



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 600 34 558 T2 2007.12.27

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 165 762 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 600 34 558.0

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/DK00/00148

(96) Europäisches Aktenzeichen: 00 912 415.7

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 2000/060059

(86) PCT-Anmeldetag: 28.03.2000

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 12.10.2000

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 02.01.2002

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 25.04.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 27.12.2007

(51) Int Cl.⁸: C12N 9/28 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

99437 30.03.1999 DK

(73) Patentinhaber:

Novozymes A/S, Bagsvaerd, DK

(74) Vertreter:

Patentanwälte Isenbruck Bösl Hörschler
Wichmann Huhn, 81675 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

ANDERSEN, Carsten, DK-3500 Værloese, DK;
JOERGENSEN, Christel Thea, DK-2100
Copenhagen O, DK; BISGARD-FRANTZEN,
Henrik, DK-2880 Bagsvaerd, DK; SVENDSEN,
Allan, DK-3460 Birkeroed, DK; KJAERULFF,
Soeren, DK-2720 Vanloese, DK

(54) Bezeichnung: ALPHA-AMYLASE-VARIANTEN

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

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

Beschreibung**GEBIET DER ERFINDUNG**

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft unter anderem neue Varianten der ursprünglichen Termamyl-ähnlichen alpha-Amylase, insbesondere Varianten, die veränderte Eigenschaften zeigen, insbesondere ein geändertes Spaltmuster (relativ zum ursprünglichen), die im Hinblick auf die Anwendung der Varianten vorteilhaft sind, insbesondere bei der industriellen Stärkeverarbeitung (z.B. Stärkeverflüssigung oder Verzuckerung).

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Alpha-Amylasen (alpha-1,4-Glucan-4-glucanhydrolasen, EC 3.2.1.1) stellen eine Gruppe von Enzymen dar, die die Hydrolyse von Stärke und anderen linearen und verzweigten 1,4-glycosidischen Oligo- und Polysacchariden katalysieren.

[0003] Es gibt eine sehr große Menge von Patentliteratur und wissenschaftlicher Literatur, die sich auf diese industriell wichtige Klasse von Enzymen beziehen. Eine Anzahl von alpha-Amylasen, wie die Termamyl-ähnlichen alpha-Amylase-Varianten sind bekannt, z.B. aus WO 90/11352, WO 95/10603, WO 95/26397, WO 96/23873, WO 96/23874 und WO 97/41213.

[0004] Unter den neueren Veröffentlichungen, die sich auf alpha-Amylasen beziehen, stellt die WO 96/23874 die dreidimensionalen Röntgenkristallstrukturdaten für die Termamyl-ähnliche alpha-Amylase bereit, die als BA2 bezeichnet wird, die aus den 300 N-terminalen Aminosäureresten der alpha-Amylase von *B. amyloliquefaciens*, die die hier in SEQ ID Nr. 6 gezeigte Aminosäuresequenz umfasst, und Aminosäuren 301–483 des C-terminalen Endes der *B. licheniformis*-alpha-Amylase, die die hier in SEQ ID Nr. 4 gezeigte Aminosäuresequenz umfasst (letztere ist kommerziell unter der Marke Termamyl™ erhältlich), besteht, und die somit eng mit der industriell wichtigen *Bacillus*-alpha-Amylase verwandt ist (die im vorliegenden Kontext von der Bedeutung des Ausdrucks „Termamyl-ähnliche alpha-Amylase“ umfasst wird und die unter anderem die alpha-Amylase von *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* und *B. stearothermophilus* umfasst.) Die WO 96/23874 beschreibt weiterhin die Methodik zur Konstruktion, auf der Basis einer Analyse der ursprünglichen Termamyl-ähnlichen alpha-Amylase, von Varianten der ursprünglichen Termamyl-ähnlichen alpha-Amylase, die relativ zur Ursprünglichen veränderte Eigenschaften zeigt.

[0005] Die WO 96/23874 und die WO 97/41213 (Novo Nordisk) offenbaren Termamyl-ähnliche alpha-Amylasevarianten mit einem geänderten Spaltmuster, die Mutationen in den Aminosäureresten V54, D53, Y56, Q333, G57 und A52 der hier in SEQ ID Nr. 4 gezeigten Sequenz aufweisen.

KURZE OFFENBARUNG DER ERFINDUNG

[0006] Die vorliegende Erfindung betrifft alpha-Amylasen, wie sie in Anspruch 1 definiert sind, die in Verbindung mit der industriellen Verarbeitung von Stärke (Stärkeverflüssigung, Verzuckerung und dergleichen) vorteilhaft sind.

[0007] Die Erfinder habe überraschenderweise Varianten mit geänderten Eigenschaften gefunden, insbesondere einem geänderten Spaltmuster, die eine verbesserte verminderte Fähigkeit zur Spaltung eines Substrates nahe dem Verzweigungspunkt aufweisen, und ferner eine verbesserte Substratspezifität und/oder einer verbesserte spezifische Aktivität haben, verglichen mit den in WO 96/23874 und WO 97/41213 (Novo Nordisk) offenbarten Termamyl-ähnlichen alpha-Amylasevarianten mit einem geänderten Spaltmuster, die Mutationen in den Aminosäureresten V54, D53, Y56, Q333, G57 und A52 der hier gezeigten SEQ ID Nr. 4 Sequenz haben.

[0008] Die Erfindung betrifft ferner DNA-Konstrukte, die die alpha-Amylasen der Erfindung kodieren, rekombinante Expressionsvektoren, die das DNA-Konstrukt tragen, Zellen, die mit dem DNA-Konstrukt transformiert sind, Zusammensetzungen, die die alpha-Amylase der Erfindung umfassen, und die Verwendung der Varianten und Zusammensetzungen der Erfindung, alleine oder in Kombination mit anderen alpha-amylotischen Enzymen, in verschiedenen industriellen Prozessen, z.B. die Stärkeverflüssigung, und in Detergennzzusammensetzungen, wie Waschmittel, Spülmittel und Hartflächen-Haushaltsreiniger, in der Ethanol-Produktion, als Treibstoff, bei der Getränkeethanol-Herstellung und der industriellen Ethanol-Herstellung, beim Entschichten von Textilien, Textilstoffen oder Bekleidung.

