulargewicht zu erzeugen. Alpha-Amylasen weisen einen beträchtlichen kommerziellen Wert auf, indem sie in den Anfangsstadien (Verflüssigung) der Stärkeverarbeitung; bei der Alkoholherstellung; als Reinigungsmittel in Detergenismatrices; und in der Textilindustrie zum Entschlichten von Stärke verwendet werden. Alpha-Amylasen werden durch eine breite Vielzahl von Mikroorganismen einschließlich Bacillus und Aspergillus hergestellt, wobei die meisten kommerziellen Amylasen aus bakteriellen Quellen wie z. B. B. licheniformis, B. amyloliquefaciens, B. subtilis oder B. stearothermophilus hergestellt werden. In den vergangenen Jahren waren die bevorzugten Enzyme bei der kommerziellen Anwendung, aufgrund von deren Wärmestabilität und Leistungsfähigkeit, zumindest bei neutralen und leicht alkalischen pH's, jene aus B. licheniformis

[0004] Früher gab es Untersuchungen, welche rekombinante DNA-Techniken verwendet haben, um zu erforschen, welche Reste für die katalytische Aktivität von Amylasen wichtig sind, und/oder um die Auswirkung zu erforschen, wenn gewisse Aminosäuren innerhalb des aktiven Zentrums von verschiedenen Amylasen modifiziert wurden (Vihinen, M. et al. (1990) J. Biochem. 107: 267–272; Holm, L. et al. (1990) Protein Engineering 3: 181–191; Takase, K. et al. (1992) Biochemica et Biophysica Acta. 1120: 281–288; Matsui, I. et al. (1992) Febs Letters Bd. 310, Nr. 3, Seiten 216–218); welche Reste für die thermische Stabilität wichtig sind (Suzuki, Y. et al. (1989) J. Biol. Chem. 264: 18933–18938); und eine Gruppe hat derartige Verfahren verwendet, um Mutationen an verschiedenen Histidinresten in einer B. licheniformis Amylase einzuführen, wobei der Grund zur Erzeugung von Substitutionen an den Histidinresten darin lag, dass die Amylase von B. licheniformis (welche als thermostabil bekannt ist) im Vergleich zu anderen ähnlichen Bacillus-Amylasen einen Überschuss an Histidinen aufweist, und daher wurde vorgeschlagen, dass ein Ersetzen eines Histidins die Thermostabilität des Enzyms beeinflussen könnte (Declerck, N. et al. (1990) J. Biol. Chem. 265: 15481–15488; FR 2 665 178 A1; Joyet, P. et al. (1992) Bio Technology 10: 1579–1583).

[0005] Es wurde gefunden, dass alpha-Amylase durch Wasserstoffperoxid und andere Oxidationsmittel bei pH's zwischen 4 und 10,5 inaktiviert wird, wie in den Beispielen hierin beschrieben wird. Kommerziell können alpha-Amylaseenzyme unter dramatisch anderen Bedingungen wie beispielsweise Bedingungen mit sowohl hohem als auch niedrigem pH verwendet werden, was von der kommerziellen Anwendung abhängt. Beispielsweise können alpha-Amylasen bei der Verflüssigung von Stärke verwendet werden, was ein Verfahren ist, das vorzugsweise bei einem niedrigen pH (pH < 5,5) durchgeführt wird. Andererseits können Amylasen in kommerziellen Geschirrspül- oder Waschmitteldetergentien verwendet werden, welche oft Oxidationsmittel wie z. B. Bleichmittel oder Persäuren enthalten und welche unter sehr viel stärker alkalischen Bedingungen verwendet werden.

[0006] Um die Stabilität oder das Aktivitätsprofil von Amylaseenzymen unter variierenden Bedingungen zu verändern, wurde gefunden, dass ein selektiver Austausch, eine Substitution oder Deletion von oxidierbaren Aminosäuren wie z. B. Methionin, Tryptophan, Tyrosin, Histidin oder Cystein zu einem veränderten Profil der Enzymvariante im Vergleich zu ihrem Vorläufer führt. Da die derzeit kommerziell verfügbaren Amylasen unter verschiedenen Bedingungen nicht akzeptabel (stabil) sind, besteht ein Bedarf für eine Amylase mit einem veränderten Stabilitäts- und/oder Aktivitätsprofil.

[0007] Diese veränderte Stabilität (oxidatives, thermisches oder pH-Leistungsprofil) kann erreicht werden, während eine adäquate enzymatische Aktivität im Vergleich zu dem Wildtyp- oder Vorläuferenzym beibehalten wird. Das charakteristische Merkmal, das durch die Einführung solcher Mutationen beeinflusst wird, kann eine

Änderung bei der oxidativen Stabilität sein, während die thermische Stabilität beibehalten wird oder umgekehrt. Demgemäß kann die Substitution von unterschiedlichen Aminosäuren für eine oxidierbare Aminosäure(n) in der alpha-Amylase-Vorläufersequenz oder die Deletion von einer oder mehreren oxidierbaren Aminosäure(n) zu einer veränderten enzymatischen Aktivität bei einem pH, der von dem verschieden ist, welcher für die Vorläufer-alpha-Amylase als optimal angesehen wird, führen. Anders ausgedrückt können die mutierten Enzyme der vorliegenden Erfindung ebenfalls veränderte pH-Leistungsprofile aufweisen, welche auf der erhöhten oxidativen Stabilität des Enzyms beruhen können.

[0008] Die vorliegende Erfindung betrifft neue alpha-Amylasemutanten, die das Expressionsprodukt einer mutierten DNA-Sequenz sind, welche eine alpha-Amylase codiert, wobei die mutierte DNA-Sequenz von einer Vorläufer-alpha-Amylase durch die Substitution (Ersatz) einer oder mehrerer oxidierbarer Aminosäuren abgeleitet ist.

[0009] Derartige mutierte alpha-Amylasen werden im Allgemeinen durch in vitro-Modifikation einer Vorläufer-DNA-Sequenz, welche eine natürlich vorkommende oder rekombinante alpha-Amylase codiert, um die Substitution eines oder mehrerer Aminosäurereste in einer Vorläufer-Aminosäuresequenz zu codieren, erhalten.

[0010] Im Allgemeinen beruht die Substitution oder Deletion von einer oder mehreren Aminosäuren in der Aminosäuresequenz auf dem Ersatz oder der Deletion von einem oder mehreren Methionin- und/oder Tryptophanresten in einer solchen Sequenz. Diese oxidierbaren Aminosäurereste können durch irgendeine der anderen 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren ersetzt werden. Wenn die gewünschte Wirkung ist, die Stabilität des Vorläufers zu verändern, kann der Aminosäurerest mit einer nicht oxidierbaren Aminosäure (wie beispielsweise Alanin, Arginin, Asparagin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glutamin, Glycin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin oder Valin) oder einer anderen oxidierbaren Aminosäure (wie z. B. Cystein, Methionin, Tryptophan, Tyrosin oder Histidin, welche in der Reihenfolge von am leichtesten oxidierbar bis weniger leicht oxidierbar aufgelistet sind) substituiert werden. Wenn in ähnlicher Weise die gewünschte Wirkung ist, die Thermostabilität zu verändern, kann irgendeine der anderen 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren substituiert werden (d. h. Methionin kann durch Cystein substituiert werden).

[0011] Gemäß einem Aspekt der Erfindung wird eine mutierte alpha-Amylase bereitgestellt, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- (a) einer alpha-Amylase, welche das Expressionsprodukt einer mutierten DNA-Sequenz ist, welche eine alpha-Amylase codiert, wobei die mutierte DNA-Sequenz von einem Vorläufer der alpha-Amylase von *Bacillus licheniformis* durch ortsspezifische Substitution einer Aminosäure an Position M + 15 abgeleitet ist, und
- (b) einer alpha-Amylase, welche das Expressionsprodukt einer mutierten DNA-Sequenz ist, welche eine alpha-Amylase codiert, wobei die mutierte DNA-Sequenz von einem Vorläufer der alpha-Amylase, welche eine alpha-Amylase von *Bacillus* ist, durch ortsspezifische Substitution eines Methioninrestes, der in der Position in entweder der primären oder tertiären Struktur M + 15 in der alpha-Amylase von *Bacillus licheniformis* entspricht, abgeleitet ist,

wobei die genannte alpha-Amylase ein verändertes pH- und/oder Temperaturleistungsprofil zeigt, wenn sie mit dem Wildtyp der *Bacillus*-alpha-Amylase verglichen wird;

wobei die substituierende Aminosäure Val ist.

[0012] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung ein Verfahren zur Veränderung des pH- und/oder Temperaturleistungsprofils einer alpha-Amylase von *Bacillus* bereit, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer Vorläufer-DNA-Sequenz, welche einen Vorläufer der alpha-Amylase von *Bacillus licheniformis* codiert, und Modifizieren der genannten Vorläufer-DNA-Sequenz, um eine mutierte DNA-Sequenz zu erhalten, die eine mutierte alpha-Amylase codiert, welche sich von dem genannten Vorläufer der alpha-Amylase durch ortsspezifische Substitution einer Aminosäure an Position M + 15 unterscheidet, oder
- (b) Bereitstellen einer Vorläufer-DNA-Sequenz, welche einen Vorläufer der alpha-Amylase aus einem *Bacillus* codiert, und Modifizieren der genannten Vorläufer-DNA-Sequenz, um eine mutierte DNA-Sequenz zu erhalten, die eine mutierte alpha-Amylase codiert, welche sich von dem genannten Vorläufer der alpha-Amylase durch ortsspezifische Substitution eines Methioninrestes, der in der Position in entweder der primären oder tertiären Struktur M + 15 in der alpha-Amylase von *Bacillus licheniformis* entspricht, unterscheidet;

und Expression der genannten mutierten alpha-Amylase aus der genannten mutierten DNA-Sequenz, wobei die genannte mutierte alpha-Amylase ein verändertes pH- und/oder Temperaturleistungsprofil zeigt, wenn sie mit dem Vorläufer der *Bacillus*-alpha-Amylase verglichen wird, wobei die substituierende Aminosäure Thr ist.

[0013] Das Verfahren kann den Schritt umfassen des weiterhin Modifizierens der genannten Vorläufer-DNA-Sequenz derart, dass die mutierte alpha-Amylase eine oder mehrere andere ortsspezifische Mutationen umfasst.

[0014] Das Verfahren kann weiterhin den Schritt umfassen des Formulierens der mutierten alpha-Amylase in eine Detergenzzusammensetzung, z. B. eine flüssige, gelförmige oder granuläre Zusammensetzung, oder eine Zusammensetzung zur Verflüssigung von Stärke.

[0015] Die Detergenzzusammensetzung kann weiterhin ein oder mehrere zusätzliche Enzyme umfassen.

[0016] Eine Mutation (Substitution) an einem Tryptophanrest kann in Kombination mit Mutationen an anderen oxidierbaren Aminosäureresten durchgeführt werden. Insbesondere kann es vorteilhaft sein, durch Substitution von wenigstens einem Tryptophan in Kombination mit wenigstens einem Methionin zu modifizieren.

[0017] Die beschriebenen alpha-Amylasemutanten zeigen im Allgemeinen eine veränderte oxidative Stabilität in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und anderen Oxidationsmitteln wie beispielsweise Bleichmittel oder Persäuren und insbesondere milderer Oxidationsmitteln wie beispielsweise Chloramin-T. Mutierte Enzyme mit erhöhter oxidativer Stabilität werden nützlich sein, um die Lagerfähigkeit und die Kompatibilität der Amylasen mit Bleichmittel, Perborat, Percarbonat oder Persäure, die in Reinigungsprodukten verwendet werden, zu verbessern. In ähnlicher Weise kann eine verringerte oxidative Stabilität bei industriellen Prozessen nützlich sein, welche eine schnelle und effiziente Auslöschung der enzymatischen Aktivität erfordern. Die mutierten Enzyme können ebenfalls ein verbreitertes pH-Leistungsprofil zeigen, wodurch Mutanten wie beispielsweise M15L eine Stabilität bei einem niedrigen pH zur Verflüssigung von Stärke zeigen. Die Mutanten können ebenfalls eine veränderte thermische Stabilität aufweisen, wodurch die Mutante entweder bei hohen oder bei niedrigen Temperaturen eine erhöhte Stabilität aufweisen kann. Es versteht sich, dass eine beliebige Änderung (Zunahme oder Abnahme) der enzymatischen charakteristischen Eigenschaft(en) der Mutante im Vergleich zu ihrem Vorläufer in Abhängigkeit von der gewünschten Endanwendung der alpha-Amylasemutante nützlich sein kann.

[0018] Zusätzlich zu Stärkeverarbeitungs- und Reinigungsanwendungen können Amylasevarianten der vorliegenden Erfindung bei beliebigen Anwendungen verwendet werden, bei welchen bekannte Amylasen verwendet werden; beispielsweise können Amylasevarianten in der Textilverarbeitung, der Nahrungsmittelverarbeitung usw. verwendet werden. Insbesondere wird erwartet, dass eine Enzymvariante, die durch Oxidation inaktiviert wurde, in einem Verfahren nützlich wäre, wo gewünscht wird, die Amylaseaktivität am Ende des Verfahrens vollständig zu entfernen, beispielsweise bei Anwendungen in der Verarbeitung von Tiefkühlkost.

[0019] Die alpha-Amylasemutanten sind von einem Bacillus-Stamm wie beispielsweise *B. licheniformis* abgeleitet.

[0020] Es gibt eine neue Form der alpha-Amylase, die normalerweise von *B. licheniformis* erzeugt wird. Diese neue Form, welche als die A4-Form bezeichnet wird, weist zusätzliche vier Alaninreste am N-Terminus der sekretierten Amylase auf ([Fig. 4b](#)). Derivative oder Mutanten der A4-Form der alpha-Amylase sind von der vorliegenden Erfindung umfasst. Unter Derivaten oder Mutanten der A4-Form wird verstanden, dass die vorliegende Erfindung die A4-Form von alpha-Amylase, modifiziert wie beschrieben, umfasst und eine oder mehrere zusätzliche Mutationen wie beispielsweise eine Mutation (Substitution, Ersatz oder Deletion) von einer oder mehreren oxidierbaren Aminosäuren enthält.

[0021] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung eine Detergenzzusammensetzung bereit, welche eine alpha-Amylasemutante und ein oder mehrere zusätzliche Enzyme umfasst, wobei die alpha-Amylasemutante ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus

- (a) einer alpha-Amylase, welche das Expressionsprodukt einer mutierten DNA-Sequenz ist, welche eine alpha-Amylase codiert, wobei die mutierte DNA-Sequenz von einem Vorläufer der alpha-Amylase von *Bacillus licheniformis* durch ortsspezifische Substitution einer Aminosäure an Position M + 15 abgeleitet ist, und
- (b) einer alpha-Amylase, welche das Expressionsprodukt einer mutierten DNA-Sequenz ist, welche eine alpha-Amylase codiert, wobei die mutierte DNA-Sequenz von einem Vorläufer der alpha-Amylase, welche eine alpha-Amylase von *Bacillus* ist, durch ortsspezifische Substitution eines Methioninrestes, der in der Position in entweder der primären oder tertiären Struktur M + 15 in der alpha-Amylase von *Bacillus licheniformis* entspricht, abgeleitet ist,

wobei die genannte alpha-Amylase ein verändertes pH- und/oder Temperaturleistungsprofil zeigt, wenn sie mit dem Wildtyp der Bacillus-alpha-Amylase verglichen wird;
wobei die substituierende Aminosäure Leu, Thr, Asn, Asp, Ser, Val oder Ile ist.

[0022] Die Detergenzzusammensetzungen können flüssig, gelförmig oder granulär sein.

[0023] Zusätzlich ist beabsichtigt, dass die Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung eine alpha-Amylasemutante mit mehr als einer ortsspezifischen Mutation umfassen können.

[0024] In einem weiteren Aspekt stellt die Erfindung eine Zusammensetzung zur Verflüssigung von Stärke bereit, welche eine alpha-Amylasemutante umfasst, wobei die genannte alpha-Amylasemutante ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus:

- (a) einer alpha-Amylase, welche das Expressionsprodukt einer mutierten DNA-Sequenz ist, welche eine alpha-Amylase codiert, wobei die mutierte DNA-Sequenz von einem Vorläufer der alpha-Amylase von *Bacillus licheniformis* durch ortsspezifische Substitution einer Aminosäure an Position M + 15 abgeleitet ist, und
- (b) einer alpha-Amylase, welche das Expressionsprodukt einer mutierten DNA-Sequenz ist, welche eine alpha-Amylase codiert, wobei die mutierte DNA-Sequenz von einem Vorläufer der alpha-Amylase, welche eine alpha-Amylase von *Bacillus* ist, durch ortsspezifische Substitution eines Methioninrestes, der in der Position in entweder der primären oder tertiären Struktur M + 15 in der alpha-Amylase von *Bacillus licheniformis* entspricht, abgeleitet ist,

wobei die genannte alpha-Amylase ein verändertes pH- und/oder Temperaturleistungsprofil zeigt, wenn sie mit dem Wildtyp der Bacillus-alpha-Amylase verglichen wird;
wobei die substituierende Aminosäure Leu, Asn, Asp, Ser, Val oder Ile ist.

[0025] Zusätzlich ist beabsichtigt, dass solche Zusammensetzungen zusätzliche Komponenten, wie sie den Fachleuten bekannt sind, einschließlich z. B. Antioxidantien, Calcium, Ionen usw. umfassen können. In einem Verfahren, welches einen Aspekt der vorliegenden Erfindung darstellt, werden Verfahren zum Verflüssigen von Stärke und insbesondere von granulären Stärkeaufschlämmungen, entweder aus einem Nass- oder Trockenmahlverfahren, bereitgestellt, die wie oben beschriebene Zusammensetzungen verwenden. Im Allgemeinen wird in dem ersten Schritt des Stärkeabbauverfahrens die Stärkeaufschlämmung durch ein Erwärmen bei einer relativ hohen Temperatur (bis zu ca. 110°C) gelatiniert. Nachdem die Stärkeaufschlämmung gelatiniert ist, wird sie unter Verwendung einer alpha-Amylase verflüssigt und dextriniert. Die Bedingungen für eine solche Verflüssigung werden in den US-Patentanmeldungen 07/785,624 und 07/785,623 und dem US-Patent 5,180,699 beschrieben. Das vorliegende Verfahren zur Verflüssigung von Stärke umfasst das Zugeben zu einer Stärkeaufschlämmung einer wirksamen Menge einer alpha-Amylase der vorliegenden Erfindung, allein oder in Kombination mit zusätzlichen Hilfsstoffen wie beispielsweise einem Antioxidationsmittel, und das Umsetzen der Aufschlämmung für eine geeignete Zeit und bei einer geeigneten Temperatur, um die Stärke zu verflüssigen.