Nomenklatur

[0009] In der vorliegenden Beschreibung und den Ansprüchen wird der übliche einbuchstabige oder drei-buchstabige Code für die Aminosäurereste verwendet.

[0010] Für die leichte Bezugnahme werden die alpha-Amylasen der Erfindung unter Verwendung der folgenden Nomenklatur beschrieben:

Originale Aminosäure/n : Position/en : substituierte Aminosäure/n

[0011] Entsprechend dieser Nomenklatur wird beispielsweise die Substitution von Alanin durch Asparagin in Position 30 dargestellt als:

Ala30Asn oder A30N,

eine Deletion von Alanin in der gleichen Position wird dargestellt als

Ala30* oder A30*,

und eine Insertion eines zusätzlichen Aminosäurerestes, wie Lysin, wird dargestellt als

*30aLys oder *30aK.

[0012] Eine Deletion eines konsekutiven Abschnitts von Aminosäureresten, wie die Aminosäurereste 30 – 33, wird als (30 – 33)* oder Δ(A30 – N33) oder delta (A30 – N33) angegeben.

[0013] Wo eine spezielle alpha-Amylase eine „Deletion“ im Vergleich mit einer anderen alpha-Amylase enthält und eine Insertion in einer solchen Position gemacht wird, wird dies wie folgt dargestellt:

*36aASP oder *36aD

für die Insertion von Aspartinsäure in der Position 36.

[0014] Multiple Mutationen werden mit Plus-Zeichen getrennt, d.h.:

Ala30Asp + Glu34Ser oder A30N + E34S

die Mutationen in den Positionen 30 und 34 repräsentiert, die Alanin und Glutaminsäure durch Asparagin bzw. Serin substituieren. Multiple Mutationen können auch wie folgt getrennt werden, d.h. es bedeutet das gleiche wie die Plus-Zeichen:

Ala30Asp/Glu34Ser oder A30N/E34S

[0015] Wenn eine oder mehrere alternative Aminosäurereste in eine vorgegebene Position insertiert werden können, wird dies angegeben als

A30N,E oder

A30N oder A30E.

[0016] Wenn ferner eine für eine Modifikation geeignete Position hier angegeben ist, ohne dass eine spezifische Modifikation vorgeschlagen wird, oder A30X angegeben ist, soll verstanden werden, dass jeder Aminosäurerest durch die Aminosäurereste substituiert werden kann, die in der Position vorliegen. Wenn somit eine Modifikation eines Alanins in der Position 30 erwähnt aber nicht spezifiziert oder als „X“ spezifiziert ist, soll verstanden werden, dass das Alanin deletiert oder durch irgend eine andere Aminosäure substituiert sein kann, d.h. irgendeine von R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V.

GENAUE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0017] [Fig. 1](#) zeigt die SEQ ID Nr. 1 aus WO 95/26397.

[0018] [Fig. 2](#) zeigt die SEQ ID Nr. 2 aus WO 95/26397.

[0019] [Fig. 3](#) zeigt die Sequenz der *Bacillus* sp. #707 alpha-Amylase von Tsukamoto et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 157 (1988), Seiten 25–31.

Termamyl-ähnliche alpha-Amylase

[0020] Es ist gut bekannt, dass eine Anzahl von alpha-Amylasen, die von *Bacillus* spp. erzeugt werden, auf dem Aminosäurelevel hoch homolog sind. Beispielsweise wurde gefunden, dass die *B. licheniformis*-alpha-Amylase, die die Aminosäuresequenz umfasst, die in der SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist (kommerziell als Termamyl™ erhältlich), zu etwa 89 % mit der *B. amyloliquefaciens*-alpha-Amylase homolog ist, die die in SEQ ID Nr. 6 gezeigt Sequenzen aufweist, und zu etwa 79 % mit der *B. stearothermophilus*-alpha-Amylase homolog ist,

die die in der SEQ ID Nr. 8 dargestellte Aminosäuresequenz umfasst. Weitere homologe alpha-Amylasen umfassen eine alpha-Amylase, die von einem Stamm des *Bacillus* sp. NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 oder DSM 9375 abgeleitet ist, die all detailliert in WO 95/26397 beschrieben sind, und die #707 alpha-Amylase, die von Tsukamoto et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 157 (1988), Seiten 25 – 31 beschrieben ist.

[0021] Noch weitere homologe alpha-Amylasen umfassen die alpha-Amylasen, die vom *B. licheniformis*-Stamm erzeugt werden, der in EP 0252666 (ATCC 27811) beschrieben ist, und die alpha-Amylasen, die in WO 91/00353 und WO 94/18314 identifiziert sind. Andere kommerzielle Termamyl-ähnliche *B. licheniformis* alpha-Amylasen sind Optitherm™ und Takatherm™ (erhältlich von Solvay), Maxamyl™ (erhältlich von Gistbrocades/Genencor), Spezym AA™ und Spezyme Delta AA™ (erhältlich von Genencor) und Keistase™ (erhältlich von Daiwa).

[0022] Wegen der substantiellen Homologie, die zwischen diesen alpha-Amylasen gefunden wurde, wird angenommen, dass sie der gleichen Klasse von alpha-Amylasen an gehören, nämlich der Klasse der „Termamyl-ähnlichen alpha-Amylasen“.

[0023] Dementsprechend ist beabsichtigt, dass im vorliegenden Kontext der Ausdruck „Termamylähnliche alpha-Amylase“ eine alpha-Amylase bezeichnet, die auf dem Aminosäureniveau eine substantielle Homologie zu Termamyl™ zeigt, d.h. der *B. licheniformis* alpha-Amylase, die die in der SEQ ID Nr. 4 hier gezeigte Aminosäuresequenz aufweist. In anderen Worten ist eine Termamyl-ähnliche alpha-Amylase eine alpha-Amylase, die die in der SEQ ID Nr. 4 oder 8 hier gezeigte Aminosäuresequenz und die in den SEQ ID Nr. 1 oder 2 von WO 95/26397 (vgl. [Fig. 1](#) bzw. [Fig. 2](#)) oder in Tsukamoto et al., 1988 (siehe [Fig. 3](#)) gezeigten Aminosäuresequenzen aufweist, oder die i) mindestens 90 %, insbesondere bevorzugter mindestens 95 % Homologie, bevorzugter mindestens 97 %, bevorzugter mindestens 99 % mit mindestens einer der Aminosäuresequenzen zeigt.

[0024] In Verbindung mit der Eigenschaft i) wird die „Homologie“ bestimmt durch Verwendung des GAP-Programms von der GCG-Package Version 7.3 (Juni 1993) unter Verwendung des Defaultwertes für die GAP-Penalties, die eine GAP-Creation-Penalty von 3,0 und eine GAP-Extension-Penalty von 0,1 darstellt (Genetic Computer Group (1991) Programm Manual für das GCG-Package, Version 7, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711).

[0025] Eine strukturelle Anordnung zwischen Termamyl und einer Termamyl-ähnlichen alpha-Amylase kann verwendet werden, um die äquivalenten/korrespondierenden Positionen in anderen Termamyl-ähnlichen alpha-Amylasen zu identifizieren. Ein Verfahren, mit dem eine strukturelle Anordnung erhalten wird, ist die Verwendung des Pile-up-Programms vom GCG-Package, die eine Defaultwert der GAP-Penalties, d.h. eine Gap-Creation-Penalty von 3,0 und eine Gap-Extension-Penalty von 0,1 verwendet. Andere Verfahren zur strukturellen Anordnung umfassen die hydrophobe Clusteranalyse (Gaboriaud et al., (1987), FEBS LETTERS 224, Seiten 149–155) und das reverse Threading („reverse threading“) (Huber, T; Torda, AE, PROTEIN SCIENCE, Bd. 7, Nr. 1, Seiten 142–149 (1998)).

[0026] In dem vorliegenden Zusammenhang soll „stammt von“ nicht nur anzeigen, dass eine alpha-Amylase von einem Stamm des in Rede stehenden Organismus erzeugt wird oder erzeugbar ist, sondern auch eine alpha-Amylase bezeichnen, die von einer DNA-Sequenz kodiert wird, die aus einem solchen Stamm isoliert und in einem Wirtsorganismus erzeugt wird, der mit der DNA-Sequenz transformiert wurde. Schließlich ist der Ausdruck dazu gedacht, eine alpha-Amylase zu bezeichnen, die durch eine DNA-Sequenz einer synthetischen und/oder cDNA-Quelle kodiert wird, und die die identifizierenden Eigenschaften der in Rede stehenden alpha-Amylase aufweist. Der Ausdruck soll auch bezeichnen, dass die ursprüngliche alpha-Amylase eine Variante einer natürlich vorkommenden alpha-Amylase sein kann, d.h. eine Variante, die das Ergebnis einer Modifikation (Insertion, Substitution, Deletion) einer oder mehrere Aminosäurereste der natürlich vorkommenden alpha-Amylase ist.

Ursprüngliche Hybrid-alpha-Amylase

[0027] Die ursprüngliche alpha-Amylase kann eine Hybrid-alpha-Amylase sein, d.h. eine alpha-Amylase, die eine Kombination von partiellen Aminosäuresequenzen umfasst, die von mindestens zwei alpha-Amylasen stammen.

[0028] Die ursprüngliche Hybrid-alpha-Amylase kann eine sein, die auf der Basis der Aminosäurehomologie

und/oder immunologischen Kreuzreaktivität und/oder DNA-Hybridisierung (wie vorstehend definiert) bestimmt werden kann, dass sie zur Termamylähnlichen alpha-Amylase-Familie gehört. In diesem Fall ist die Hybrid-alpha-Amylase typischerweise aus mindestens einem Teil einer Termamylähnlichen alpha-Amylase und einem Teil oder Teilen von einer oder mehreren anderen alpha-Amylase/n zusammengesetzt sein, ausgewählt unter Termamylähnlichen alpha-Amylasen oder nicht-Termamylähnlichen alpha-Amylasen aus mikrobiellem (bakteriellem oder pilzlichem) Ursprung und/oder Säugerquellen.

[0029] Somit kann die ursprüngliche alpha-Amylase eine Kombination von partiellen Aminosäuresequenzen umfassen, die von mindestens zwei Termamylähnlichen alpha-Amylasen oder von mindestens einer Termamylähnlichen und mindestens einer nicht-Termamylähnlichen bakteriellen alpha-Amylase oder von einer Termamylähnlichen und mindestens einer pilzlichen alpha-Amylase abgeleitet ist. Die Termamylähnliche alpha-Amylase, von der eine partielle Aminosäuresequenz stammt, kann z. B. eine der spezifischen Termamylähnlichen alpha-Amylasen sein, auf die hier Bezug genommen wird.

[0030] Beispielsweise kann die ursprüngliche alpha-Amylase einen C-terminalen Teil einer alpha-Amylase umfassen, der von einem Stamm von *B. licheniformis* abgeleitet ist, und einen N-terminalen Teil einer alpha-Amylase, der von einem Stamm von *B. amyloliquefaciens* oder von einem Stamm von *B. stearothermophilus* abgeleitet ist.