[0026] Die Erfindung wird nun mittels eines Beispiels in Bezug auf die begleitenden Zeichnungen beschrieben:

[0027] [Fig. 1](#) zeigt die DNA-Sequenz des Gens für alpha-Amylase aus *B. licheniformis* (NCIB8061), Seq. ID Nr. 31, und ein abgeleitetes Translationsprodukt wie es in Gray, G. et al. (1986) J. Bacter. 166: 635–643 beschrieben wird. 0

[0028] [Fig. 2](#) zeigt die Aminosäuresequenz des reifen alpha-Amylaseenzyms aus *B. licheniformis* (NCIB8061), Seq. ID Nr. 32.

[0029] [Fig. 3](#) zeigt eine Ausrichtung der primären Strukturen von Bacillus-alpha-Amylasen. Die *B. licheniformis*-Amylase (Am-Lich), Seq. ID Nr. 33, wird von Gray, G. et al. (1986) J. Bact. 166: 635–643 beschrieben; die *B. amyloliquefaciens*-Amylase (Am-Amylo), Seq. ID Nr. 34, wird von Takkinen, K. et al. (1983) J. Biol. Chem. 285: 1007–1013 beschrieben; und die *B. stearothermophilus* (Am-Stearo), Seq. ID Nr. 35, wird von Ihara, H. et al. (1985) J. Biochem. 98: 95–103 beschrieben.

[0030] [Fig. 4](#) zeigt die Aminosäuresequenz der reifen alpha-Amylasevariante M197T, Seq. ID Nr. 36.

[0031] [Fig. 4b](#) zeigt die Aminosäuresequenz der A4-Form der alpha-Amylase aus *B. licheniformis* NCIB8061, Seq. ID Nr. 37. Die Nummerierung beginnt am N-Terminus, ausgehend von den vier zusätzlichen Alaninen.

[0032] [Fig. 5](#) zeigt das Plasmid pA4BL, worin sich BLAA auf das alpha-Amylasegen von *B. licheniformis*, PstI bis SstI, bezieht; Amp^R sich auf das Ampicillinresistenzgen aus pBR322 bezieht; und sich CAT auf das Chloramphenicolresistenzgen aus pC194 bezieht.

[0033] [Fig. 6](#) zeigt die Verbindungen Signalsequenz-reifes Protein für *B. licheniformis* (Seq. ID Nr. 38), *B. subtilis* (Seq. ID Nr. 39), *B. licheniformis* in pA4BL (Seq. ID Nr. 40) und *B. licheniformis* in pBLapr (Seq. ID Nr. 41).

[0034] [Fig. 7](#) zeigt die Inaktivierung von gewissen alpha-Amylasen (Spezyme[®] AA20, M15L) mit 0,88 M H₂O₂ bei pH 5,0, 25°C.

[0035] [Fig. 8](#) zeigt ein Schema für die Produktion von M15X-Kassettenmutanten.

[0036] [Fig. 9](#) zeigt die Expression von M15X-Varianten.

[0037] [Fig. 10](#) zeigt die spezifische Aktivität von M15X-Varianten im Hinblick auf lösliche Stärke.

[0038] [Fig. 11](#) zeigt die Wärmestabilität von M15X-Varianten bei 90°C, pH 5,0, 5 mM CaCl₂, 5 Minuten.

[0039] [Fig. 12](#) zeigt eine spezifische Aktivität im Hinblick auf Stärke und ein lösliches Substrat und die Leistungsfähigkeit bei einer Jetverflüssigung bei pH 5,5 von M15-Varianten als eine Funktion der prozentualen Aktivität des *B. licheniformis*-Wildtyps.

[0040] [Fig. 13](#) zeigt die Inaktivierung von *B. licheniformis*-alpha-Amylase (AA20 bei 0,65 mg/ml) mit Chloramin-T bei pH 8,0 im Vergleich zu den Varianten M197A (1,7 mg/ml) und M197L (1,7 mg/ml).

[0041] [Fig. 14](#) zeigt die Inaktivierung von *B. licheniformis*-alpha-Amylase (AA20 bei 0,22 mg/ml) mit Chloramin-T bei pH 4,0 im Vergleich zu den Varianten M197A (4,3 mg/ml) und M1971.

[0042] [Fig. 15](#) zeigt die Reaktion von *B. licheniformis*-alpha-Amylase (AA20 bei 0,75 mg/ml) mit Chloramin-T bei pH 5,0 im Vergleich zu den Doppelvarianten M197T/W138F (0,64 mg/ml) und M197T/WF38Y (0,60 mg/ml).

[0043] Es wird angenommen, dass Amylasen, die bei der Verflüssigung von Stärke verwendet werden, einer gewissen Form von Inaktivierung unterliegen können, welche auf einer gewissen Aktivität beruht, die in der Stärkeaufschlammung vorliegt (siehe US-Anmeldungen 07/785,624 und 07/785,623 und das US-Patent 5,180,669, das am 19. Januar 1993 herausgegeben wurde. Weiterhin kann die Verwendung einer Amylase in Gegenwart von Oxidationsmitteln wie beispielsweise in Bleichmittel oder Persäure enthaltenden Detergentien zu einer teilweisen oder vollständigen Inaktivierung der Amylase führen. Daher ist die vorliegende Erfindung darauf gerichtet, die oxidative Empfindlichkeit der Amylasen zu verändern. Die Enzymmutanten der vorliegenden Erfindung können ebenfalls ein verändertes pH-Profil und/oder eine veränderte thermische Stabilität aufweisen, welche auf der erhöhten oxidativen Stabilität des Enzyms bei niedrigen oder hohen pH-Werten beruhen kann.

[0044] Alpha-Amylase, wie hierin verwendet, umfasst natürlich vorkommende Amylasen wie auch rekombinante Amylasen. Bevorzugte Amylasen in der vorliegenden Erfindung sind alpha-Amylasen, die aus *B. licheniformis* stammen, einschließlich der A4-Form der alpha-Amylase, die aus *B. licheniformis* stammt, wie sie hierin beschrieben wird.

[0045] Rekombinante alpha-Amylasen bezieht sich auf eine alpha-Amylase, in welcher die DNA-Sequenz, welche die natürlich vorkommende alpha-Amylase codiert, modifiziert ist, um eine mutierte DNA-Sequenz zu erzeugen, welche die Substitution, Insertion oder Deletion von einer oder mehreren Aminosäuren in der alpha-Amylasesequenz codiert. Geeignete Modifikationsverfahren werden hierin und ebenfalls in den US-Patenten 4,760,025 und 5,185,258 offenbart.

[0046] Homologien wurden zwischen fast allen Endoamylasen, die bis heute sequenziert wurden, gefunden, wobei diese von Pflanzen bis zu Säugetieren und Bakterien reichen (Nakajima, R. T. et al. (1986) Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 355–360; Rogers, J. C. (1985) Biochem. Biophys. Res. Commun. 128: 470–476). Es gibt vier Bereiche mit besonders hoher Homologie bei gewissen *Bacillus*-Amylasen, wie in [Fig. 3](#) gezeigt ist, wobei die unterstrichenen Abschnitte die Bereiche mit hoher Homologie bezeichnen. Weiterhin wurden Sequenzrichtungen verwendet, um die Beziehung zwischen *Bacillus*-Endoamylasen zu kartieren (Feng, D. F. and Doo-

little, R. F. (1987) 3. Molec. Evol. 35: 351–360). Die relative Sequenzhomologie zwischen *B. stearothermophilus*- und *B. licheniformis*-Amylase beträgt ca. 66%, wie nach Holm, L. et al. (1990) Protein Engineering 3 (3) Seiten 181–191 bestimmt wurde. Die Sequenzhomologie zwischen *B. licheniformis*- und *B. amyloliquefaciens*-Amylasen beträgt ca. 81%, nach Holm, L. et al., supra. Während die Sequenzhomologie wichtig ist, ist allgemein anerkannt, dass die strukturelle Homologie ebenfalls wichtig ist, wenn Amylasen oder andere Enzyme verglichen werden. Beispielsweise wurde eine strukturelle Homologie zwischen Pilzamylasen und bakterieller (*Bacillus*) Amylase vorgeschlagen.

[0047] Eine alpha-Amylasemutante weist eine Aminosäuresequenz auf, welche von der Aminosäuresequenz einer Vorläufer-alpha-Amylase abgeleitet ist. Die Vorläufer-alpha-Amylasen umfassen natürlich vorkommende alpha-Amylasen und rekombinante alpha-Amylasen (wie definiert). Die Aminosäuresequenz der alpha-Amylasemutante leitet sich von der Aminosäuresequenz der Vorläufer-alpha-Amylase durch die Substitution von einer oder mehreren Aminosäuren der Vorläufer-Aminosäuresequenz ab. Eine solche Modifikation bezieht sich auf die Vorläufer-DNA-Sequenz, welche die Aminosäuresequenz der Vorläufer-alpha-Amylase codiert, und nicht auf die Manipulation des Vorläufer-alpha-Amylaseenzyms per se. Geeignete Verfahren für eine solche Manipulation der Vorläufer-DNA-Sequenz umfassen Verfahren, die hierin und in den US-Patenten 4,760,025 und 5,185,258 offenbart sind.

[0048] Spezifische Reste, welche der Position W138 der *Bacillus licheniformis*-alpha-Amylase entsprechen, wie auch alle Methionin-, Histidin-, Tryptophan-, Cystein- und Tyrosin-Positionen werden hierin auch zur Substitution oder Deletion identifiziert.

[0049] Die Nummer der Aminosäureposition (d. h. +197) bezieht sich auf die Nummer, die der reifen *Bacillus licheniformis*-alpha-Amylasesequenz zugeordnet ist, die in [Fig. 2](#) angegeben ist. Die Erfindung ist jedoch nicht auf die Mutation dieser bestimmten reifen alpha-Amylase (*B. licheniformis*) beschränkt sondern erstreckt sich auf Vorläufer-alpha-Amylasen, die Aminosäurereste an Positionen enthalten, welche dem bestimmten identifizierten Rest in der *B. licheniformis*-alpha-Amylase entsprechen. Ein Rest (Aminosäure) einer Vorläufer-alpha-Amylase entspricht einem Rest der *B. licheniformis*-alpha-Amylase, wenn er entweder homolog (d. h. in der Position in entweder der primären oder tertiären Struktur entsprechend) oder analog zu einem bestimmten Rest oder Anteil dieses Restes in der *B. licheniformis*-alpha-Amylase ist (d. h. die selbe oder eine ähnliche funktionale Kapazität aufweist, chemisch oder strukturell kombiniert zu werden, zu reagieren oder zu wechselwirken).

[0050] Um eine Homologie bei der Primärstruktur festzustellen, wird die Aminosäuresequenz einer Vorläufer-alpha-Amylase direkt mit der Primärsequenz der *B. licheniformis*-alpha-Amylase und insbesondere mit einem Satz an Resten verglichen, von denen bekannt ist, dass diese bei allen alpha-Amylasen, deren Sequenz bekannt ist, unveränderlich sind, wie man in [Fig. 3](#) sieht. Es ist ebenfalls möglich, äquivalente Reste in der Tertiärstruktur zu bestimmen: Kristallstrukturen wurden für die pankreatische alpha-Amylase von Schweinen (Buisson, G. et al. (1987) EMBO J. 6: 3909–3916); Taka-Amylase A aus *Aspergillus oryzae* (Matsuura, Y. et al. (1984) J. Biochem. (Tokyo) 95: 697–702); und eine saure alpha-Amylase aus *A. niger* (Boel, E. et al. (1990) Biochemistry 29: 6244–6249) berichtet, wobei die zwei ersten Strukturen ähnlich sind. Es gibt keine veröffentlichten Strukturen für *Bacillus*-alpha-Amylasen, auch wenn vorhergesagt wurde, dass diese gemeinsame Supersekundärstrukturen mit den Glucanasen aufweisen (MacGregor, E. A. & Svensson, B. (1989) Biochem. J. 259: 145–152), und eine Struktur für das *B. stearothermophilus*-Enzym wurde auf die der Taka-Amylase A modelliert (Holm, L. et al. (1990) Protein Engineering 3: 181–191). Die vier in hohem Maße konservierten Bereiche, die in [Fig. 3](#) gezeigt sind, enthalten viele Reste, von denen angenommen wird, dass diese ein Teil des aktiven Zentrums sind (Matsuura, Y. et al. (1984) J. Biochem. (Tokyo) 95: 697–702; Buisson, G. et al. (1987) EMBO J. 6: 3909–3916; Vihinen, M. et al. (1990) 3. Biochem. 107: 267–272) einschließlich, in der *licheniformis*-Nummerierung, His105; Arg229; Asp231; His235; Glu261 und Asp328.

[0051] Expressionsvektor, wie hierin verwendet, bezieht sich auf ein DNA-Konstrukt, das eine DNA-Sequenz enthält, die funktionsfähig mit einer geeigneten Kontrollsequenz verknüpft ist, welche in der Lage ist, die Expression der DNA in einem geeigneten Wirt zu bewirken. Solche Kontrollsequenzen können einen Promotor, um eine Transkription zu bewirken, eine optionale Operatorsequenz, um eine solche Transkription zu steuern, eine Sequenz, welche geeignete mRNA-Ribosomenbindungsstellen codiert, und Sequenzen, welche die Termination der Transkription und Translation steuern, umfassen. Ein bevorzugter Promotor ist der *B. subtilis* aprE-Promotor. Der Vektor kann ein Plasmid, ein Phagenteilchen oder einfach ein potentiell genomisches Insert sein. Wenn er in einen geeigneten Wirt transformiert ist, kann der Vektor sich replizieren und unabhängig von dem Genom des Wirtes funktionieren, oder kann sich in einigen Fällen in das Genom selbst integrieren. In der vorliegenden Beschreibung werden Plasmid und Vektor manchmal austauschbar verwendet, da derzeit das Plasmid die am häufigsten verwendete Form eines Vektors ist. Jedoch soll die Erfindung solche anderen

Formen von Expressionsvektoren, welche äquivalente Funktionen ausüben und welche im Stand der Technik bekannt sind oder bekannt werden, einschließen.

[0052] Wirtsstämme (oder Zellen), die in der vorliegenden Erfindung nützlich sind, sind im Allgemeinen prokaryotische oder eukaryotische Wirte und umfassen jeglichen transformierbaren Mikroorganismus, in welchem die Expression der alpha-Amylase erreicht werden kann. Insbesondere sind Wirtsstämme der selben Spezies oder Gattung, aus welcher die alpha-Amylase stammt, wie beispielsweise ein Bacillus-Stamm geeignet. Vorzugsweise wird ein alpha-Amylase-negativer Bacillus-Stamm (Gene deletiert) und/oder ein alpha-Amylase und Protease-deletierter Bacillus Stamm wie beispielsweise der Bacillus subtilis-Stamm BG 2473 (Δ amyE, Δ apr, Δ npr) verwendet. Wirtszellen werden mit Vektoren transformiert oder transfiziert, die unter Verwendung rekombinanter DNA-Techniken konstruiert wurden. Solche transformierten Wirtszellen sind in der Lage entweder Vektoren, welche die alpha-Amylase und deren Varianten (Mutanten) codieren, zu replizieren oder die gewünschte alpha-Amylase zu exprimieren.

[0053] Vorzugsweise werden die Mutanten der vorliegenden Erfindung während der Fermentation in das Kulturmedium sezerniert. Jede geeignete Signalsequenz, wie beispielsweise das aprE-Signalpeptid, kann verwendet werden, um die Sezernierung zu erreichen.

[0054] Viele der beschriebenen alpha-Amylasemutanten sind nützlich, um verschiedene Detergensenzusammensetzungen, insbesondere gewisse Geschirrspülerreinigungszusammensetzungen, insbesondere jene Reinigungszusammensetzungen, die bekannte Oxidationsmittel enthalten, zu formulieren. Alpha-Amylasemutanten der Erfindung können in bekannte pulverförmige, flüssige oder gelförmige Detergentien mit einem pH zwischen 6,5 bis 12,0 formuliert werden. Eine geeignete granuläre Zusammensetzung kann erzeugt werden wie in den zusammen gehörenden US-Patentanmeldungen 07/429,881, 07/533,721 und 07/957,973 beschrieben wird. Diese Detergensreinigungszusammensetzungen können ebenfalls andere Enzyme wie beispielsweise bekannte Proteasen, Lipasen, Cellulasen, Endoglycosidasen oder andere Amylasen wie auch Aufbaustoffe, Stabilisatoren und andere Träger enthalten, die den Fachleuten bekannt sind. Diese Enzyme können als Co-granalien oder als Mischungen oder in irgendeiner anderen Weise, die den Fachleuten bekannt ist, vorliegen. Weiterhin ist von der vorliegenden Erfindung umfasst, dass Mehrfachmutanten bei Reinigungs- und anderen Anwendungen nützlich sein können. Beispielsweise kann eine Enzymmutante mit Änderungen an sowohl +15 als auch +197 eine erhöhte Leistung zeigen, die in einem Reinigungsprodukt nützlich ist.

[0055] Wie vorher beschrieben, können die beschriebenen alpha-Amylasemutanten ebenfalls bei der Verflüssigung von Stärke nützlich sein. Die Verflüssigung von Stärke, insbesondere die Verflüssigung von granulärer Stärke in einer Aufschlammung, wird typischerweise bei nahezu neutralen pH's und hohen Temperaturen durchgeführt. Wie in den US-Anmeldungen 07/788,624 und 07/785,623 und dem US-Patent 5,180,669 beschrieben wird, scheint es, dass ein Oxidationsmittel oder ein Inaktivierungsmittel einer gewissen Art ebenfalls bei typischen Verflüssigungsverfahren vorliegt, welches die Enzymaktivität beeinflussen kann; somit wird in diesen verwandten Patentanmeldungen ein Antioxidationsmittel zu dem Verfahren zugegeben, um das Enzym zu schützen.

[0056] Basierend auf den Bedingungen eines bevorzugten Verfahrens zur Verflüssigung, wie es in den US-Anmeldungen 07/788,624 und 07/785,623 und dem US-Patent 5,180,669 beschrieben wird, nämlich den Bedingungen eines niedrigen pH, einer hohen Temperatur und einer möglichen Oxidation, umfassen bevorzugte Mutanten der vorliegenden Erfindung zur Verwendung in Verflüssigungsverfahren Mutanten, die veränderte pH-Leistungsprofile (d. h. ein niedriges pH-Profil, $\text{pH} < 6$ und vorzugsweise $\text{pH} < 5,5$) und/oder eine veränderte thermische Stabilität (d. h. hohe Temperatur, ca. 90°C bis 110°C) und/oder eine veränderte oxidative Stabilität (d. h. eine erhöhte oxidative Stabilität) zeigen.

[0057] Somit wird durch die vorliegende Erfindung ein verbessertes Verfahren zum Verflüssigen von Stärke gelehrt, wobei das Verfahren das Verflüssigen einer granulären Stärkeaufschlammung aus entweder einem Nass- oder Trockenmahlverfahren bei einem pH von ca. 4–6 durch das Zugabe einer wirksamen Menge einer alpha-Amylasemutante zu der Stärkeaufschlammung; gegebenenfalls das Zugabe einer wirksamen Menge eines Antioxidationsmittels oder eines anderen Hilfsmittels zu der Aufschlammung; und das Umsetzen der Aufschlammung für eine geeignete Zeit und bei einer geeigneten Temperatur, um die Stärke zu verflüssigen, umfasst.