[0031] Die nicht-Termamylähnliche alpha-Amylase kann z. B. eine alpha-Amylase eines Pilzes, eines Säugers oder einer Pflanze oder eines Bakteriums (die von der Termamylähnlichen alpha-Amylase verschieden ist) sein. Spezifische Beispiele solcher alpha-Amylasen umfassen die *Aspergillus oryzae*-TAKA-alpha-Amylase, die *A. niger*-Säure-alpha-Amylase, die *Bacillus subtilis*-alpha-Amylase, die Schweinepankreas-alpha-Amylase und die Gerste-alpha-Amylase. Diese alpha-Amylasen haben alle eine erforschte Struktur, die deutlich verschieden von der Struktur der typischen Termamylähnlichen alpha-Amylase, auf die hier Bezug genommen wird, ist.

[0032] Die vorstehend erwähnte Pilz-alpha-Amylase, d.h. die von *A. niger* und *A. oryzae* stammt, sind auf dem Aminosäurerilevel hoch homolog, und es wird allgemein angenommen, dass sie zur gleichen Familie der alpha-Amylasen gehört. Die Pilz-alpha-Amylase, die von *Aspergillus oryzae* stammt, ist kommerziell unter der Marke Fungamyl™ erhältlich.

[0033] Weiterhin soll, wenn auf eine besondere Variante der Termamylähnlichen alpha-Amylase (Variante der Erfindung) – in üblicher Weise – durch Bezugnahme auf die Modifikation (z.B. Deletion oder Substitution) eines spezifischen Aminosäurerestes in der Aminosäuresequenz einer spezifischen Termamylähnlichen alpha-Amylase Bezug genommen wird, verstanden werden, dass die Varianten einer anderen Termamylähnlichen alpha-Amylase dadurch umfasst werden, die in der/den äquivalenten Positionen modifiziert sind (wie mit der besten möglichen Aminosäuresequenzanordnung zwischen den entsprechenden Aminosäuresequenzen bestimmt).

[0034] Eine bevorzugte Ausführungsform einer Variante der Erfindung ist eine, die von der *B. licheniformis*-alpha-Amylase (als ursprüngliche Termamylähnliche alpha-Amylase) stammt, z. B. eine von denen, auf die oben Bezug genommen wurde, wie die *B. licheniformis*-alpha-Amylase mit der in SEQ ID Nr. 4 gezeigten Aminosäuresequenz.

Konstruktion von Varianten der Erfindung

[0035] Die Konstruktion der interessierenden Variante kann erfolgen, indem die Mikroorganismen kultiviert werden, die eine DNA-Sequenz umfassen, die die Variante unter Bedingungen kodiert, die für die Produktion der Variante förderlich sind. Die Variante kann dann nachfolgend aus der resultierenden Kulturbrühe gewonnen werden. Dies wird nachstehend detailliert beschrieben.

Geänderte Eigenschaften

[0036] Die nachfolgende Darstellung diskutiert das Verhältnis zwischen Mutationen, die in Varianten der Erfindung vorliegen, und die erwünschten Änderungen in den Eigenschaften (relativ zu denen der ursprünglichen Termamylähnlichen alpha-Amylase), die daraus resultieren können.

[0037] In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Varianten der Erfindung eine Mutation in einer Position, die mindestens einer der folgenden Mutationen in der in SEQ ID Nr. 4 gezeigten Aminosäuresequenz

entspricht:

T49 + G107A, A52S + V54N + T49L + G107A oder T49F + G107A, T49V + G107A, T49D + G107A, T49Y + G107A, T49S + G107A, T49N + G107A, T49I + G107A, T49L + A52S + G107A, T49L + A52T + G107A, T49L + A52F + G107A, T49L + A52L + G107A, T49L + A52I + G107A, T49L + A52V + G107A.

[0038] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Variante die folgenden Mutationen entsprechend den folgenden Mutationen in der in SEQ ID Nr. 4 dargestellten Aminosäuresequenz:
T29X + A52X + V54N/I/L/Y/F/W + G107A, und sie kann weiter G108A umfassen.

[0039] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Variante der vorliegenden Erfindung mindestens eine Mutation, die den folgenden Mutationen der in der SEQ ID Nr. 4 dargestellten Aminosäuresequenz entspricht:

T49L + G107A,
T49I + G107A,
T49L + G107A + V54I,
T49I + G107A + V54I,
A52S + V54N + T49L + G107A,
A52S + V54I + T49L + G107A,
A52S + T49L + G107A,
A52T + T49L + G107A,
A52S + V54N + T49I + G107A,
A52S + V54I + T49I + G107A,
A52S + T49I + G107A.

[0040] Die vorstehenden Varianten der Erfindung haben alle geänderte Eigenschaften (was verminderte oder erhöhte Eigenschaften heißt), insbesondere eine der folgenden Eigenschaften relativ zu der ursprünglichen alpha-Amylase: verminderte Fähigkeit, ein Substrat nahe dem Verzweigungspunkt zu spalten, verbesserte Substratspezifität und/oder verbesserte spezifische Aktivität, geänderte Substratbindung, geänderte thermische Stabilität, geändertes pH/Aktivitäts-Profil, geändertes pH/Stabilitäts-Profil, geänderte Stabilität gegenüber Oxidation, geänderte Ca²⁺-Abhängigkeit.

Stabilität

[0041] Im Kontext der vorliegenden Erfindung umfassen Mutationen (einschließlich Aminosäuresubstitutionen und/oder -Deletionen) von Bedeutung in Bezug auf die zu erreichende geänderte Stabilität, insbesondere verbesserte Stabilität (d.h. höher oder niedriger) bei insbesondere niedrigem pH (d.h. 4–6) jede der unter dem Abschnitt „geänderte Eigenschaften“ aufgeführte Mutationen und die Varianten, die gerade unten angegeben sind.

[0042] Die folgenden Varianten: Q360A,K, N102A, N326A,L, N190G, N190K, Y262A,K,E (unter Verwendung der BAN-, d.h. SEQ ID Nr. 6, Nummerierung) wurde ebenso hinsichtlich der pH-Stabilität getestet. Eine bevorzugte ursprüngliche alpha-Amylase kann die vorstehend beschriebene BA2 sein. Die pH-Stabilität wurde wie in dem Abschnitt „Material & Methoden“ beschrieben bestimmt.

Ca²⁺-Stabilität

[0043] Die geänderte Ca²⁺-Stabilität bedeutet, dass sich die Stabilität des Enzyms unter einer Ca²⁺-Verarmung sich verbessert hat, d.h. eine höhere oder niedrigere Stabilität. Im Kontext der vorliegenden Erfindung umfassen Mutationen (einschließlich Aminosäuresubstitutionen) von Bedeutung in Bezug auf die Erreichung einer geänderten Ca²⁺-Stabilität, insbesondere verbesserten Ca²⁺-Stabilität, d.h. einer höheren oder niedrigeren Stabilität, bei insbesondere niedrigem pH (d.h. pH 4–6) alle Mutationen, die in dem Abschnitt „geänderte Eigenschaften“ aufgeführt sind.

Spezifische Aktivität

[0044] In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung zeigen bedeutsame Mutationen in Bezug auf das Erhalten von Varianten, die eine geänderte spezifische Aktivität, insbesondere eine erhöhte oder verminderte spezifische Aktivität, insbesondere bei Temperaturen von 60 bis 100°C, vorzugsweise 70 bis 95°C, insbesondere 80 bis 90°C zeigen, umfassen irgendeine der in dem Abschnitt „geänderte Eigenschaften“ vorstehende aufgelisteten Mutationen.

[0045] Die spezifische Aktivität von LE174 und LE29 wurde mit 16 000 NU/mg unter Verwendung des Phadebas®-Assays, der im Abschnitt „Material & Methoden“ beschrieben wurde, bestimmt.

Geändertes Spaltmuster

[0046] Im Stärkeverflüssigungsprozess ist es erwünscht, eher eine alpha-Amylase zu verwenden, die dazu in der Lage ist, die Stärkemoleküle in lange verzweigte Oligosaccharide abzubauen, als eine alpha-Amylase, die kürzere verzweigte Oligosaccharide entstehen lässt (wie die herkömmliche Termamyl-ähnliche alpha-Amylase). Kurze verzweigte Oligosaccharide (Panose-Vorläufer) werden von der Pullulanase nicht zufriedenstellend hydrolysiert, die nach der alpha-Amylase-Behandlung bei Verflüssigungsprozessen eingesetzt werden, oder gleichzeitig mit einer zuckerverflüssigenden Amyloglucosidas (Glucoamylase) oder vor Zugabe einer zuckerverflüssigenden Amyloglucosidase (Glucoamylase) verwendet werden. Somit enthält in Gegenwart eines Panose-Vorläufers das Produkt-Gemisch, das nach der Glucoamylase-Behandlung vorliegt, einen signifikanten Teil von kurzen verzweigten so genannten Limitdextrinen („limit-dextrin“) gegenüber dem Trisaccharid Panose. Die Gegenwart von Panose erniedrigt die Verzuckerungs-Ausbeute deutlich und ist somit unerwünscht.

[0047] Es wurde früher berichtet (US-Patent 5,234,823), dass, wenn mit Glucoamylase und Pullulanase verzuckert wird, das Vorliegen restlicher alpha-Amylase-Aktivität, die vom Verflüssigungsprozess stammt, zu niedrigeren Ausbeuten an Glucose führen kann, wenn die alpha-Amylase nicht vor dem Verzuckerungsschritt-Schritt inaktiviert wird. Diese Inaktivierung kann typischerweise durchgeführt werden, indem der pH unter 4,7 bei 95°C eingestellt wird, bevor die Temperatur für die Verzuckerung auf 60°C erniedrigt wird.

[0048] Der Grund für diesen negativen Effekt auf die Glucose-Ausbeute ist nicht vollständig verstanden, aber es wird angenommen, dass die verflüssigende alpha-Amylase (z.B. Termamyl 120 L von B. licheniformis) „Limitdextrine“ erzeugt (die schlechte Substrate für die Pullulanase darstellen), indem 1,4-alpha-glykosidische Bindungen nahe an und auf beiden Seiten der Verzweigungspunkte im Amylopektin hydrolysiert werden. Hydrolyse dieser Limitdextrine durch Glucoamylase führt zu einem Aufbau des Trisaccharids Panose, das nur langsam durch Glucoamylase hydrolysiert wird.

[0049] Die Entwicklung einer thermisch stabilen alpha-Amylase, die nicht unter diesen Nachteilen leidet, wäre eine signifikante Verbesserung, so dass kein getrennter Inaktivierungsschritt erforderlich wäre.

[0050] Somit ist es das Ziel der vorliegenden Erfindung bei einer Mutanten-alpha-Amylase anzukommen, die geeignet modifizierte Stärke-Abbau-Eigenschaften aufweist, aber die Thermostabilität der ursprünglichen Termamyl-ähnlichen alpha-Amylase beibehält.

[0051] Dementsprechend bezieht sich die Erfindung auf Varianten einer Termamyl-ähnlichen alpha-Amylase, die eine verbesserte reduzierte Fähigkeit hat, die Substrate nahe am Verzweigungspunkt zu spalten, und weiterhin eine verbesserte Substratspezifität und/oder eine verbesserte spezifische Aktivität besitzt.

[0052] Von besonderem Interesse ist eine Variante, die ein Amylopektin-Substrat vom reduzierenden Ende spaltet, mehr als eine Glucoseeinheit vom Verzweigungspunkt, vorzugsweise mehr als zwei oder drei Glucoseeinheiten vom Verzweigungspunkt, d.h. bei einer weiteren Entfernung vom Verzweigungspunkt als die, die durch die Verwendung einer B. licheniformis-alpha-Amylase vom Wildtyp erhalten wird.