[0058] Das Folgende wird als ein Beispiel angegeben, und dieses soll nicht als eine Beschränkung des Umfangs der Ansprüche ausgelegt werden. Die hierin verwendeten Abkürzungen, insbesondere die Drei-Buch-

staben- oder Ein-Buchstaben-Bezeichnungen für Aminosäuren, werden in Dale, J. W., Molecular Genetics of Bacteria, John Wiley & Sons. (1989) Appendix B beschrieben.

Experimentelles

Beispiel 1

[0059] Substitutionen der Methioninreste in der *B. licheniformis*-alpha-Amylase Das alpha-Amylasegen ([Fig. 1](#)) wurde aus *B. licheniformis* NCIB8061, welcher von der National Collection of Industrial Bacteria, Aberdeen, Schottland erhalten wurde, kloniert (Gray, G. et al. (1986) J. Bacteriology 166: 635–643). Das 1,72 kb-PstI-SstI-Fragment, welches die letzten drei Reste der Signalsequenz, das gesamte reife Protein und den Terminatorbereich codierte, wurde in M13MP18 subkloniert. Ein synthetischer Terminator wurde zwischen den BclI- und SstI-Stellen zugefügt, wobei eine synthetische Oligonukleotidkassette der folgenden Form verwendet wurde:

BclI	SstI
5' GATCAAAACATAAAAAACGGCCTTGGCCCCGCCGGTTTTTTATTATTTTGGAGCT	3'
3' TTTTGTATTTTGGCCGGAACCGGGGCGGCCAAAAAATAATAAAAAC	5'
	Seq IDNr. 1

welche so geplant war, dass diese den Subtilisin-Transkriptionsterminator von *B. amyloliquefaciens* enthielt (Wells et al. (1983) Nucleic Acid Research 11: 7911–7925).

[0060] Die gezielte Mutagenese durch Oligonukleotide verwendete im Wesentlichen die Vorschrift von Zoller, M. et al. (1983) Meth. Enzymol. 100: 468–500: Kurz gesagt wurden 5'-phosphorylierte Oligonukleotidprimer verwendet, um die gewünschten Mutationen auf der M13-Einzelstrang-DNA-Matrize einzuführen, indem die Oligonukleotide, die in Tabelle I aufgelistet sind, verwendet wurden, um jedes der sieben Methionine, welche in der *B. licheniformis*-alpha-Amylase gefunden werden, zu substituieren. Jedes mutagene Oligonukleotid führte ebenfalls eine Restriktionsendonukleasestelle ein, welche zum Screenen auf die verknüpfte Mutation verwendet werden konnte.

TABELLE I

[0061]

Mutagene Oligonukleotide zur Substitution der Methioninreste in der B. licheniformis- α -Amylase

5'-T GGG ACG CTG ^{M5A} GCG <u>CAG TAC TTT</u> GAA TGG T-3'	Seq IDNr. 2
5'-TG ATG <u>CAG TAC TTT</u> GAA TGG <u>TAC CTG</u> CCC AAT GA-3'	Seq IDNr. 3
5'-GAT TAT TTG TTG TAT GCC <u>GAT ATC</u> GAC TAT GAC CAT-3'	Seq IDNr. 4
5'-CG GGG AAG GAG GCC TTT ACG GTA GCT-3'	Seq IDNr. 5
5'-GC GGC TAT GAC <u>TTA AGG</u> AAA TTG C-3'	Seq IDNr. 6
5'-C TAC GGG <u>GAT GCA</u> TAC GGG ACG A-3'	Seq IDNr. 7
5'-C TAC GGG GAT TAC TAC GGG <u>ACC AAG</u> GGA GAC TCC C-3'	Seq IDNr. 8
5'-CC GGT GGG <u>GCC AAG CGG</u> GCC TAT GTT GGC CGG CAA A-3'	Seq IDNr. 9

[0062] Die fettgedruckten Buchstaben zeigen Veränderungen der Basen an, welche durch das Oligonukleotid eingeführt wurden.

[0063] Die Veränderungen von Codons, die in der Form M8A angegeben sind, waren Methionin (M) an Position +8, das zu Alanin (A) geändert wurde.

[0064] Die Unterstreichung zeigt die Restriktionsendonukleasestelle an, die durch das Oligonukleotid eingeführt wurde.

[0065] Der Heteroduplex wurde verwendet, um E. coli mutL-Zellen zu transfizieren (Kramer et al. (1984) Cell 38: 879), und nach einer Plaquereinigung wurden die Klone durch Restriktionsanalyse der RF1's analysiert. Positive Ergebnisse wurden durch Dideoxysequenzierung bestätigt (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74: 5463–5467), und die PstI-SstI-Fragmente von jedem wurden in einen E. coli-Vektor, das Plasmid pA4BL, subkloniert.

Plasmid pA4BL

[0066] Nach den Verfahren, die in der US-Anmeldung 860,468 (Power et al.) beschrieben werden, wurde eine stille PstI-Stelle an dem Codon +1 (der ersten Aminosäure, welche der Signalspaltungsstelle folgt) des aprE-Gens aus p5168-1 (Stahl, M. L. und Ferrari, E. (1984) J. Bacter. 158: 411–418) eingeführt. Der aprE-Promotor und der Signalpeptidbereich wurden dann aus einem pJH101-Plasmid (Ferrari, F. A. et al. (1983) J. Bacter. 154: 1513–1515) als ein HindIII-PstI-Fragment kloniert und in das von pUC18 abgeleitete Plasmid 3M102 (Ferrari, E. und Hoch, J. A. (1989) Bacillus, Herausgeber C. R. Harwood, Plenum Pub., Seiten 57–72) subkloniert. Die Anfügung des PstI-SstI-Fragmentes aus der B. licheniformis- α -Amylase ergab pA4BL ([Fig. 5](#)), welches die resultierende aprE-Signalpeptid-Amylaseverbindung, wie sie in [Fig. 6](#) gezeigt ist, aufwies.

Transformation in *B. subtilis*

[0067] pA4BL ist ein Plasmid, das in der Lage ist, sich in *E. coli* zu replizieren und sich in das Chromosom von *B. subtilis* zu integrieren. Plasmide, die unterschiedliche Varianten enthielten, wurden in *B. subtilis* transformiert (Anagnostopoulos, C. und Spizizen, J. (1961) *J. Bacter.* 81: 741–746) und in das Chromosom an dem *aprE*-Locus durch einen Mechanismus vom Campbell-Typ integriert (Young, M. (1984) *J. Gen. Microbiol.* 130: 1613–1621). Der *Bacillus subtilis*-Stamm BG2473 war ein Derivat von I168, aus welchem die Amylase (Δ amyE) und zwei Proteasen (Δ apr, Δ npr) deletiert worden waren (Stahl, M. L. und Ferrari, E., *J. Bacter.* 158: 411–418 und US-Patent 5,264,366, worauf hierin vollinhaltlich Bezug genommen wird). Nach der Transformation wurde die *sacU32*(Hy) (Henner, D. J. et al. (1988) *J. Bacter.* 170: 296–300) Mutation durch PBS-1-vermittelte Transduktion eingeführt (Hoch, J. A. (1983) 154: 1513–1515).

[0068] Eine N-terminale Analyse der Amylase, welche von pA4BL in *B. subtilis* exprimiert wurde, zeigte, dass diese prozessiert worden war, wobei sie vier zusätzliche Alanine an dem N-Terminus des sezernierten Amylaseproteins aufwies ("A4-Form"). Diese zusätzlichen Reste wiesen keine wesentliche, nachteilige Wirkung auf die Aktivität oder die thermische Stabilität der A4-Form auf und können bei einigen Anwendungen die Leistungsfähigkeit erhöhen. In nachfolgenden Experimenten wurden die korrekt prozessierten Formen der licheniformis-Amylase und der Variante M197T durch eine sehr ähnliche Konstruktion erzeugt (siehe [Fig. 6](#)). Insbesondere wurde das 5'-Ende der A4-Konstruktion auf einem *EcoRI*-*SstII*-Fragment aus pA4BL ([Fig. 5](#)) in M13 BM20 (Boehringer Mannheim) subkloniert, um eine Matrize des codierenden Stranges für das nachstehende mutagene Oligonukleotid zu erhalten:

5' -CAT CAG CGT CCC ATT AAG ATT TGC AGC CTG CGC AGA CAT GTT
GCT-3'

Seq ID Nr. 10

[0069] Dieser Primer eliminierte die Codons für die zusätzlichen vier N-terminalen Alanine, wobei im Hinblick auf korrekte Formen durch die Abwesenheit der *PstI*-Stelle gescreent wurde. Das Subklonieren des *EcoRI*-*SstII*-Fragmentes zurück in den pA4BL-Vektor ([Fig. 5](#)) ergab das Plasmid pBLapr. Die M197T-Substitution konnte dann auf einem *SstII*-*SstI*-Fragment aus pA4BL (M197T) in den komplementären pBLapr-Vektor bewegt werden, um das Plasmid pBLapr (M197T) zu ergeben. Eine N-terminale Analyse der Amylase, die von pBLapr in *B. subtilis* exprimiert wurde, zeigte, dass diese mit dem selben N-Terminus prozessiert wurde, der in der *B. licheniformis*-alpha-Amylase gefunden wird.

Beispiel 2

Oxidative Empfindlichkeit der Methioninvarianten

[0070] Die alpha-Amylase von *B. licheniformis*, wie beispielsweise Spezyme®AA20 (kommerziell erhältlich von der Genencor International, Inc.), wird schnell in Gegenwart von Wasserstoffperoxid inaktiviert ([Fig. 7](#)). Verschiedene Methioninvarianten wurden in Schüttelkolbenkulturen von *B. subtilis* exprimiert, und die rohen Überstände wurden durch Ammoniumsulfatfällungen gereinigt. Die Amylase wurde aus einem 20%igen gesättigten Ammoniumsulfatüberstand ausgefällt, indem das Ammoniumsulfat auf 70% Sättigung erhöht wurde, und wurde dann resuspendiert. Die Varianten wurden bei pH 5,0 bei 25°C an 0,88 M Wasserstoffperoxid ausgesetzt. Varianten an 6 der Methioninpositionen der *B. licheniformis*-alpha-Amylase waren immer noch für eine Oxidation durch Peroxid zugänglich, während die Substitution an der Position +197 (M197L) eine Beständigkeit gegenüber einer Peroxidoxidation zeigte (siehe [Fig. 7](#)). Jedoch zeigte eine anschließende Analyse, die nachstehend detaillierter beschrieben wird, dass eine Variante, während sie für eine Oxidation bei pH 5,0, 25°C, anfällig sein kann, unter anderen Bedingungen (d. h. bei der Verflüssigung) veränderte verbesserte Eigenschaften zeigen kann.

Beispiel 3

Konstruktion aller möglichen Varianten an der Position 197

[0071] Alle M197-Varianten (M197X) wurden in der A4-Form durch Kassettenmutagenese erzeugt wie in [Fig. 8](#) dargestellt ist:

1. Eine gezielte Mutagenese (über eine Primerverlängerung in M13) wurde angewendet, um M197A zu erzeugen, wobei das nachstehende mutagene Oligonukleotid verwendet wurde:

M197A
5'-GAT TAT TTG GCG TAT GCC GAT ATC GAC TAT GAC CAT-3'
EcoRV+
ClaI- Seq ID Nr. 11

welches ebenfalls eine EcoRV-Stelle (Codons 200–201) einführt, um die ClaI-Stelle (Codons 201–202) zu ersetzen.

2. Dann wurde der Primer LAAM12 (Tabelle II) verwendet, um eine weitere stille Restriktionsstelle (BstBI) über die Codons 186–188 hinweg einzuführen.

3. Die resultierende M197A (BstBI+, EcoRV+) Variante wurde dann in das Plasmid pA4BL subkloniert (PstI-SstI-Fragment), und das resultierende Plasmid mit BstBI und EcoRV verdaut und das große, den Vektor enthaltende Fragment durch Elektroelution aus einem Agarosegel isoliert.

4. Synthetische Primer LAAM14-30 (Tabelle II) wurden jeweils mit dem größtenteils komplementären gemeinsamen Primer LAAM13 (Tabelle II) reassoziieren gelassen. Die resultierenden Kassetten, welche für alle verbleibenden natürlich vorkommenden Aminosäuren an der Position +197 codierten, wurden einzeln in das Vektorfragment, das oben hergestellt wurde, ligiert.

Tabelle II

[0072] Synthetische Oligonukleotide, welche zur Kassettenmutagenese verwendet wurden, um M197X-Varianten zu erzeugen

LAAM12	GG GAA GTT <u>TCG AAT</u> GAA AAC G	Seq IDNr. 12
LAAM13	X197bs (EcoRV) <u>GTC GGC ATA TG CAT</u> ATA ATC ATA GTT GCC GTT TTC ATT (BstBI)	Seq IDNr. 13
LAAM14	I197 (BstBI) CG AAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT TAT TTG <u>ATC</u> TAT GCC GAC (EcoRV-)	Seq IDNr. 14
LAAM15	F197 (BstBI) CG AAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT TAT TTG <u>TTC</u> TAT GCC GAC (EcoRV-)	Seq IDNr. 15
LAAM16	V197 (BstBI) CG AAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT TAT TTG <u>GTT</u> TAT GCC GAC (EcoRV-)	Seq ID Nr. 16
LAAM17	S197 (BstBI) CG AAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT TAT TTG <u>AGC</u> TAT GCC GAC (EcoRV-)	Seq IDNr. 17
LAAM18	P197 (BstBI) CG AAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT TAT TTG <u>CCT</u> TAT GCC GAC (EcoRV-)	Seq ID Nr. 18
LAAM19	T197 (BstBI) CG AAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT TAT TTG <u>ACA</u> TAT GCC GAC (EcoRV-)	Seq ID Nr. 19
LAAM20	Y197 (BstBI) CG AAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT TAT TTG <u>TAC</u> TAT GCC GAC (EcoRV-)	Seq IDNr. 20
AM21	H197 (BstBI) CG AAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT TAT TTG <u>CAC</u> TAT GCC GAC (EcoRV-)	Seq IDNr. 21
AM22	G197 (BstBI) CG AAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT TAT TTG <u>GGC</u> TAT GCC GAC (EcoRV-)	Seq IDNr. 22
AM23	Q197 (BstBI) CG AAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT TAT TTG <u>CAA</u> TAT GCC GAC (EcoRV-)	Seq IDNr. 23
AM24	N197 (BstBI) CG AAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT TAT TTG <u>AAC</u> TAT GCC GAC (EcoRV-)	Seq ID Nr. 24
AM25	K197 (BstBI) CG AAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT TAT TTG <u>AAA</u> TAT GCC GAC (EcoRV-)	Seq IDNr. 25
AM26	D197 (BstBI) CG AAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT TAT TTG <u>GAT</u> TAT GCC GAC (EcoRV-)	Seq IDNr. 26
AM27	E197 (BstBI) CG AAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT TAT TTG <u>GAA</u> TAT GCC GAC (EcoRV-)	Seq IDNr. 27
AM28	C197 (BstBI) CG AAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT TAT TTG <u>TGT</u> TAT GCC GAC (EcoRV-)	Seq IDNr. 28
AM29	W197 (BstBI) CG AAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT TAT TTG <u>TGG</u> TAT GCC GAC (EcoRV-)	Seq ID Nr. 29
AM30	R197 (BstBI) CG AAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT TAT TTG <u>AGA</u> TAT GCC GAC (EcoRV-)	Seq ID Nr. 30

[0073] Die Kassetten waren 50 geplant, dass die EcoRV-Stelle bei der Ligation zerstört wurde, so dass die Plasmide aus E. coli-Transformanten in Hinblick auf den Verlust dieser einmaligen Stelle hin gescreent wurden. Zusätzlich enthielt der gemeinsame Grundstrang (bottom strand) der Kassette eine Verschiebung des Rasters und codierte eine NsiI-Stelle, so dass Transformanten, die von diesem Strang abgeleitet waren, durch ein Screenen im Hinblick auf das Vorliegen der einmaligen NsiI-Stelle eliminiert werden konnten und in keinem Fall erwartet werden konnte, dass diese zu der Expression einer aktiven Amylase führen würden.

[0074] Bei der Restriktionsanalyse positive wurden durch Sequenzieren bestätigt und zur Expression in Schüttelkalbenkulturen in *B. subtilis* transformiert. Die spezifische Aktivität gewisser M197X-Mutanten wurde dann unter Verwendung eines Tests mit löslichem Substrat bestimmt. Die Daten, die bei Verwendung der folgenden Testverfahren erzeugt wurden, sind nachstehend in Tabelle III angegeben.

[0075] Test mit löslichem Substrat: Ein Geschwindigkeitstest wurde auf der Grundlage eines Endpunkt-Testkits, das von Megazyme (Aust.) Pty. Ltd. geliefert wurde, entwickelt: Jedes Röhrchen mit Substrat (p-Nitrophenylmaltoheptaosid, BPNPG7) wurde in 10 ml sterilem Wasser gelöst, worauf eine 1 bis 4fache Verdünnung in Testpuffer (50 mM Maleatpuffer, pH 6,7, 5 mM Calciumchlorid, 0,002% Tween 20) folgte. Tests wurden durchgeführt, indem 10 µl Amylase zu 790 µl des Substrates in einer Küvette bei 25°C zugegeben wurden. Hydrolysegeschwindigkeiten wurden als die Geschwindigkeit der Extinktionsänderung bei 410 nm nach einer Verzögerung von 75 Sekunden gemessen. Der Test war bis zu Geschwindigkeiten von 0,4 Absorptionseinheiten/Minute linear.

[0076] Die Amylaseproteinkonzentration wurde unter Verwendung des standardmäßigen Bio-Rad-Tests (Bio-Rad Laboratories) auf der Grundlage des Verfahrens von Bradford, M. (1976) Anal. Biochem. 72:248) gemessen, wobei Rinderserumalbuminstandards verwendet wurden.

[0077] Stärkehydrolysetest: Das Standardverfahren zum Testen der alpha-Amylaseaktivität von Spezyme® AA20 wurde verwendet. Dieses Verfahren wird im Detail in Beispiel 1 der USSN 07/785,624 beschrieben, worauf hierin vollinhaltlich Bezug genommen wird. Native Stärke bildet mit Iod eine blaue Farbe, macht dieses aber nicht, wenn sie zu kürzeren Dextrinmolekülen hydrolysiert ist. Das Substrat ist lösliche Lintner-Stärke, 5 g/Liter, in Phosphatpuffer, pH 6,2 (42,5 g/Liter Kaliumdihydrogenphosphat, 3,16 g/Liter Natriumhydroxid). Die Probe wird in 25 mM Calciumchlorid zugegeben, und die Aktivität wird als die Zeit gemessen, die es dauert, um bei einer Inkubation bei 30°C einen negativen Iodtest zu ergeben. Die Aktivität wird in Liquefons pro g oder ml (LU) aufgezeichnet, was gemäß der folgenden Formel berechnet wird:

$$\text{LU/ml oder LU/g} = \frac{570}{\sqrt[5]{x \cdot t}} \times D$$

wobei LU = Liquefoneinheit

V = Volumen der Probe (5 ml)

t = Dextrinisierungszeit (Minuten)

D = Verdünnungsfaktor = Verdünnungsvolumen/ml oder g an zugegebenem Enzym.