[0053] Es kann hier erwähnt werden, dass gemäß der WO 96/23874 von Varianten, die mindestens eine der folgenden Mutationen umfassen, erwartet wird, die Spaltung nahe dem Verzweigungspunkt verhindern:
V54 L,I,F,Y,W,R,K,H,E,Q;
D53 L,I,F,Y,W;
Y56W;
Q333W;
G57, alle möglichen Aminosäurereste;
A52, Aminosäurereste größer als A, z.B. A52W,Y,L,F,I.

[0054] Mutationen von besonderem Interesse in Bezug auf die Bereitstellung von Varianten gemäß der Erfindung mit verbesserter reduzierter Fähigkeit, ein Substrat nahe dem Verzweigungspunkt zu spalten, und die weiterhin eine verbesserte Substratspezifität und/oder verbesserte spezifische Aktivität aufweist, umfassen Mutationen an den folgenden Positionen in der B. licheniformis-alpha-Amylase, SEQ ID Nr. 4: H156, A181, N190, A209, Q264 und I201.

[0055] Ferner kann die B. licheniformis-alpha-Amylase, die in SEQ ID No. 4 gezeigt ist, die eine oder mehrere der folgenden Mutationen umfasst, als Hauptkette verwendet werden (unter Verwendung der SEQ ID No. 4 für die Nummerierung der Mutationen):

E119C;
S130C;
D124C;
R127C;
A52 alle möglichen Aminosäurerreste;
S85 alle möglichen Aminosäurerreste;
N96 alle möglichen Aminosäurerreste;
V129 alle möglichen Aminosäurerreste;
A269 alle möglichen Aminosäurerreste;
A378 alle möglichen Aminosäurerreste;
S148 alle möglichen Aminosäurerreste, insbesondere S148N;
E211 alle möglichen Aminosäurerreste, insbesondere E211 Q;
N188 alle möglichen Aminosäurerreste, insbesondere N188S, N188P;
M197 alle möglichen Aminosäurerest, insbesondere M197T, M197A, M197G, M197I,
M197L, M197Y, M197F, M197I;
W138 alle möglichen Aminosäurereste, insbesondere W138Y;
D207 alle möglichen Aminosäurereste, insbesondere D207Y;
H133 alle möglichen Aminosäurereste, insbesondere H133Y;
H205 alle möglichen Aminosäurereste, insbesondere H205H, H295C, H205R;
S187 alle möglichen Aminosäurereste, insbesondere S187D;
A210 alle möglichen Aminosäurereste, insbesondere A210S, A210T;
H405 alle möglichen Aminosäurereste, insbesondere H405D;
K176 alle möglichen Aminosäurereste, insbesondere K176R;
F279 alle möglichen Aminosäurereste, insbesondere F279Y;
Q298 alle möglichen Aminosäurereste, insbesondere Q298H;
G299 alle möglichen Aminosäurereste, insbesondere G299R;
L308 alle möglichen Aminosäurereste, insbesondere L308F;
T412 alle möglichen Aminosäurereste, insbesondere T412A;

[0056] Ferner kann als Hauptkette die B. licheniformis-alpha-Amylase verwendet werden, die in SEQ ID Nr. 4 dargestellt ist, die mindestens eine der folgenden Mutationen umfasst:

M15 alle möglichen Aminosäurereste;
A33 alle möglichen Aminosäurereste.

[0057] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Variante der Erfindung mindestens eine Mutation in einer Position, die den folgenden Mutationen in der Aminosäuresequenz entspricht, die in SEQ ID No. 3 gezeigt ist: T49 + G107A, A52S + V54N + T49L + G107A oder T49F + G107A, T49V + G107A, T49D + G107A, T49Y + G107A, T49S + G107A, T49N + G107A, T49I + G107A, T49L + A52S + G107A, T49L + A52T + G107A, T49L + A52F + G107A, T49L + A52L + G107A, T49L + A52I + G107A, T49L + A52V + G107.

[0058] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Variante der Erfindung mindestens eine Mutation in einer Position, die den folgenden Mutationen in der in SEQ ID Nr. 4 dargestellten Aminosäuresequenz entspricht: T49X + A52X + V54N/I/L/Y/F/W + G107A, und die weiterhin G108A umfassen kann.

[0059] In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst eine Variante der Erfindung mindestens eine Mutation in einer Position, die den folgenden Mutationen in der Aminosäuresequenz entspricht, die in der SEQ ID Nr. 4 gezeigt ist:

T49L + G107A,
T49I + G107A,
T49L + G107A + V54I,
T49I + G107A + V54I,
A52S + V54N + T49L + G107A,
A52S + V54I + T49L + G107A,
A52S + T49L + G107A,
A52T + T49L + G107A,
A52S + V54N + T49I + G107A,
A52S + V54I + T49I + G107A,

A52S + T49I + G107A.

Allgemeine Mutationen in Varianten der Erfindung

[0060] Es kann bevorzugt sein, dass eine Variante der Erfindung eine oder mehrere Modifikationen zusätzlich zu den vorstehend beschriebenen umfasst. Somit kann es vorteilhaft sein, dass ein oder mehrere Prolin-Reste in dem Teil der alpha-Amylase-Variante vorliegt/en, der modifiziert ist, durch einen nicht-Prolin-Rest ersetzt ist/sind, der irgendeine der möglichen, natürlich vorkommenden nicht-Prolin-Reste sein kann, und der vorzugsweise Alanin, Glycin, Serin, Threonin, Valin oder Leucin ist.

[0061] Analog kann es bevorzugt sein, dass ein oder mehrere Cystein-Rest/e, die unter den Aminosäure-Resten vorliegen, mit denen die ursprüngliche alpha-Amylase modifiziert ist, durch einen nicht-Cystein-Rest, wie Serin, Alanin, Threonin, Glycin, Valin oder Leucin, ersetzt ist/sind.