TABELLE III

ALPHA-AMYLASE	Spezifische Aktivität (als % des AA20-Wertes) bei:	
	löslichem Substrat	Stärke
Spezyme® AA20	100	100
A4-Form	105	115
M15L (A4-Form)	93	94
M15L	85	103
M197T (A4-Form)	75	83
M197T	62	81
M197A (A4-Form)	88	89
M1970	85	85
M197L (A4-Form)	51	17

Beispiel 4

Charakterisierung der Variante M15L

[0078] Die Variante M15L, welche wie in den vorhergehenden Beispielen erzeugt wurde, zeigte keine erhöhte Amylaseaktivität (Tabelle III) und wurde immer noch durch Wasserstoffperoxid ([Fig. 7](#)) inaktiviert. Sie zeigte

jedoch eine deutlich erhöhte Leistungsfähigkeit bei der Jetverflüssigung von Stärke, insbesondere bei niedrigem pH, wie in Tabelle IV unten gezeigt ist.

[0079] Die Stärkeverflüssigung wurde typischerweise unter Verwendung eines Hydroheater M 103-M Dampfjets, welcher mit einer 2,5 Liter-Verzögerungsspirale hinter der Mischkammer und einem Rückschlagventil am Ende ausgerüstet war, durchgeführt.

[0080] Die Stärke wurde zu dem Jet durch eine Moyno-Pumpe zugeführt, und der Dampf wurde über eine Dampfleitung mit 150 psi, die auf 90–100 psi verringert wurden, zugeführt. Temperatursonden waren unmittelbar nach dem Hydroheater-Jet und unmittelbar vor dem Rückschlagventil installiert.

[0081] Eine Stärkeaufschlämmung wurde aus einer Getreidenassmahlvorrichtung erhalten und innerhalb von zwei Tagen verwendet. Die Stärke wurde auf die gewünschten Feststoffgehalte mit entionisiertem Wasser verdünnt, und der pH der Stärke wurde mit 2% NaOH oder gesättigtem Na₂CO₃ eingestellt. Typische Verflüssigungsbedingungen waren:

Stärke	32%–35% Feststoffe
Calcium	40–50 ppm (30 ppm zugegeben)
pH	5,0–6,0
alpha-Amylase	12–14 LU/g Stärke auf Trockenbasis

[0082] Stärke wurde in den Jet mit ca. 350 ml/min eingeführt. Die Jettemperatur wurde bei 105° bis 107°C gehalten. Proben der Stärke wurden aus dem Jetkocher in eine zweite Verflüssigungsstufe bei 95°C überführt und dort für 90 Minuten gehalten.

[0083] Der Grad der Stärkeverflüssigung wurde unmittelbar nach der zweiten Stufe der Verflüssigung gemessen, indem die Dextroseäquivalenz (DE) der Probe bestimmt wurde und indem auf das Vorliegen von roher Stärke getestet wurde, jeweils gemäß den Verfahren, die in Standard Analytical Methods of the Member Companies of the Corn Refiners Association, Inc., 6. Ausgabe, beschrieben werden. Stärke wird, wenn sie im Allgemeinen unter den oben angegebenen Bedingungen und bei pH 6,0 behandelt wird, eine verflüssigte Stärke mit einer DE Von ca. 10 und ohne rohe Stärke ergeben.

[0084] Die Ergebnisse von Stärkeverflüssigungstests, welche die Mutanten der vorliegenden Erfindung verwenden, werden in Tabelle IV angegeben.

TABELLE IV

Leistungsfähigkeit der Varianten M15L (A4-Form) und M15L bei der Stärkeverflüssigung

	pH	DE nach 90 Minuten
Spezyme® AA20	5,9	9,9
M15L (A4-Form)	5,9	10,4
Spezyme® AA20	5,2	1,2
M15L (A4-Form)	5,2	2,2
Spezyme® AA20	5,9	9,3*
M15L	5,9	11,3*
Spezyme® AA20	5,5	3,25**
M15L	5,5	6,7**
Spezyme® AA20	5,2	0,7**
M15L	5,2	3,65**

* Durchschnitt von 3 Experimenten

** Durchschnitt von 2 Experimenten

M15H	(BstB1) C GAA TGG TAT <u>CAC</u> CCC AAT GAC GG (Msc1)	Seq ID Nr. 54
M15K	(BstB1) C GAA TGG TAT <u>AAA</u> CCC AAT GAC GG (Msc1)	Seq ID Nr. 55
M15P	(BstB1) C GAA TGG TAT <u>CCG</u> CCC AAT GAC GG (Msc1)	Seq ID Nr. 56
M15S	(BstB1) C GAA TGG TAT <u>TCT</u> CCC AAT GAC GG (Msc1)	Seq ID Nr. 57
M15T	(BstB1) C GAA TGG TAC <u>ACT</u> CCC AAT GAC GG (Msc1)	Seq ID Nr. 58
M15V	(BstB1) C GAA TGG TAT <u>GTT</u> CCC AAT GAC GG (Msc1)	Seq ID Nr. 59
M15C	(BstB1) C GAA TGG TAT <u>TGT</u> CCC AAT GAC GG (Msc1)	Seq ID Nr. 60
M15Q	(BstB1) C GAA TGG TAT <u>CAA</u> CCC AAT GAC GG (Msc1)	Seq ID Nr. 61
M15E	(BstB1) C GAA TGG TAT <u>GAA</u> CCC AAT GAC GG (Msc1)	Seq ID Nr. 62
M15G	(BstB1) C GAA TGG TAT <u>GGT</u> CCC AAT GAC GG (Msc1)	Seq ID Nr. 63
M15I	(BstB1) C GAA TGG TAT <u>ATT</u> CCC AAT GAC GG (Msc1)	Seq ID Nr. 64
M15F	(BstB1) C GAA TGG TAT <u>TTT</u> CCC AAT GAC GG (Msc1)	Seq ID Nr. 65
M15W	(BstB1) C GAA TGG TAC <u>TGG</u> CCC AAT GAC GG (Msc1)	Seq ID Nr. 66
M15Y	(BstB1) C GAA TGG TAT <u>TAT</u> CCC AAT GAC GG (Msc1)	Seq ID Nr. 67
M15X	(Msc1) CC CTC ATT GGC ACT ACC TAC CAT T (BstB1)	Seq ID Nr. 68
(Grundstrang)		

[0087] Eine Unterstreichung zeigt Veränderungen des Codons an der Aminosäureposition 15.

[0088] Konservative Substitutionen wurden in manchen Fällen durchgeführt, um die Einführung von neuen Restriktionsstellen zu verhindern.

Beispiel 6

Verflüssigung im Labor mit M15X-Varianten

[0089] Elf alpha-Amylasevarianten mit Substitutionen an M15, die wie in Beispiel 5 erzeugt wurden, wurden im Hinblick auf die Aktivität im Vergleich zu Spezyme® AA20 (kommerziell erhältlich von der Genencor International, Inc.) bei einer Verflüssigung bei pH 5,5 unter Verwendung eines Laborverflüssigungssystems getestet. Das Verflüssigungssystem im Labormaßstab bestand aus einer Spirale aus rostfreiem Stahl (0,25 Inch Durchmesser, ungefähr 350 ml Volumen), welche mit einem 7 Inch langen statischen Mischelement, das ungefähr 12 Inch von dem vorderen Ende entfernt war, und einem 30 psi-Rückschlagventil an dem hinteren Ende ausgerüstet war. Die Spirale, außer die beiden Enden, wurde in ein Glycerol-Wasserbad eingetaucht, welches mit thermostatisch gesteuerten Heizelementen ausgerüstet war, welche das Bad bei 105°–106°C hielten.

[0090] Eine enzymhaltige Stärkeaufschlämmung, die durch Rühren in Suspension gehalten wurde, wurde bei ca. 70 ml/min über eine kolbengetriebene Dosierpumpe in die Reaktionsspirale eingeführt. Die Stärke wurde am Ende der Spirale gewonnen und wurde in die zweite Stufe (secondary hold) überführt (95°C für 90 Minuten). Unmittelbar nach der zweiten Stufe wurde die DE der verflüssigten Stärke bestimmt, wie in Beispiel 4 beschrieben ist. Die Ergebnisse sind in [Fig. 12](#) gezeigt.

Beispiel 7

Charakterisierung der M15X-Varianten

[0091] Alle M15X-Varianten wurden in *Bacillus subtilis* vermehrt, und das Expressionsniveau wurde überwacht, wie in [Fig. 9](#) gezeigt ist. Die Amylase wurde durch eine Fällung mit 20–70% Ammoniumsulfat isoliert und teilweise gereinigt. Die spezifische Aktivität dieser Varianten bei dem löslichen Substrat wurde wie in Beispiel 3 bestimmt ([Fig. 10](#)). Viele der M15X-Amylasen weisen spezifische Aktivitäten auf, die größer sind als die von Spezyme® AA20. Ein Labortest der Wärmestabilität wurde mit den Varianten durchgeführt, indem die

Amylase bei 90°C für 5 Minuten in 50 mM Acetatpuffer pH 5 in Gegenwart von 5 mM CaCl₂ erwärmt wurde ([Fig. 11](#)). Die meisten Varianten waren in diesem Test ebenso gut wie Spezyme® AA20. Jene Varianten, die in diesem Test eine vernünftige Stabilität zeigten (wobei eine vernünftige Stabilität definiert ist als eine solche, bei der wenigstens ca. 60% der Wärmestabilität von Spezyme® AA20 erhalten werden), wurden im Hinblick auf die spezifische Aktivität bei Stärke und die Leistungsfähigkeit bei der Verflüssigung bei pH 5,5 getestet. Die interessantesten dieser Mutanten sind in [Fig. 16](#) gezeigt. M15D, N und T zusammen mit L wiesen bei der Verflüssigung bei pH 5,5 eine bessere Leistung auf als Spezyme® AA20 und wiesen sowohl bei dem Test mit dem flüssigen Substrat als auch bei dem Stärkehydrolysetest erhöhte spezifische Aktivitäten auf.

[0092] Allgemein haben wir gefunden, dass wir durch ein Substituieren des Methionins an Position 15 Varianten mit erhöhter Leistungsfähigkeit bei einer Verflüssigung bei niedrigem pH und/oder erhöhter spezifischer Aktivität bereitstellen können.

Beispiel 8

Tryptophanempfindlichkeit gegenüber einer Oxidation

[0093] Chloramin-T (Natrium-N-chlor-p-toluolsulfonimid) ist ein selektives Oxidationsmittel, welches bei neutralem oder alkalischem pH Methionin zu Methioninsulfoxid oxidiert. Bei saurem pH wird Chloramin-T sowohl Methionin als auch Tryptophan modifizieren (Schechter, Y., Burstein, Y. and Patchornik, A. (1975) *Biochemistry* 14 (20) 4497–4503). [Fig. 13](#) zeigt die Inaktivierung von *B. licheniformis*-alpha-Amylase mit Chloramin-T bei pH 8,0 (AA20 = 0,65 mg/ml, M197A = 1,7 mg/ml, M197L = 1,7 mg/ml). Die Daten zeigen, dass durch ein Verändern des Methionins an Position 197 zu Leucin oder Alanin die Inaktivierung der alpha-Amylase verhindert werden kann. Umgekehrt wird, wie in [Fig. 14](#) gezeigt ist, bei pH 4,0 die Inaktivierung von M197A und M197L fortgesetzt, es werden aber mehr Äquivalente von Chloramin-T benötigt ([Fig. 18](#); AA20 = 0,22 mg/ml, M197A = 4,3 mg/ml, M197L = 0,53 mg/ml, 200 mM Na-Acetat bei 4,0). Dieses legt nahe, dass ebenfalls ein Tryptophanrest an der von Chloramin-T vermittelten Inaktivierung beteiligt ist. Weiterhin haben eine tryptische Kartierung und eine anschließende Aminosäuresequenzierung gezeigt, dass das Tryptophan an Position 138 durch Chloramin-T oxidiert wurde (Daten nicht gezeigt). Um dieses zu beweisen, wurden gezielte Mutanten an Tryptophan 138 erzeugt, wie nachstehend geschildert wird:

Herstellung der alpha-Amylase-Doppelmutanten W138 und M197

[0094] Gewisse Varianten von W138 (F, Y und A) wurden als Doppelmutanten mit M197T erzeugt (erzeugt nach der Offenbarung von Beispiel 3). Die Doppelmutanten wurden erzeugt, indem den Verfahren, die in den Beispielen 1 und 3 beschrieben werden, gefolgt wurde. Im Allgemeinen wurden einzelne negative Stränge der DNA von einem M13MP18-Klon der codierenden Sequenz mit 1,72 kb (PstI-SstI) der *B. licheniformis*-alpha-Amylase M197T-Mutante hergestellt. Eine gezielte Mutagenese wurde, indem die Primer verwendet wurden, die nachstehend aufgelistet sind, im Wesentlichen durch das Verfahren von Zoller, M. et al. (1983) durchgeführt, außer dass das T4-Gen 32-Protein und die T4-Polymerase durch Klenow ersetzt wurden. Die Primer enthielten alle einmalige Stellen wie auch die gewünschte Mutation, um jene Klone mit der geeigneten Mutation zu identifizieren.

Tryptophan 138 zu Phenylalanin

133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143
CAC CTA ATT AAA GCT TTC ACA CAT TTT CAT TTT
Hind III

Seq ID Nr. 42

Tryptophan 138 zu Tyrosin

133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143
CAC CTA ATT AAA GCT TAC ACA CAT TTT CAT TTT
Hind III

Seq ID Nr. 43

Tryptophan 138 zu Alanin – Dieser Primer schafft ebenfalls einmalige Stellen stromaufwärts und stromabwärts der Position 138.

127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142
C CGC GTA ATT TCC GGA GAA CAC CTA ATT AAA GCC GCA ACA CAT TTT CAT
BspE I

143 144 145 146 147
TTT CCC GGC CGC GGC AG
Xma I

Seq ID Nr. 44

[0095] Mutanten wurden durch Restriktionsanalyse von W138F und W138Y identifiziert, welche durch DNA-Sequenzierung bestätigt wurden. Die W138A-Sequenz zeigte eine Nukleotiddelation zwischen den einmaligen BspEI- und XmaI-Stellen, jedoch zeigte der Rest des Gens eine korrekte Sequenz. Das SstII/SstI-Fragment mit 1,37 kb, das sowohl die W138X- als auch die M197T-Mutation enthielt, wurde aus M13MP18 in den Expressionsvektor pBLapr überführt, was zu pBLapr (W138F, M197T) und pBLapr (W138Y, M197T) führte. Das Fragment, welches einmalige BspEI- und XmaI-Stellen enthielt, wurde in pBLapr (BspEI, XmaI, M197T) kloniert, da es nützlich ist, um Kassetten zu klonieren, die andere Aminosäuresubstitutionen an Position 138 enthalten.

Einzelne Mutationen an der Aminosäureposition 138

[0096] Nach den allgemeinen Methoden, die in den früheren Beispielen beschrieben sind, wurden gewisse Einzelvarianten von W138 (F, Y, L, H und C) erzeugt.

[0097] Das Asp718-SstI-Fragment mit 1,24 kb, welches die M197T-Mutation enthielt, in dem Plasmid pBLapr (W138X, M197T) von Beispiel 7 wurde durch das Wildtypfragment mit Methionin an 197 ersetzt, was zu pBLapr (W138F), pBLapr (W138Y) und pBLapr (BspEI, XmaI) führte.

[0098] Die Mutanten W138L, W138H und W138C wurden erzeugt, indem synthetische Kassetten in den pBLapr (BspEI, XmaI) Vektor ligiert wurden, wobei die folgenden Primer verwendet wurden:

Tryptophan 138 zu Leucin

CC GGA GAA CAC CTA ATT AAA GCC CTA ACA CAT TTT CAT TTT C

Seq ID Nr. 45

Tryptophan 138 zu Histidin

CC GGA GAA CAC CTA ATT AAA GCC CAC ACA CAT TTT CAT TTT C

Seq ID Nr. 46

Tryptophan 138 zu Cystein

CC GGA GAA CAC CTA ATT AAA GCC TGC ACA CAT TTT CAT TTT C

Seq ID Nr. 47

[0099] Die Reaktion der Doppelmutanten M197T/W138F und M197T/W138Y mit Chloramin-T wurde mit dem Wildtyp verglichen (AA20 = 0,75 mg/ml, M197T/W138F = 0,64 mg/ml, M197T/W138Y = 0,60 mg/ml; 50 mM Na-Acetat bei pH 5,0). Die Ergebnisse, welche in **Fig. 19** gezeigt sind, zeigen, dass die Mutagenese von Tryptophan 138 bewirkt hat, dass die Variante resistenter gegenüber Chloramin-T ist.