[0062] Weiterhin kann eine Variante der Erfindung – in Verbindung mit irgendeiner der vorstehend angegebenen Modifikationen – modifiziert sein, so dass ein oder mehrere Asp und/oder Glu, die in einem Aminosäure-fragment vorliegen, das dem Aminosäure-Fragment 185–209 der SEQ ID Nr. 4 entspricht, durch ein Asn und/oder Gln ersetzt ist. Von Interesse ist auch der Austausch, in der Termamyl-ähnlichen alpha-Amylase, von einem oder mehreren der Lys-Reste, die in einem Aminosäure-Fragment vorliegen, das dem Aminosäure-fragment 185–209 der SEQ ID Nr. 4 entspricht, durch Arg.

[0063] Es soll verstanden werden, dass die vorliegende Erfindung Varianten umfasst, die zwei oder mehr der vorstehend dargestellten Modifikationen aufweisen.

[0064] Ferner kann es vorteilhaft sein, in irgendeiner der hier beschriebenen Varianten Punktmutationen einzuführen.

Verfahren zur Herstellung der alpha-Amylase-Varianten

[0065] Mehrere Verfahren zur Einführung von Mutationen in Gene sind auf dem Gebiet bekannt. Nach einer kurzen Diskussion der Klonierung der alpha-Amylase-kodierenden DNA-Sequenzen werden Verfahren für die Erzeugung von Mutationen an speziellen Stellen innerhalb der alpha-Amylase-kodierenden Sequenz diskutiert werden.

[0066] Klonierung einer DNA-Sequenz, die eine alpha-Amylase kodiert Die DNA-Sequenz, die eine ursprüngliche alpha-Amylase kodiert, kann aus jeder Zelle oder Mikroorganismus isoliert werden, der die in Rede stehende alpha-Amylase produziert, wobei verschiedene Verfahren verwendet werden können, die auf dem Gebiet gut bekannt sind. Zuerst sollte eine genomische DNA- und/oder cDNA-Bibliothek konstruiert werden, wobei chromosomal DNA oder Messenger-RNA aus dem Organismus verwendet wird, der die alpha-Amylase produziert, die untersucht werden soll. Dann, wenn die Aminosäuresequenz der alpha-Amylase bekannt ist, können homologe markierte Oligonucleotidsonden synthetisiert und verwendet werden, um die alpha-Amylase-kodierenden Klone aus einer genomischen Bibliothek zu identifizieren, die aus dem in Rede stehenden Organismus hergestellt wurde. Alternativ kann eine markierte Oligonucleotidsonde mit Sequenzen, die Homolog zu einem bekannten alpha-Amylase-Gen sind, als Sonde verwendet werden, um die alpha-Amylase-kodierenden Klone zu identifizieren, wobei Hybridisierungs- und Waschbedingungen mit niedriger Stringenz eingesetzt werden.

[0067] Ein noch anderes Verfahren zur Identifizierung von alpha-Amylase-kodierenden Klonen umfasst das Insertieren von Fragmenten genomicscher DNA in einen Expressionsvektor, wie ein Plasmid, das Transformieren von alpha-Amylase-negativen Bakterien mit der resultierenden genomicschen DNA-Bibliothek und dann dem Beschichten der transformierten Bakterien auf Agar, das ein Substrat für die alpha-Amylase enthält, wobei es ermöglicht wird, Klone, die die alpha-Amylase exprimieren, zu identifizieren.

[0068] Alternativ kann die DNA-Sequenz, die das Enzym kodiert, synthetisch durch etablierte Standardverfahren hergestellt werden, z.B. das Phosphoramidit-Verfahren, das von S.L. Beaucage und M.H. Caruthers (1981) beschrieben wurde, oder das Verfahren, das von Matthes et al., beschrieben wurde. Bei dem Phosphoramidit-Verfahren werden Oligonucleotide synthetisiert, z.B. in einem automatischen DNA-Synthetisierer, gereinigt, angelagert, ligiert und in geeignete Vektoren kloniert.

[0069] Schließlich kann die DNA-Sequenz von gemischem genomicschen und synthetischen Ursprung, ge-

mischem synthetischen und cDNA-Ursprung oder gemischem genomischen und cDNA-Ursprung sein, hergestellt durch das Ligieren von Fragmenten von synthetischem, genomischem oder cDNA-Ursprung (damit sie geeignet sind, entsprechen die Fragmente verschiedenen Teilen der gesamten DNA-Sequenz), wobei Standardverfahren angewendet werden. Die DNA-Sequenz kann auch durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung spezifischer Primer hergestellt werden, z.B. wie in US 4,683,202 oder R.K. Saiki et al. (1988) beschrieben.

Ortsspezifische Mutagenese

[0070] Wenn einmal eine alpha-Amylase-kodierende DNA-Sequenz isoliert und erwünschte Stellen für die Mutation identifiziert wurden, können Mutationen eingeführt werden, wobei synthetische Oligonucleotide verwendet werden. Diese Oligonucleotide enthalten Nucleotidsequenzen, die die gewünschte Mutationsstelle flankieren; die Mutantennucleotide werden während der Oligonucleotidsynthese eingeführt. In einem speziellen Verfahren wird ein einzelstängiger Abstand („gap“), der die alpha-Amylase-kodierende Sequenz überspannt, in einem Vektor erzeugt, der das alpha-Amylase-Gen trägt. Dann wird das synthetische Nucleotid, das die gewünschte Mutation trägt, an den homologen Teil der einzelsträngigen DNA angelagert. Der verbleibende Abstand wird dann mit der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) aufgefüllt und das Konstrukt wird unter Verwendung von T4-Ligase ligiert. Ein spezielles Beispiel dieses Verfahrens ist in Morinaga et al., (1984) beschrieben. Die US 4,760,025 offenbart die Einführung von Oligonucleotiden, die multiple Mutationen kodieren, indem geringe Änderungen in der Cassette durchgeführt werden. Eine noch größere Varietät von Mutationen kann jedoch zu irgendeiner Zeit durch das Morinaga-Verfahren eingeführt werden, da eine Vielzahl von Oligonucleotiden von verschiedner Länge eingeführt werden kann.