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER: Genencor International, Inc.
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: alpha-Amylasemutante
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 68
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
 - (A) ADRESSAT: Genencor International, Inc.
 - (B) STRASSE: 4 Cambridge Place, 1870 Winton Road South
 - (C) STADT: Rochester
 - (D) BUNDESLAND: NY
 - (E) LAND: USA
 - (F) ZIP: 14618
- (v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:
 - (A) DATENTRÄGER: Diskette
 - (B) COMPUTER: IBM-PC-kompatibel
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
 - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25
- (vi) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:
 - (A) ANMELDENUMMER: .
 - (B) ANMELDETAG:
 - (C) KLASSIFIKATION:
- (viii) ANGABEN ZU ANWALT/VERTRETER:
 - (A) NAME: Sharon C. Baldock
 - (B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 3340
 - (C) REFERENZ/AKTENZEICHEN: 44411/400
- (ix) ANGABEN ZUR TELEKOMMUNIKATION:
 - (A) TELEFON: 44 171 404 5921
 - (B) TELEFAX: 44 171 831 1768

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 56 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 1:

GATCAAAACA TAAAAAACCG GCCTTGGCCC CGCCGGTTTT TTATTATTTT TGAGCT

56

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 2:

TGGGACGCTG GCGCAGTACT TTGAATGGT

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 34 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 3:

TGATGCAGTA CTTTGAATGS TACCTGCCCA ATGA

34

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 4:

GATTATTTGT TGTATGCCGA TATCGACTAT GACCAT

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 5:

CGGGGAAGGA GGCCTTTACG GTAGCT

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 6:

GCGGCTATGA CTTAAGGAAA TTGC

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 7:

CTACGGGGAT GCATACGGGA CGA

23

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 8:

CTACGGGGAT TACTACGGGA CCAAGGGAGA CTC

35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 9:

CCGGTGGGGC CAAGCGGGCC TATGTTGGCC GGCAAA

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 10:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 10:

CATCAGCGTC CCATTAAGAT TTGCAGCCTG CGCAGACATG TTGCT

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 11:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 11:

GATTATTTGG CGTATGCCGA TATCGACTAT GACCAT

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 12:

GGGAAGTTTC GAATGAAAC G

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 13:

GTCGGCATAT GCATATAATC ATAGTTGCCG TTTTCATT

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 14:

CGAATGAAAA CGGCAACTAT GATTATTTGA TCTATGCCGA C

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 41 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 15:

CGAATGAAAA CGGCAACTAT GATTATTTGT TCTATGCCGA C

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 41 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 16:

CGAATGAAAA CGGCAACTAT GATTATTTGG TTTATGCCGA C

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 17:

CGAATGAAAA CGGCAACTAT GATTATTTGA GCTATGCCGA C

41

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 18:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 18:

CGAATGAAAA CGGCAACTAT GATTATTTGC CTTATGCCGA C

41

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 19:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 19:

CGAATGAAAA CGGCAACTAT GATTATTTGA CATATGCCGA C

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 20:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 20:

CGAATGAAAA CGGCAACTAT GATTATTTGT ACTATGCCGA C

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 21:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 21:

CGAATGAAAA CGGCAACTAT GATTATTTGC ACTATGCCGA C

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 22:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 22:

CGAATGAAAA CGGCAACTAT GATTATTTGG GCTATGCCGA C

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 23:

CGAATGAAAA CGGCAACTAT GATTATTTGC AATATGCCGA C

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 24:

CGAATGAAAA CGGCAACTAT GATTATTTGA ACTATGCCGA C

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 25:

GCAATGAAAA CGGCAACTAT GATTATTTGA AATATGCCGA C

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 26:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 41 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 26:

CGAATGAAAA CGGCAACTAT GATTATTTGG ATTATGCCGA C

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 27:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 41 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 27:

CGAATGAAAA CGGCAACTAT GATTATTTGG AATATGCCGA C

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 28:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 28:

CGAATGAAAA CGGCAACTAT GATTATTTGT GTATTGCCGA C

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 29:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 29:

CGAATGAAAA CGGCAACTAT GATTATTTGT GGTATGCCGA C

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 30:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 30:

CGAATGAAAA CCGCAACTAT GATTATTTGA GATATGCCGA C

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 31:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1968 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 31:

ACCTTGAAGA AGTGAAGAAG CAGAGAGGCT ATTGAATAAA TGAGTAGAAA GCGCCATATC 60
 GGCGCTTTTC TTTTGAAGA AAATATAGGG AAAATGGTAC TTGTTAAAAA TTCGGAATAT 120
 TTATACAACA TCATATGTTT CACATTGAAA GGGGAGGAGA ATCATGAAAC AACAAAAACG 180
 GCTTTACGCC CGATTGCTGA CGCTGTTATT TCGGCTCATC TTCTTGCTGC CTCATTCTGC 240
 ACCAGCGGCG GCAAATCTTA ATGGGACGCT GATGCAGTAT TTTGAATGGT ACATGCCCAA 300
 TGACGGCCAA CATTGGAAGC GTTGGCAAAA CGACTCGGCA TATTTGGCTG AACACGGTAT 360
 TACTGCCGTC TGGATTCCCC CGGCATATAA GGGAAACGAGC CAAGCGGATG TGGGCTACGG 420
 TGCTTACGAC CTTTATGATT TAGGGGAGTT TCATCAAAAA GGGACGGTTC GGACAAAGTA 480
 CGGCACAAAA GGAGAGCTGC AATCTGCGAT CAAAAGTCTT CATTCCCGCG ACATTAACGT 540
 TTACGGGGAT GTGGTCATCA ACCACAAAGG CGGCGCTGAT GCGACCGAAG ATGTAACCGC 600
 GGTGAACTC GATCCCGCTG ACCGCAACCG CGTAATTTCA GGAGAACACC TAATTAAAGC 660
 CTGGACACAT TTTCATTTTC CGGGGCGCGG CAGCACATAC AGCGATTTTA AATGGCATTG 720
 GTACCATTTT GACGGAACCG ATTGGGACGA GTCCCGAAAG CTGAACCGCA TCTATAAGTT 780
 TCAAGGAAAG GCTTGGGATT GGGAAAGTTT CAATGAAAAC GGCAACTATG ATTATTTGAT 840
 GTATGCCGAC ATCGATTATG ACCATCCTGA TGTCCGACGA GAAATTAAGA GATGGGGCAC 900
 TTGGTATGCC AATGAACGCT AATTGGACCG TTCCGCTCTT GATGCTGTCA AACACATTAA 960
 ATTTTCTTTT TTGCGGGATT GGGTTAATCA TGTACGGGAA AAAACGGGGA AGGAAATGTT 1020
 TACGGTAGCT GAATATTGGC AGAATGACTT GGGCGCGCTG GAAACTATT TGAACAAAAC 1080
 AAATTTTAAT CATTCACTGT TTGACGTGCC GTTTCATTAT CAGTTCCATG CTGCATCGAC 1140
 ACAGGGAGGC GCGTATGATA TGAGGAAATT GCTGAACGGT ACCGTCGTTT CCAAGCATCC 1200
 GTTGAAATCG GTTACATTTG TCGATAACCA TGATACACAG CCGGGGCAAT CGCTTGAGTC 1260

GACTGTCCAA ACATGGTTTA AGCCGCTTGC TTACGCTTTT ATTCTCACAA GGGAACTCTGG 1320
 ATACCCTCAG GTTTTCTACG GGGATATGTA CGGGACGAAA GGAGACTCCC AGCGCGAAAT 1380
 TCCTGCCTTG AAACACAAAA TTGAACCGAT CTTAAAAGCG AGAAAACAGT ATCCGTACCG 1440
 AGCACAGCAT GATTATTTCG ACCACCATGA CATTGTGGGC TGGACAAGGG AAGGCGACAG 1500
 CTCGGTTGCA AATTCAGGTT TGGCGGCATT AATAACAGAC GGACCCGGTG GGGCAAAGCG 1560
 AATGTATGTC GGCCGGGCAA ACGCCGGTGA GACATGGCAT GACATTACCG GAAACCGTTC 1620
 GGAGCCGGTT GTCATCAATT CGGAAGGCTG GGGAGAGTTT CACGTAAACG CCGGGTCGGT 1680
 TTCAATTTAT GTTCAAAGAT AGAAGAGCAG AGAGGACGGA TTTCTGAAG GAAATCCGTT 1740
 TTTTATTTT GCCCGTCTTA TAAATTTCTT TGATTACATT TTATAATTAA TTTAACAAA 1800
 GTGTCATCAG CCTCAGGAA GCACTTGCTG ACAGTTTGAA TCGCATAGGT AAGGCGGGGA 1860
 TGAAATGGCA ACGTTATCTG ATGTAGCAAA GAAAGCAAAT GTGTCGAAA TGACGGTATC 1920
 CCGGGTGATC AATCATCTG AACTGTGAC GGATGAATTG AAAAAGCT 1968

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 32:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 483 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 32:

Ala	Asn	Leu	Asn	Gly	Thr	Leu	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr	Met	Pro
1				5					10					15	
Asn	Asp	Gly	Gln	His	Trp	Lys	Arg	Leu	Gln	Asn	Asp	Ser	Ala	Tyr	Leu
		20						25					30		
Ala	Glu	His	Gly	Ile	Thr	Ala	Val	Trp	Ile	Pro	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gly
		35					40					45			
Thr	Ser	Gln	Ala	Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asp	Leu
	50					55					60				
Gly	Glu	Phe	His	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly	Thr	Lys
65					70				75					80	
Gly	Glu	Leu	Gln	Ser	Ala	Ile	Lys	Ser	Leu	His	Ser	Arg	Asp	Ile	Asn
			85					90						95	
Val	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Ile	Asn	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp	Ala	Thr
		100					105						110		
Glu	Asp	Val	Thr	Ala	Val	Glu	Val	Asp	Pro	Ala	Asp	Arg	Asn	Arg	Val
		115				120						125			

Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro
 130 135 140
 Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe
 145 150 155 160
 Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys
 165 170 175
 Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn
 180 185 190
 Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
 195 200 205
 Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln
 210 215 220
 Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
 225 230 235 240
 Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met
 245 250 255
 Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn
 260 265 270
 Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
 275 280 285
 His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
 290 295 300
 Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser
 305 310 315 320
 Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
 325 330 335
 Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
 340 345 350
 Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
 355 360 365
 Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile
 370 375 380
 Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His
 385 390 395 400
 Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
 405 410 415
 Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
 420 425 430
 Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr
 435 440 445
 Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser
 450 455 460
 Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr
 465 470 475 480
 Val Gln Arg

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 33:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 511 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 33:

```

Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe
1          5          10          15
Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ala Ala Ala Asn Leu
20          25          30
Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro Asn Asp Gly
35          40          45
His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu Ala Glu His Gly
50          55          60
Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Thr Ser Gln Ala
65          70          75          80
Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe His
85          90          95
Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gly Glu Leu Gln
100          105          110
Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn Val Tyr Gly Asp
115          120          125
Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp Val Thr
130          135          140
Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val Ile Ser Gly Glu
145          150          155          160
His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro Gly Arg Gly Ser
165          170          175
Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly Thr Asp
180          185          190
Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys Phe Gln Gly Lys
195          200          205
Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu
210          215          220
Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Ala Ala Glu Ile
225          230          235          240
Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln Leu Asp Gly Phe
245          250          255

```

```

Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg Asp Trp
      260                               265                               270

Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr Val Ala
      275                               280                               285

Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys
      290                               295                               300

Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Gln Phe
      305                               310                               315                               320

His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys Leu Leu
      325                               330                               335

Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser Val Thr Phe Val
      340                               345                               350

Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr Val Gln
      355                               360                               365

Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg Glu Ser
      370                               375                               380

Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys Gly Asp
      385                               390                               395                               400

Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro Ile Leu
      405                               410                               415

Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr Phe Asp
      420                               425                               430

His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ala
      435                               440                               445

Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly Ala Lys
      450                               455                               460

Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His Asp Ile
      465                               470                               475                               480

Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly Trp Gly
      485                               490                               495

Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln Arg
      500                               505                               510

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 34:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 520 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 34:

Met Arg Gly Arg Gly Asn Met Ile Gln Lys Arg Lys Arg Thr Val Ser
1 3 10 15
Phe Arg Leu Val Leu Met Cys Thr Leu Leu Phe Val Ser Leu Pro Ile
20 25 30
Thr Lys Thr Ser Ala Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp
35 40 45
Tyr Thr Pro Asn Asp Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala
50 55 60
Glu His Leu Ser Asp Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala
65 70 75 80
Tyr Lys Gly Leu Ser Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu
85 90 95
Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr
100 105 110
Gly Thr Lys Ser Glu Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg
115 120 125
Asn Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly Ala
130 135 140
Asp Ala Thr Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn Arg
145 150 155 160
Asn Gln Glu Thr Ser Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp Phe
165 170 175
Arg Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp
180 185 190
Tyr His Phe Asp Gly Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg
195 200 205
Ile Phe Lys Phe Arg Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser
210 215 220
Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr
225 230 235 240
Asp His Pro Asp Val Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr
245 250 255
Ala Asn Glu Leu Ser Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His
260 265 270
Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala
275 280 285
Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn Ala
290 295 300
Gly Lys Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser Val
305 310 315 320
Phe Asp Val Pro Leu His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly
325 330 335
Gly Gly Tyr Asp Met Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser Arg
340 345 350

```

His Pro Glu Lys Ala Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln Pro
355                               360                               365

Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala
370                               375                               380

Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr
385                               390                               395                               400

Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser
405                               410                               415

Leu Lys Asp Asn Ile Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala
420                               425                               430

Tyr Gly Pro Gln His Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp
435                               440                               445

Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu
450                               455                               460

Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys
465                               470                               475                               480

Asn Ala Gly Glu Thr Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr
485                               490                               495

Val Lys Ile Gly Ser Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp Gly
500                               505                               510

Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln Lys
515                               520

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 35:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 548 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 35:

```

Val Leu Thr Phe His Arg Ile Ile Arg Lys Gly Trp Met Phe Leu Leu
1                               5                               10                               15

Ala Phe Leu Leu Thr Ala Ser Leu Phe Cys Pro Thr Gly Arg His Ala
20                               25                               30

Lys Ala Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp
35                               40                               45

Tyr Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala
50                               55                               60

Asn Asn Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Ser Leu Pro Pro Ala
65                               70                               75                               80

```

Tyr Lys Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu
 85 90 95
 Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr
 100 105 110
 Gly Thr Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala
 115 120 125
 Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala
 130 135 140
 Asp Gly Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg
 145 150 155 160
 Asn Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe
 165 170 175
 Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp
 180 185 190
 Tyr His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg
 195 200 205
 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp
 210 215 220
 Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met
 225 230 235 240
 Asp His Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr
 245 250 255
 Val Asn Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Gly Leu Lys His
 260 265 270
 Ile Lys Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln
 275 280 285
 Thr Gly Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile
 290 295 300
 Asn Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Thr Met Ser Leu
 305 310 315 320
 Phe Asp Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly
 325 330 335
 Gly Ala Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp
 340 345 350
 Gln Pro Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Asn Pro
 355 360 365
 Ala Lys Arg Cys Ser His Gly Arg Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr
 370 375 380
 Ala Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly
 385 390 395 400
 Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys
 405 410 415
 Ile Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln
 420 425 430
 His Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly
 435 440 445

Val Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly
 450 455 460
 Ala Gly Arg Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys
 465 470 475 480
 Val Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn
 485 490 495
 Ser Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val
 500 505 510
 Trp Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr
 515 520 525
 Thr Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp His Glu Pro Arg Leu
 530 535 540
 Val Ala Trp Pro
 545

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 36:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 483 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 36:

Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
 1 5 10 15
 Asn Asp Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu
 20 25 30
 Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
 35 40 45
 Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
 50 55 60
 Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
 65 70 75 80
 Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn
 85 90 95
 Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr
 100 105 110
 Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val
 115 120 125

Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro
 130 135 140
 Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe
 145 150 155 160
 Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys
 165 170 175
 Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn
 180 185 190
 Tyr Asp Tyr Leu Thr Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
 195 200 205
 Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln
 210 215 220
 Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
 225 230 235 240
 Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met
 245 250 255
 Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn
 260 265 270
 Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
 275 280 285
 His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
 290 295 300
 Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser
 305 310 315 320
 Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
 325 330 335
 Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
 340 345 350
 Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
 355 360 365
 Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile
 370 375 380
 Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His
 385 390 395 400
 Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
 405 410 415
 Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
 420 425 430
 Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr
 435 440 445
 Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser
 450 455 460
 Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr
 465 470 475 480
 Val Gln Arg

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 37:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 487 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 37:

```

Ala Ala Ala Ala Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu
1          5          10          15
Trp Tyr Met Pro Asn Asp Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp
          20          25          30
Ser Ala Tyr Leu Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro
          35          40          45
Ala Tyr Lys Gly Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp
          50          55          60
Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys
          65          70          75          80
Tyr Gly Thr Lys Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser
          85          90          95
Arg Asp Ile Asn Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly
          100          105          110
Ala Asp Ala Thr Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp
          115          120          125
Arg Asn Arg Val Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His
          130          135          140
Phe His Phe Pro Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His
          145          150          155          160
Trp Tyr His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn
          165          170          175
Arg Ile Tyr Lys Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn
          180          185          190
Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp
          195          200          205
His Pro Asp Val Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala
          210          215          220
Asn Glu Leu Gln Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile
          225          230          235          240
Lys Phe Ser Phe Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr
          245          250          255

```

Gly Lys Glu Met Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly
 250 265 270
 Ala Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe
 275 280 285
 Asp Val Pro Leu His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly
 290 295 300
 Gly Tyr Asp Met Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His
 305 310 315 320
 Pro Leu Lys Ser Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly
 325 330 335
 Gln Ser Leu Glu Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr
 340 345 350
 Ala Phe Ile Leu Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly
 355 360 365
 Asp Met Tyr Gly Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu
 370 375 380
 Lys His Lys Ile Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr
 385 390 395 400
 Gly Ala Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr
 405 410 415
 Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile
 420 425 430
 Thr Asp Gly Pro Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn
 435 440 445
 Ala Gly Glu Thr Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val
 450 455 460
 Val Ile Asn Ser Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser
 465 470 475 480
 Val Ser Ile Tyr Val Gln Arg
 485

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 38:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 32 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 38:

Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Thr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ala Ala Ala Asn Leu
 20 25 30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 39:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 33 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 39:

Met Arg Ser Lys Thr Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Ile Phe Thr Met Ala Phe Ser Asn Met Ser Ala Gln Ala Ala Gly Lys
 20 25 30
 Ser

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 40:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 35 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 40:

Met Arg Ser Lys Thr Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu
 1 5 10 15
 Ile Phe Thr Met Ala Phe Ser Asn Met Ser Ala Gln Ala Ala Ala Ala
 20 25 30
 Ala Ala Asn
 35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 41:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 32 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 41:

```
Met Arg Ser Lys Thr Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Thr Leu
1           5           10           15
Ile Phe Thr Met Ala Phe Ser Asn Met Ser Ala Gln Ala Ala Asn Leu
                20           25           30
```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 42:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 42:

CACCTAATTA AAGCTTTCAC ACATTTTCAT TTT

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 43:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 43:

CACCTAATTA AAGETTACAC ACATTTTCAT TTT

33

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 44:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 66 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 44:

CCGCGTAATT TCCGGAGAAC ACCTAATTAA AGCCGCAACA CATTTTCATT TTCCCGGGCG 60
CGGCAG 66

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 45:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 45:

CCGGAGAACA CCTAATTAAA GCCCTAACAC ATTTTCATT TC 42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 46:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 46:

CCGGAGAACA CCTAATTAAA GCCCACACAC ATTTTCATTT TC

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 47:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 47:

CCGGAGAACA CCTAATTAAA GCCTGCACAC ATTTTCATTT TC

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 48:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 48:

GATGCAGTAT TTCGAAGTGG TATA

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 49:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 49:

TGCCCAATGA TGGCCAACAT TGG AAG

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 50:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 50:

CGAATGGTAT GCTCCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 51:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 51:

CGAATGGTAT CGCCCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 52:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 52:

CGAATGGTAT AATCCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 53:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 53:

CGAATGGTAT GATCCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 54:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 54:

CGAATGGTAT CACCCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 55:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 55:

CGAATGGTAT AAACCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 56:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 56:

CGAATGGTAT CCGCCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 57:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 57:

CGAATGGTAT TCTCCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 58:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 58:

CGAATGGTAC ACTCCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 59:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 59:

CGAATGGTAT GTTCCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 60:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 60:

CGAATGGTAT TGTCCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 61:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 61:

CGAATGGTAT CAACCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 62:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 62:

CGAATGGTAT GAACCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 63:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 63:

CGAATGGTAT GGTCCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 64:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare

- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 64:

CGAATGGTAT ATTCCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 65:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 65:

CGAATGGTAT TTTCCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 66:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 66:

CGAATGGTAC TGGCCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 67:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 67:

CGAATCGGTAT TATCCCAATG ACGG

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 68:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 68:

CCGTCATTGG GACTACGTAC CATT

24

Patentansprüche

1. Eine alpha-Amylasemutante, die ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus:
 - (a) einer alpha-Amylase, welche das Expressionsprodukt einer mutierten DNA-Sequenz ist, welche eine alpha-Amylase codiert, wobei die mutierte DNA-Sequenz von einem Vorläufer der alpha-Amylase von *Bacillus licheniformis* durch ortsspezifische Substitution einer Aminosäure an Position M + 15 abgeleitet ist, und
 - (b) einer alpha-Amylase, welche das Expressionsprodukt einer mutierten DNA-Sequenz ist, welche eine alpha-Amylase codiert, wobei die mutierte DNA-Sequenz von einem Vorläufer der alpha-Amylase, welche eine alpha-Amylase von *Bacillus* ist, durch ortsspezifische Substitution eines Methioninrestes, der in der Position in entweder der primären oder tertiären Struktur M + 15 in der alpha-Amylase von *Bacillus licheniformis* entspricht, abgeleitet ist,
 wobei die genannte alpha-Amylase ein verändertes pH- und/oder Temperaturleistungsprofil zeigt, wenn sie mit dem Wildtyp der *Bacillus*-alpha-Amylase verglichen wird;
 wobei die substituierende Aminosäure Val ist.
2. Alpha-Amylasemutante nach Anspruch 1, umfassend weiterhin eine oder mehrere ortsspezifische Mutationen.
3. Alpha-Amylasemutante nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei der Vorläufer alpha-Amylase von *Bacillus licheniformis* ist.
4. DNA, die für eine alpha-Amylasemutante nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3 codiert.
5. Expressionsvektoren, welche DNA nach Anspruch 4 codieren.
6. Wirtszellen, welche mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 5 transformiert sind.

7. Detergenzzusammensetzung, umfassend eine alpha-Amylasemutante nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3.
8. Detergenzzusammensetzung nach Anspruch 7, welche eine flüssige, gelförmige oder granuläre Zusammensetzung ist.
9. Detergenzzusammensetzung nach Anspruch 7 oder Anspruch 8, umfassend weiterhin ein oder mehrere zusätzliche Enzyme.
10. Stärkeverflüssigende Zusammensetzung, umfassend eine alpha-Amylasemutante nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 3.
11. Verfahren zur Veränderung des pH- und/oder Temperaturleistungsprofils einer alpha-Amylase von Bacillus, umfassend die Schritte:
(a) Bereitstellen einer Vorläufer-DNA-Sequenz, welche einen Vorläufer der alpha-Amylase von Bacillus licheniformis codiert, und Modifizieren der genannten Vorläufer-DNA-Sequenz, um eine mutierte DNA-Sequenz zu erhalten, die eine mutierte alpha-Amylase codiert, welche sich von dem genannten Vorläufer der alpha-Amylase durch ortsspezifische Substitution einer Aminosäure an Position M + 15 unterscheidet, oder
(b) Bereitstellen einer Vorläufer-DNA-Sequenz, welche einen Vorläufer der alpha-Amylase aus einem Bacillus codiert, und Modifizieren der genannten Vorläufer-DNA-Sequenz, um eine mutierte DNA-Sequenz zu erhalten, die eine mutierte alpha-Amylase codiert, welche sich von dem genannten Vorläufer der alpha-Amylase durch ortsspezifische Substitution eines Methioninrestes, der in der Position in entweder der primären oder tertiären Struktur M + 15 in der alpha-Amylase von Bacillus licheniformis entspricht, unterscheidet; und Expression der genannten mutierten alpha-Amylase aus der genannten mutierten DNA-Sequenz, wobei die genannte mutierte alpha-Amylase ein verändertes pH- und/oder Temperaturleistungsprofil zeigt, wenn sie mit dem Vorläufer der Bacillus-alpha-Amylase verglichen wird, wobei die substituierende Aminosäure Thr ist.
12. Verfahren nach Anspruch 11, umfassend weiterhin Modifizieren der genannten Vorläufer-DNA-Sequenz derart, dass die mutierte alpha-Amylase eine oder mehrere andere ortsspezifische Mutationen umfasst.
13. Verfahren nach Anspruch 11 oder Anspruch 12, wobei der Vorläufer alpha-Amylase von Bacillus licheniformis ist.
14. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 11 bis 13, weiterhin umfassend Formulierung der mutierten alpha-Amylase in eine Detergenzzusammensetzung.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Detergenzzusammensetzung eine flüssige, gelförmige oder granuläre Zusammensetzung ist.
16. Verfahren nach Anspruch 14 oder Anspruch 15, wobei die Detergenzzusammensetzung weiterhin ein oder mehrere zusätzliche Enzyme umfasst.
17. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 11 bis 13, weiterhin umfassend Formulierung der mutierten alpha-Amylase in eine Zusammensetzung zur Verflüssigung von Stärke.
18. Detergenzzusammensetzung, welche eine alpha-Amylasemutante und ein oder mehrere zusätzliche Enzyme umfasst, wobei die alpha-Amylasemutante ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus
(a) einer alpha-Amylase, welche das Expressionsprodukt einer mutierten DNA-Sequenz ist, welche eine alpha-Amylase codiert, wobei die mutierte DNA-Sequenz von einem Vorläufer der alpha-Amylase von Bacillus licheniformis durch ortsspezifische Substitution einer Aminosäure an Position M + 15 abgeleitet ist, und
(b) einer alpha-Amylase, welche das Expressionsprodukt einer mutierten DNA-Sequenz ist, welche eine alpha-Amylase codiert, wobei die mutierte DNA-Sequenz von einem Vorläufer der alpha-Amylase, welche eine alpha-Amylase von Bacillus ist, durch ortsspezifische Substitution eines Methioninrestes, der in der Position in entweder der primären oder tertiären Struktur M + 15 in der alpha-Amylase von Bacillus licheniformis entspricht, abgeleitet ist,
wobei die genannte alpha-Amylase ein verändertes pH- und/oder Temperaturleistungsprofil zeigt, wenn sie mit dem Wildtyp der Bacillus-alpha-Amylase verglichen wird;
wobei die substituierende Aminosäure Leu, Thr, Asn, Asp, Ser, Val oder Ile ist.
19. Detergenzzusammensetzung nach Anspruch 18, wobei die genannte alpha-Amylasemutante M15L ist.

20. Detergenzzusammensetzung nach Anspruch 18 oder Anspruch 19, wobei die genannte alpha-Amylasemutante eine oder mehrere andere ortsspezifische Mutationen umfasst.

21. Detergenzzusammensetzung wie in irgendeinem der Ansprüche 18 bis 20 beansprucht, wobei das zusätzliche Enzym oder die Enzyme ausgewählt sind aus der Gruppe, bestehend aus Amylase, Proteasen, Lipasen und Cellulasen.

22. Verfahren zum Verflüssigen einer granulären Stärkeaufschlämmung aus entweder einem Nass- oder Trockenmahlverfahren bei einem pH von etwa 4 bis etwa 6, umfassend:

- (a) Zugabe einer wirksamen Menge einer alpha-Amylasemutante zu der Aufschlämmung;
- (b) gegebenenfalls Zugabe einer wirksamen Menge eines Antioxidationsmittels zu der Aufschlämmung; und
- (c) Umsetzen der Aufschlämmung für eine geeignete Zeit und bei einer geeigneten Temperatur, um die Stärke zu verflüssigen;

wobei die genannte alpha-Amylasemutante ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus:

- (a) einer alpha-Amylase, welche das Expressionsprodukt einer mutierten DNA-Sequenz ist, welche eine alpha-Amylase codiert, wobei die mutierte DNA-Sequenz von einem Vorläufer der alpha-Amylase von *Bacillus licheniformis* durch ortsspezifische Substitution einer Aminosäure an Position M + 15 abgeleitet ist, und
- (b) einer alpha-Amylase, welche das Expressionsprodukt einer mutierten DNA-Sequenz ist, welche eine alpha-Amylase codiert, wobei die mutierte DNA-Sequenz von einem Vorläufer der alpha-Amylase, welche eine alpha-Amylase von *Bacillus* ist, durch ortsspezifische Substitution eines Methioninrestes, der in der Position in entweder der primären oder tertiären Struktur M + 15 in der alpha-Amylase von *Bacillus licheniformis* entspricht, abgeleitet ist,

wobei die genannte alpha-Amylase ein verändertes pH- und/oder Temperaturleistungsprofil zeigt, wenn sie mit dem Wildtyp der *Bacillus*-alpha-Amylase verglichen wird;

wobei die substituierende Aminosäure Leu, Asn, Asp, Ser, Val oder Ile ist.

23. Zusammensetzung zur Verflüssigung von Stärke, welche eine alpha-Amylasemutante umfasst, wobei die genannte alpha-Amylasemutante ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus:

- (a) einer alpha-Amylase, welche das Expressionsprodukt einer mutierten DNA-Sequenz ist, welche eine alpha-Amylase codiert, wobei die mutierte DNA-Sequenz von einem Vorläufer der alpha-Amylase von *Bacillus licheniformis* durch ortsspezifische Substitution einer Aminosäure an Position M + 15 abgeleitet ist, und
- (b) einer alpha-Amylase, welche das Expressionsprodukt einer mutierten DNA-Sequenz ist, welche eine alpha-Amylase codiert, wobei die mutierte DNA-Sequenz von einem Vorläufer der alpha-Amylase, welche eine alpha-Amylase von *Bacillus* ist, durch ortsspezifische Substitution eines Methioninrestes, der in der Position in entweder der primären oder tertiären Struktur M + 15 in der alpha-Amylase von *Bacillus licheniformis* entspricht, abgeleitet ist,

wobei die genannte alpha-Amylase ein verändertes pH- und/oder Temperaturleistungsprofil zeigt, wenn sie mit dem Wildtyp der *Bacillus*-alpha-Amylase verglichen wird;

wobei die substituierende Aminosäure Leu, Asn, Asp, Ser, Val oder Ile ist.

24. Zusammensetzung zur Verflüssigung von Stärke nach Anspruch 23, wobei die genannte alpha-Amylase M15L ist.

Es folgen 18 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

10 30 50
 AGCTTGAAGAAGTGAAGAAGCAGAGAGGCTATTGAATAAATGAGTAGAAAGCGCCATATC
 70 90 110
 GGCGCTTTTCTTTTGAAGAAAATATAGGGAAAATGGTACTTGTTAAAAATTCGGAATAT
 130 150 170
 TTATACAACATCATATGTTTCACATTGAAAGGGGAGGAGAATCATGAAACAACAAAAACG
 M K Q Q K R
 190 210 230
 GCTTTACGCCCGATTGCTGACGCTGTTATTTGCGCTCATCTTCTTGCTGCCTCATTCTGC
 L Y A R L L T L L F A L I F L L P H S A
 250 270 290
 AGCAGCGGCGGCAAATCTTAATGGGACGCTGATGCAGTATTTTGAATGGTACATGCCCAA
 A A A A N L N G T L M Q Y F E W Y M P N
 310 330 350
 TGACGGCCAAACATTGGAAGCGTTTGCAAAACGACTCGGCATATTTGGCTGAACACGGTAT
 D G Q H W K R L O N D S A Y L A E H G I
 370 390 410
 TACTGCCGTCTGGATTCCCCCGGCATATAAGGGAACGAGCCAAGCGGATGTGGGCTACGG
 T A V W I P P A Y K G T S O A D V G Y G
 430 450 470
 TGCTTACGACCTTTATGATTTAGGGGAGTTTCATCAAAAAGGGACGGTTCGGACAAAGTA
 A Y D L Y D L G E F H Q K G T V R T K Y
 490 510 530
 CGGCACAAAAGGAGAGCTGCAATCTGCGATCAAAAAGTCTTCATTCCCGCGACATTAACGT
 G T K G E L O S A I K S L H S R D I N V
 550 570 590
 TTACGGGGATGTGGTCATCAACCACAAAGGCGGCGCTGATGCGACCGAAGATGTAACCGC
 Y G D V V I N H K G G A D A T E D V T A
 610 630 650
 GGTGAAGTCGATCCCGCTGACCGCAACCGCGTAATTTGAGGAGAACACCTAATTAAAGC
 V E V D P A D R N R V I S G E H L I K A
 670 690 710
 CTGGACACATTTTCATTTTCCGGGGCGCGGCAGCACATACAGCGATTTTAAATGGCATTG
 W T H F H F P G R G S T Y S D F K W H W
 730 750 770
 GTACCATTTTGACGGAACCGATTGGGACGAGTCCCGAAAGCTGAACCGCATCTATAAGTT
 Y H F D G T D W D E S R K L N R I Y K F
 790 810 830
 TCAAGGAAAGGCTTGGGATTGGGAAGTTTCCAATGAAAACGGCAACTATGATTATTTGAT
 O G K A W D W E V S N E N G N Y D Y L M

FIG. 1A

```

      850              870              890
GTATGCCGACATCGATTATGACCATCCTGATGTCGCAGCAGAAATTAAGAGATGGGGCAC
Y A D I D Y D H P D V A A E I K R W G T

      910              930              950
TTGGTATGCCAATGAACTGCAATTGGACGGTTTCCGTCTTGATGCTGTCAAACACATTAA
W Y A N E L Q L D G F R L D A V K H I K

      970              990              1010
ATTTTCTTTTTTTCGCGGATTGGGTAAATCATGTCAGGGAAAAAACGGGGAAGGAAATGTT
F S F L R D W V N H V R E K T G K E M F

      1030             1050             1070
TACGGTAGCTGAATATTGGCAGAATGACTTGGGCGCTCTGGAAAACTATTTGAACAAAAC
T V A E Y W Q N D L G A L E N Y L N K T

      1090             1110             1130
AAATTTTAATCATTCAAGTGTGTTGACGTGCCGCTTCATTATCAGTTCCATGCTGCATCGAC
N F N H S V F D V P L H Y O F H A A S T

      1150             1170             1190
ACAGGGAGGCGGCTATGATATGAGGAAATTGCTGAACGGTACGGTCGTTTCCAAGCATCC
O G G G Y D M R K L L N G T V V S K H P

      1210             1230             1250
GTTGAAATCGGTTACATTTGTCGATAACCATGATACACAGCCGGGGCAATCGCTTGAGTC
L K S V T F V D N H D T O P G O S L E S

      1270             1290             1310
GACTGTCCAAACATGGTTTAAGCCGCTTGCTTACGCTTTTATTCTCACAAGGGAATCTGG
T V Q T W F K P L A Y A F I L T R E S G

      1330             1350             1370
ATACCCTCAGGTTTTCTACGGGGATATGTACGGGACGAAAGGAGACTCCCAGCGCGAAAT
Y P Q V F Y G D M Y G T K G D S O R E I

      1390             1410             1430
TCCTGCCTTGAAACACAAAATTGAACCGATCTTAAAACGCAGAAAACAGTATGCGTACGG
P A L K H K I E P I L K A R K O Y A Y G

      1450             1470             1490
AGCACAGCATGATTATTTTCGACCACCATGACATTGTCGGCTGGACAAGGGAAGGCGACAG
A Q H D Y F D H H D I V G W T R E G D S

      1510             1530             1550
CTCGGTTGCAAATTCAGGTTTGGCGGCATTAATAACAGACGGACCCGGTGGGGCAAAGCC
S V A N S G L A A L I T D G P G G A K R

      1570             1590             1610
AATGTATGTCGGCCGGCAAACGCCGGTGAGACATGGCATGACATTACCGGAAACCGTTC
M Y V G R Q N A G E T W H D I T G N R S

      1630             1650             1670
GGAGCCGGTTGTCATCAATTCGGAAGGCTGGGGAGAGTTTCACGTAAACGGCGGGTCCGGT
E P V V I N S E G W G E F H V N G G S V

```

FIG. 1B

1690 1710 1730
 TTCAATTTATGTTCAAAGATAGAAGAGCAGAGAGGACGGATTTCTGAAGGAAATCCGTT
 S I Y V Q R
 1750 1770 1790
 TTTTATTTTGCCCGTCTTATAAATTTCTTTGATTACATTTTATAATTAATTTTAACAAA
 1810 1830 1850
 GTGTCATCAGCCCTCAGGAAGGACTTGCTGACAGTTTGAATCGCATAGGTAAGGCGGGGA
 1870 1890 1910
 TGAAATGGCAACGTTATCTGATGTAGCAAAGAAAGCAAATGTGTCGAAAATGACGGTATC
 1930 1950
 GCGGGTGATCAATCATCCTGAGACTGTGACGGATGAATTGAAAAAGCT

FIG. 1C

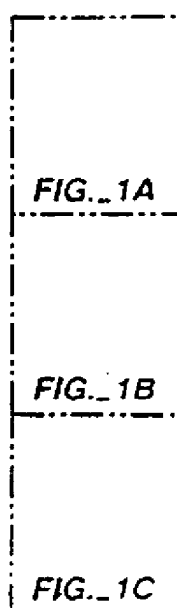


FIG. 1

10 30 50
ANLNGTLMQYFEWYMPNDGOHWKRLONDSAYLAEHGITAVWIPPAYKGT SQADVGYGAYD

70 90 110
LYDLGEFHQKGTVRTKYGTKGELOSAIKSLHSRDINVYGDVVINHKGGADATEDVTAVEV

130 150 170
DPADRNRVISGEHLIKAWTHFHFPGRGSTYSDFKWHWYHFDGTDWDESRKLNRIYKFQ GK

190 210 230
AWDWEVSNENGN DYLMYADIDYDHPDVAAEIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSF

250 270 290
LRDWVNVHVREKTGKEMFTVAEYWQNDLGALENYLNKTNFNHSVFDVPLHYQFHAAS TOGG

310 330 350
GYDMRKLLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTQPGOSLESTVOTWFKPLAYAFILTRESGYPO

370 390 410
VFYGD MYGT KGDSOREIPALKHKIEPILKARKOYAYGAQH DYFDHHDIVGWTREGDSSVA

430 450 470
NSGLAALITDGP GGAKRMYVGRONAGETWHDITGNRSEPVVINSEGWGEFHVNGG SVSIY

VQR

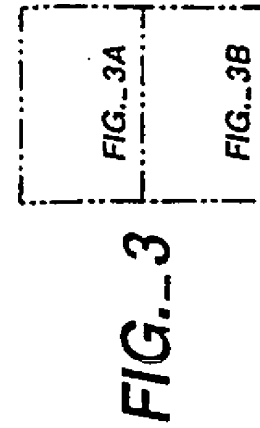
FIG._2

Am-Lich = <i>B. Licheniformis</i>	Am-Amylo = <i>B. amyloliquefaciens</i>	Am-Stearo = <i>B. stearothermophilus</i>
1 Am-Lich Am-Amylo Am-Stearo	1MKQQ MRGRGNMIQKVLT	1SAAAPITK FCPTGRHAKA
61 Am-Lich Am-Amylo Am-Stearo	61 QIIWKRIQNDS QIIWKRIQNDA TLWTKVANE	60 AANLNGTLMQ TSAVNGTLMQ AAPFNGTMMQ
121 Am-Lich Am-Amylo Am-Stearo	121 AYLAEIHGITA LHLSDIGITA NNLSSLGITA	79 SQADVGYGAY SQSDNGYGIV SRSDVGYGVY
181 Am-Lich Am-Amylo Am-Stearo	181 KGELOSAIKS KSELODAIGS KAQYLOAIQA	139 DATEDVTAVE DATEDVTAVE DGETEWDVAE
241 Am-Lich Am-Amylo Am-Stearo	241 YDFHFPGRGST YDFHFPGRGNT KDFDFPGRGNT	197 NENGNVDYLM SENGNYDYLM TENGNVDYLM
301 Am-Lich Am-Amylo Am-Stearo	301 YADIDYDHPD YADVDYDHPD YADLDMDHPE	257 VREKTGKEMF VRQATGKEMF VRSOTGKPLF
360 Am-Lich Am-Amylo Am-Stearo	360 TVAEYWONDL TVAEYWONNA TVGEYWSYDI	317 LNGTVVSKHP LDGTVVSRHP MTNTLMKDQP

FIG._3A

Am-Lich	361	LKSVTFVDNH	DTQPGQSLES	TVQTWFKPLA	YAFILTRESSG	YPOVFYGDYMY	GTKGDSQREI	377
Am-Amylo		EKAVTFVENH	DTQPGQSLES	TVQTWFKPLA	YAFILTRESSG	YPOVFYGDYMY	GTKGTSPKEI	420
Am-Slearo		TLAVTFVDNH	DTNPAKR..CS	HGRPWFKPLA	YAFILTROEG	YPCVFYGDYY	GI.....POYNI	
Am-Lich	421	PALKHKIEPI	LKARKQYAYG	AQHDYFDIHD	IVGWTREGDS	SVANSGLAAL	ITDGPGGAKR	437
Am-Amylo		PSLKDNIEPI	LKARKEYAYG	POHDYIDHPD	VIGWTREGDS	SAAKSGLAAL	ITDGPGGSKR	480
Am-Slearo		PSLKSIDPL	LIARRDYAYG	TOHDYLDHSD	IIGWTREGV1	EKPGSGLAAL	ITDGAGRSKW	
Am-Lich	481	MYVGRONAGE	TWHDITGNRS	EPVVINSEGW	GEFHVNGGSV	SIYVQR.....		540
Am-Amylo		MYAGLKNAGE	TWYDITGNRS	DTVKIGSDGW	GEFHVNDGSV	SIYVQK.....		
Am-Slearo		MYVKGQHAGK	VFYDLTGNRS	DTVTINSDGW	GEFKVNGGSV	SVWVPRKTTV	STIARPITTA	
Am-Lich	541							
Am-Amylo								
Am-Slearo		PWTGEFVRWH	EPRLVAWP*					

FIG._3B



10 30 50
 ANLNGTLMQYFEWYMPNDGOHWKRLQND SAYLA EHGITAVWIPPAYKGT SOADVGYGAYD
 70 90 110
 LYDLGEFHQKGTVRTKYGTKGELOSAIKSLHSRDINVYGDVVINHKGGADATEDVTAVEV
 130 150 170
 DPADRNRVISGEHLIKAWTHFHFPGRGSTYSDFKWHWYHFDGTDWDESRKLNRIYKFOGK
 190 210 230
 AWDWEVSNENGNYDYLT_YADIDYDHPDVAAEIKRWGTWYANELOLDGFRLDAVKHIKFSF
 250 270 290
 LRDWVNVHVREKTGKEMFTVAEYWOND LGALENYLNKTN FNHSVFDVPLHYQFHAASTQGG
 310 330 350
 GYDMRKLLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTOPGOSLESTVOTWFKPLAYAFILTRESGYPO
 370 390 410
 VFYGD MYG TKGDSQREIPALKHKIEPILKARKOYAYGAOH DYFDHHDIVGWTREGDSSVA
 430 450 470
 NSGLAALITDGP GGAKRMYVGRONAGETWHDITGNRSEPVVINSEGWGEFHVNGGSVSIY
 VQR

FIG._4a

ANLNGTLMQYFEWYMPNDGOHWKRLQND SAYLA EHGITAVWIPPAYKGT SQADVGYGAYD
 LYDLGEFHQKGTVRTKYGTKGELOSAIKSLHSRDINVYGDVVINHKGGADATEDVTAVEV
 DPADRN RVISGEHLIKAWTHFHFPGRGSTYSDFKWHWYHFDGTDWDESRKLNRIYKFOGK
 AWDWEVSNENGN YDYLMYADIDYDHPDVAAEIKRWGTWYANELOLDGFRLDAVKHIKFSF
 LRDWVNHVREKTGKEMFTVAEYWONDLGALENYLNKTNFNHVSF DVPLHYOFHAASTOGG
 GYDMRKLLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTOPGOSLESTVOTWFKPLAYAFILTRESGYPO
 VFYGD MYGTKGDSOREIPALKHKIEPILKARKOYAYGAOHDYFDHHDIVGWTREGDSSVA
 NSGLAALITDGP GGAKRMYVGRONAGETWHDITGNRSEPVVINSEGWGEFHVNGG SVSIY
 VQR

FIG. 4b

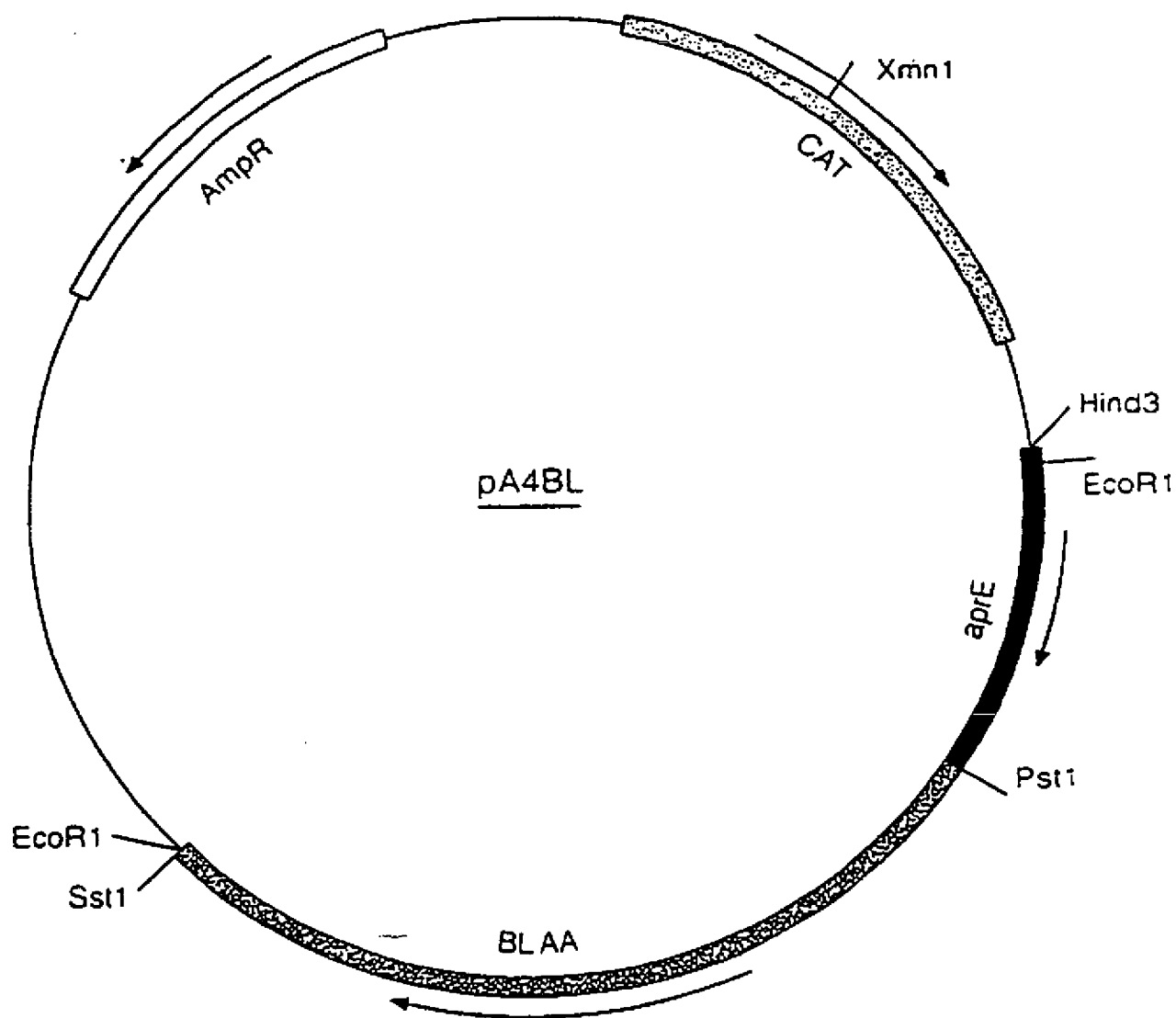


FIG. 5

VERBINDUNGEN SIGNALSEQUENZ-REIFES PROTEIN IN:

B. licheniformis-alpha-Amylase (PstI)
 MKQOKRLTARLLTLLFALIFLLPHSA[↓]AAA[ANL.....
 N-Terminus

B. subtilis alkalische Protease aprE (PstI)
 MRSKTLWISLLFALTLLIFTMAFSNMSAOA[↓]AGKS.....
 N-Terminus

B. licheniformis-alpha-Amylase pA4BL (PstI)
 MRSKTLWISLLFALTLLIFTMAFSNMSAOA[↓]AAAAAN.
 N-Terminus

B. licheniformis-alpha-Amylase pBLapr
 MRSKTLWISLLFALTLLIFTMAFSNMSAOA[ANL.....
 N-Terminus

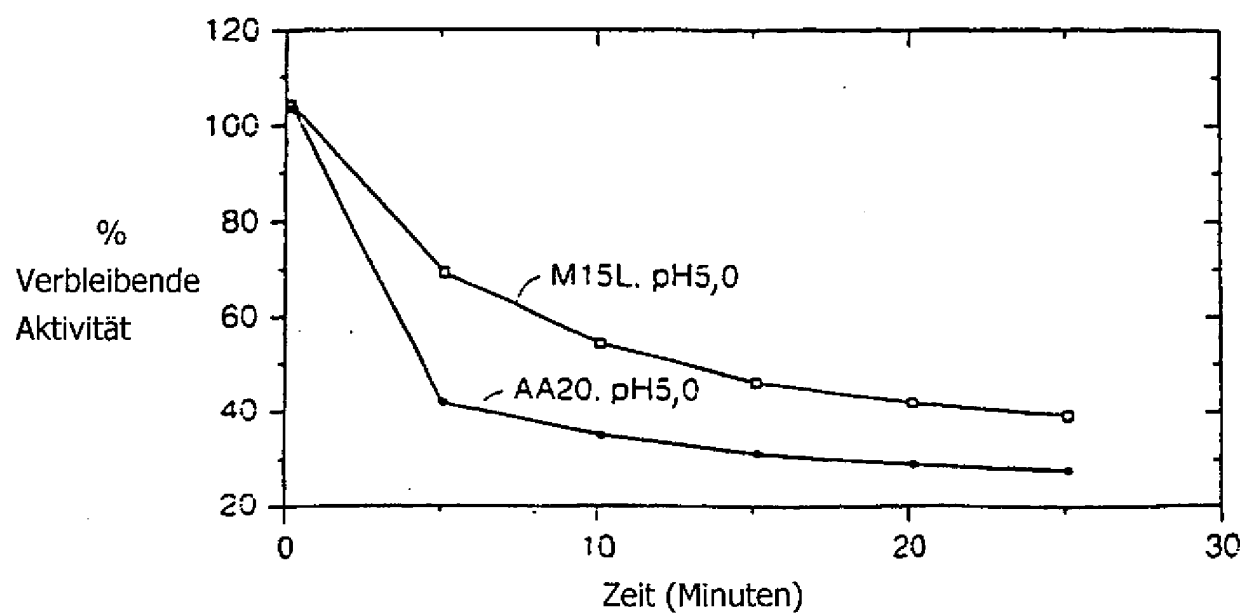
(PstI) zeigt den Ort der Restriktionsstelle in dem Gen an.

↓

[

N-Terminus zeigt die Spaltungsstelle zwischen dem Signalpeptid und dem sezerniert Protein an.

FIG._6

FIG. 7

11/22

FIG. 8

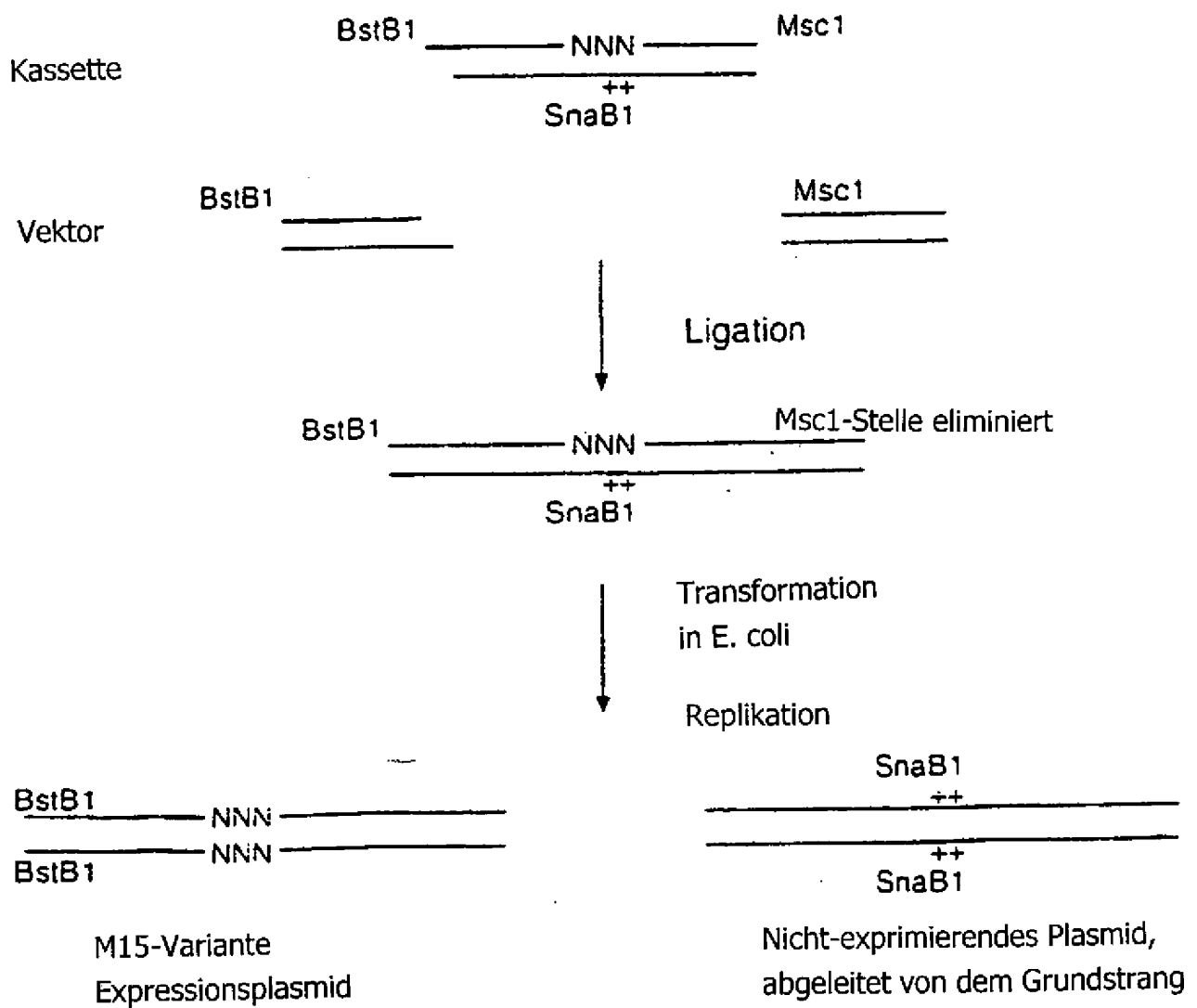


FIG._9

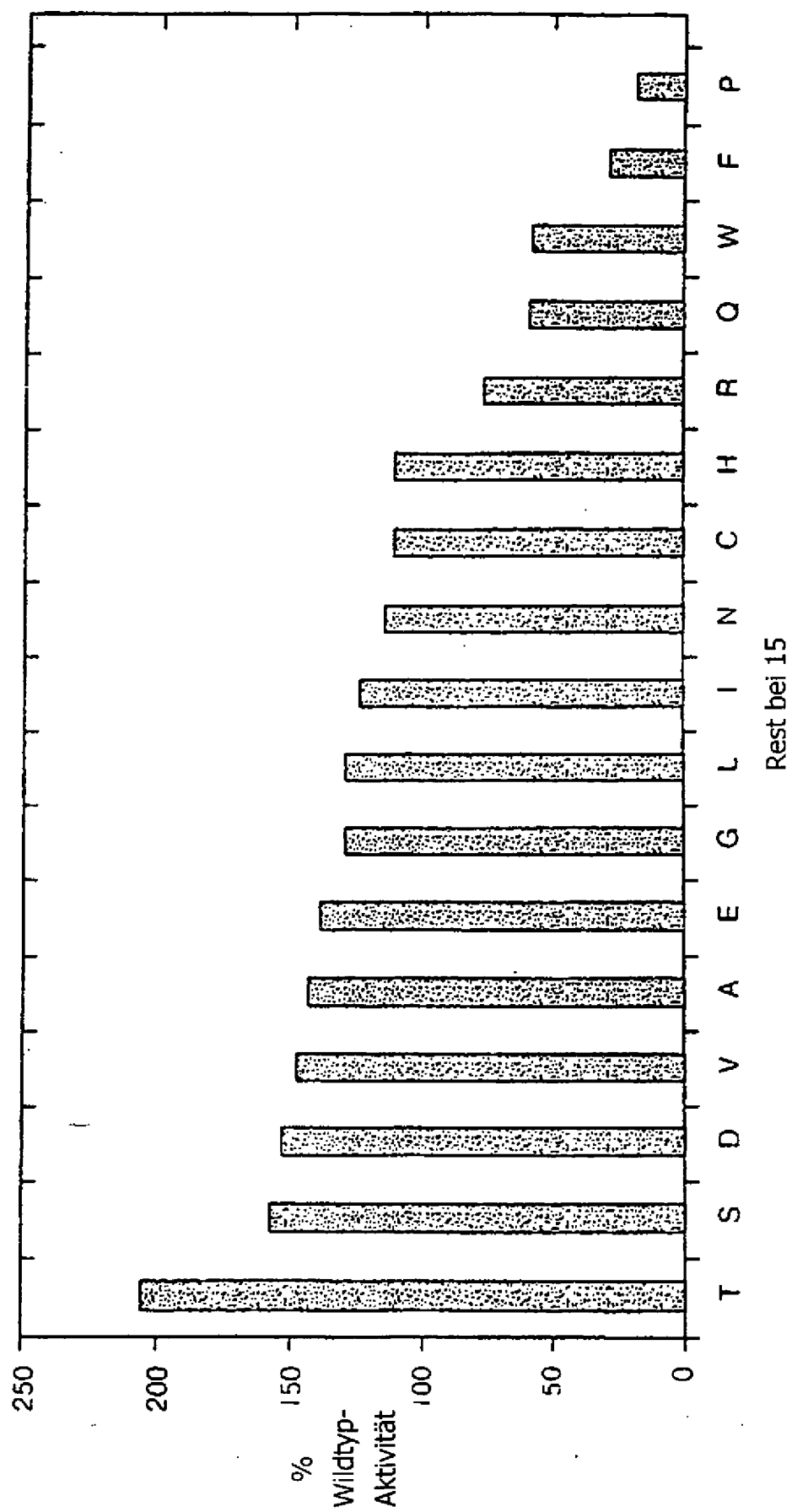


FIG. 10

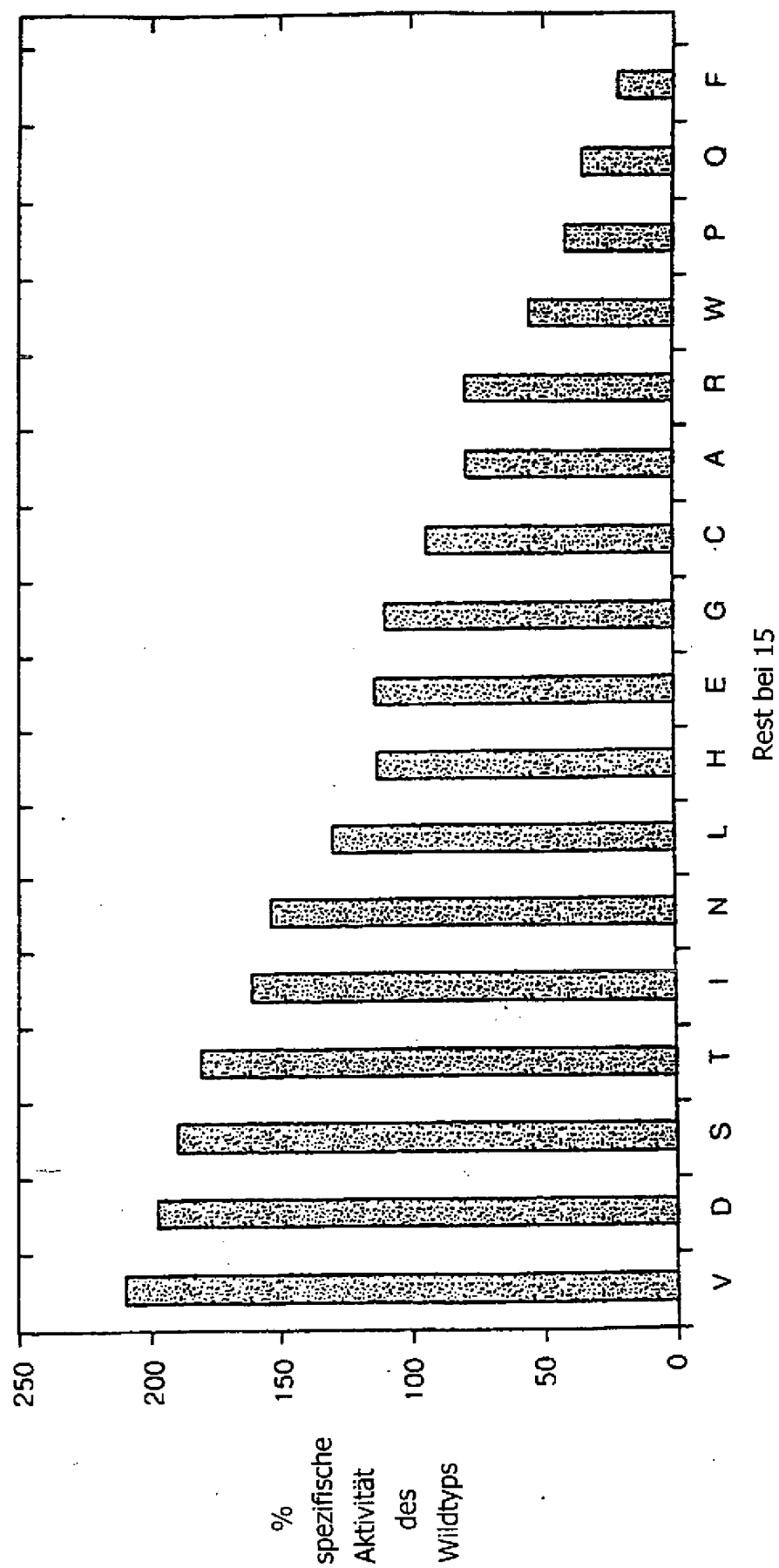


FIG. 12

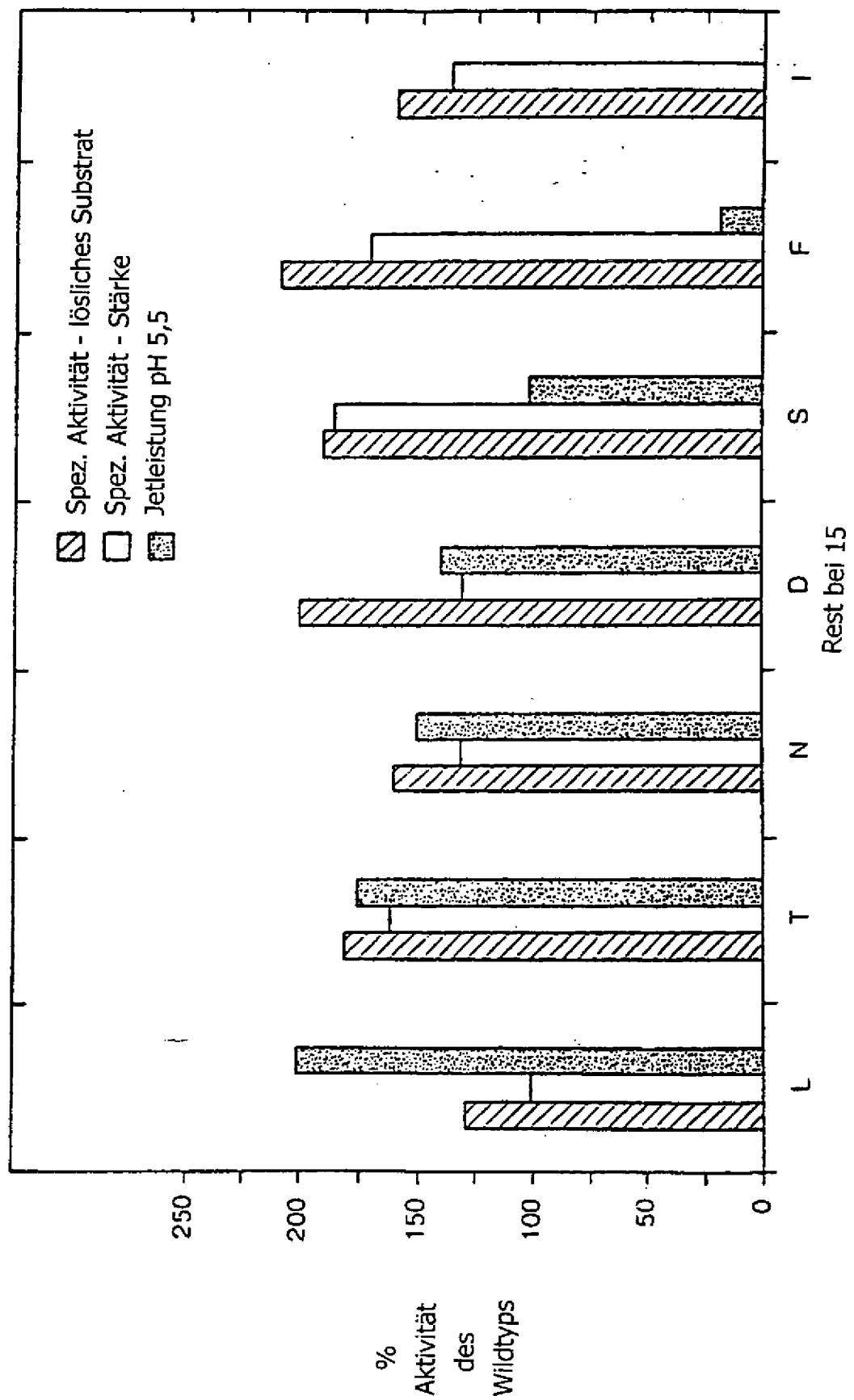


FIG._11

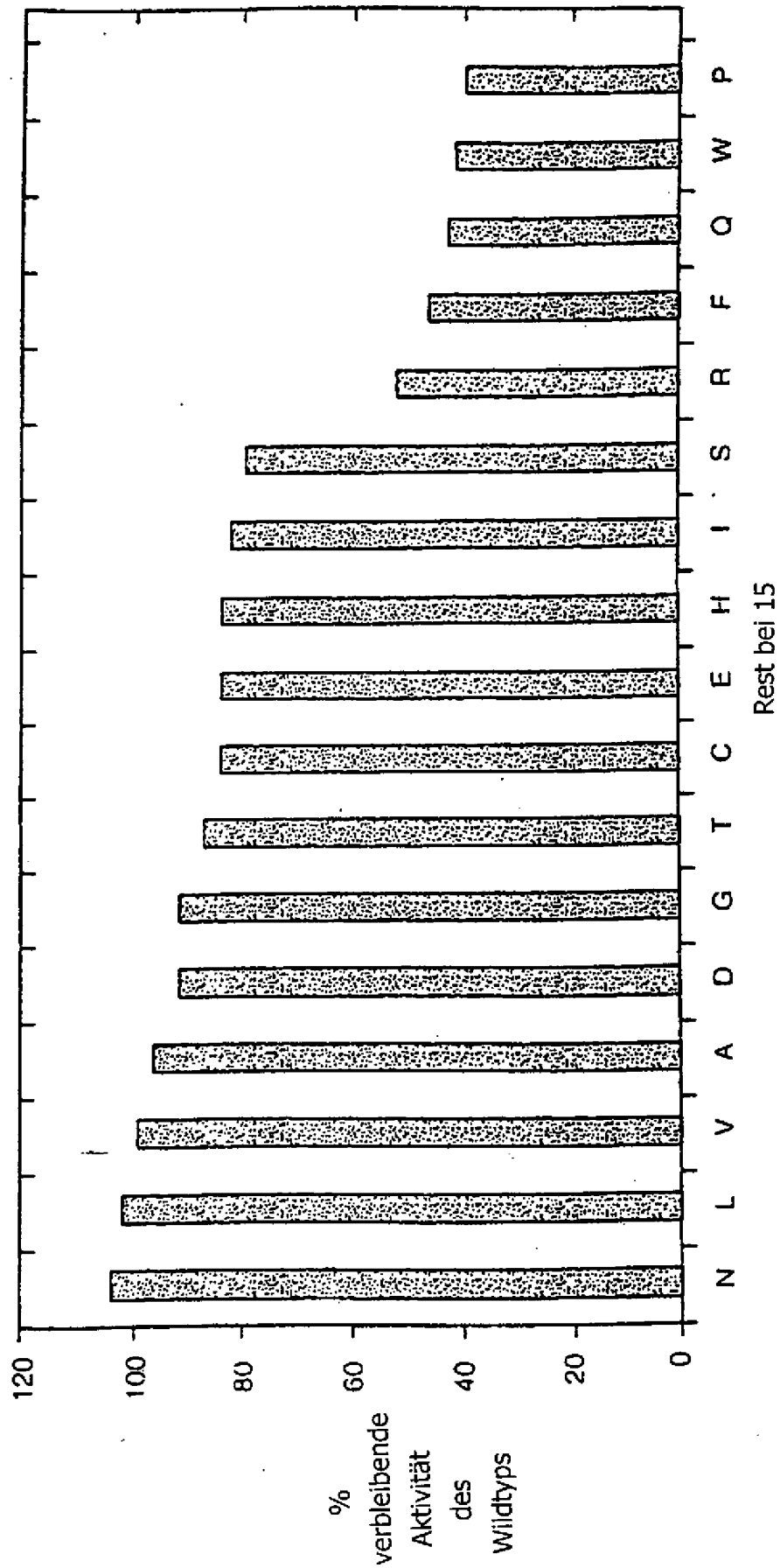


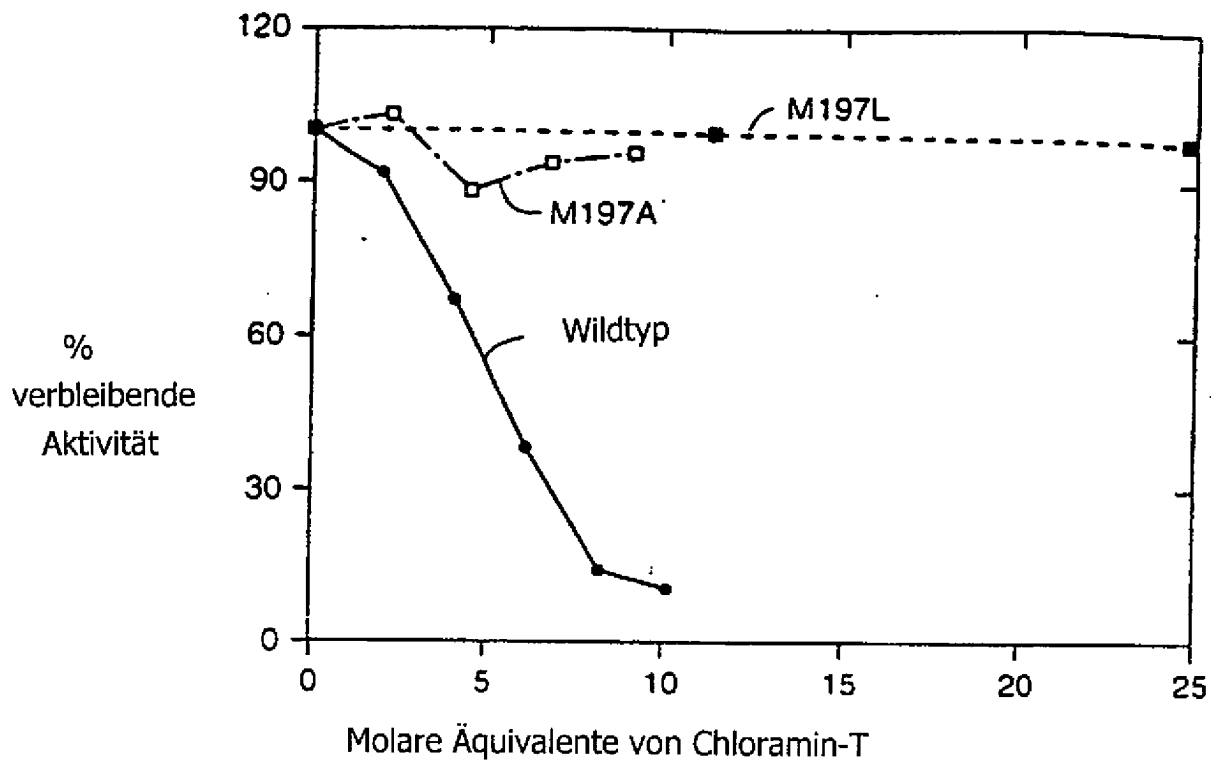
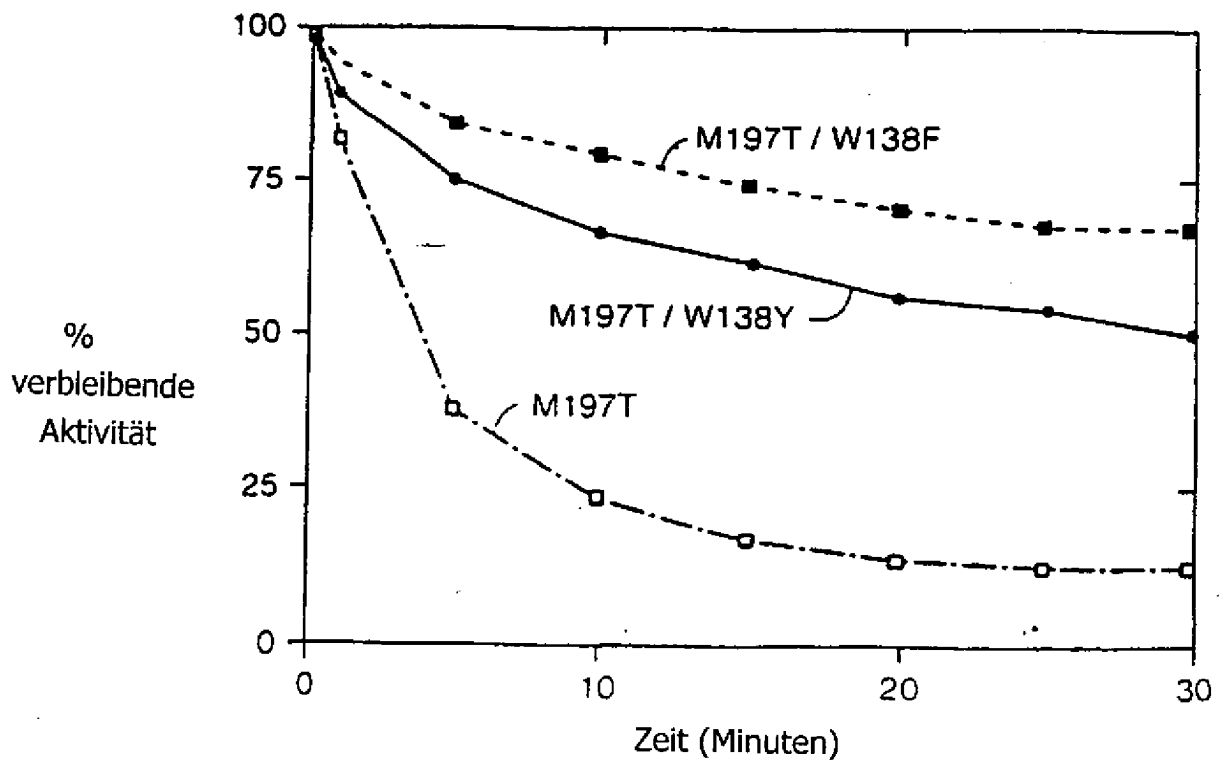
FIG. 13**FIG. 15**

FIG. 14