[0071] Ein anderes Verfahren für die Einführung von Mutationen in die alpha-Amylase-kodierende DNA-Sequenz wird in Nelson und Long (1989) beschrieben. Es umfasst die 3-Stufen-Bildung eines PCR-Fragments, das die gewünschte Mutation enthält, die durch Verwendung eines chemisch synthetisierten DNA-Stranges als einer der Primer der PCR-Reaktion verwendet wird. Aus dem PCR-erzeugten Fragment kann ein DNA-Fragment isoliert werden, das die Mutation aufweist, indem mit Restriktionsendonukleasen gespalten wird und in ein Expressionsplasmid wieder eingefügt wird.

Zufällige Mutagenese

[0072] Die zufällige Mutagenese wird geeigneterweise in entweder einer lokalisierten oder regionspezifischen zufälligen Mutagenese in mindestens drei Teilen des Gens, das in die Aminosäuresequenz translatiert, die in Rede steht, oder in dem ganzen Gen durchgeführt.

[0073] Die zufällige Mutagenese einer DNA-Sequenz, die eine ursprüngliche alpha-Amylase kodiert, kann herkömmlicherweise durch die Verwendung irgendeines auf dem Gebiet bekannte Verfahren durchgeführt werden.

[0074] In Bezug auf das Vorstehende betrifft ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Verfahren zur Erzeugung einer Variante einer ursprünglichen alpha-Amylase, z.B. wobei die Variante eine verminderte Fähigkeit zur Spaltung eines Oligosaccharid-Substrates nahe dem Verzweigungspunkt zeigt, und weiterhin eine verbesserte Substratspezifität und/oder eine verbesserte spezifische Aktivität relativ zum Ursprung aufweist, das Verfahren umfasst:

- (a) das Unterziehen einer DNA- Sequenz, die für die ursprüngliche alpha-Amylase kodiert, einer zufälligen Mutagenese,
- (b) Exprimieren der mutierten DNA-Sequenz, die in Schritt (a) erhalten wird, in einer Wirtszelle, und
- (c) Screenen nach Wirtszellen, die eine alpha-Amylase-Variante exprimieren, welche eine geänderte Eigenschaft aufweist (d.h. thermische Stabilität), relativ zur ursprünglichen alpha-Amylase.

[0075] Schritt (a) des vorstehenden Verfahrens der Erfindung wird vorzugsweise unter Verwendung dotierter („doped“) Primer durchgeführt. Beispielsweise kann die zufällige Mutagenese durch Verwendung eines geeigneten physikalischen oder chemischen Mutagenesmittels, durch Verwendung eines geeigneten Oligonucleotides oder indem die DNA-Sequenz einer PCR-erzeugten Mutagenese unterzogen wird, durchgeführt werden. Weiterhin kann die zufällige Mutagenese durch Verwendung irgendeiner Kombination dieser Mutagenesmittel durchgeführt werden. Das Mutagenesmittel kann z.B. eines sein, das Transitionen, Transversionen, Inversionen, Durcheinanderbringen („scrambling“), Deletionen und/oder Insertionen induziert.

[0076] Beispiele physikalischer oder chemischer Mutagenesmittel, die für den vorliegenden Zweck geeignet

sind, umfassen ultraviolette (UV)-Bestrahlung, Hydroxylamin, N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG), O-Methylhydroxylamin, salpetrige Säure, Ethylmethansulfonat (EMS), Natriumbisulfit, Ameisensäure und Nucleotidanaloga. Wenn ein solches Mittel verwendet wird, wird die Mutagenese typischerweise durch Inkubation der DNA-Sequenz, die das ursprüngliche Enzym kodiert, das mutagenisiert werden soll, in Gegenwart des Mutagenesemittels der Wahl unter geeigneten Bedingungen für die Mutagenese, damit sie stattfindet, und Auswahl der mutierten DNA mit den gewünschten Eigenschaften durchgeführt. Wenn die Mutagenese durchgeführt wird, indem ein Oligonucleotid verwendet wird, können die Oligonucleotide mit den drei nicht-ursprünglichen Nucleotiden während der Synthese des Oligonucleotides an den Positionen, die geändert werden sollen, dotiert oder versetzt sein. Das Dotieren oder Versetzen kann so durchgeführt werden, dass die Codons unerwünschte Aminosäuren vermeiden. Die dotierten oder versetzten Oligonucleotide können in die DNA, die das alpha-Amylase-Enzym kodiert, durch jede veröffentlichte Technik eingebaut werden, wobei z.B. PCR, LCR oder jede DNA-Polymerase und -Ligase geeignet erscheinen. Vorzugsweise wird das dotieren unter Verwendung des „konstanten zufälligen Dotierens“ durchgeführt, bei dem der Prozentteil des Wildtyps und der Mutation in jeder Position vordefiniert ist. Weiterhin kann das Dotieren hinsichtlich einer Präferenz für die Einführung bestimmter Nucleotide und dadurch eine Präferenz für den Einbau von einer oder mehrere Aminosäurereste gesteuert sein. Das Dotieren kann erzeugt werden, indem z.B. der Einbau von 90 % Wildtyp und 10 % Mutation in jeder Position ermöglicht wird. Eine zusätzliche Erwägung bei der Wahl des Dotierungsschemas basiert auf genetischen sowie Protein-strukturellen Restriktionen. Das Dotierungsschema kann unter Verwendung des DOPE-Programms durchgeführt werden, das unter anderem sicherstellt, dass der Einbau eines Stop-Codons verhindert wird. Wenn die PCR-erzeugte Mutagenese verwendet wird, wird entweder ein chemisch behandeltes oder nicht behandeltes Gen, das eine ursprüngliche alpha-Amylase kodiert, einer PCR unter Bedingungen unterzogen, die den Fehl-Einbau von Nucleotiden erhöht (Deshler 1992; Leung et al., Technique, Bd. 1, 1989, Seiten 11–15). Ein Mutatorstamm von *E. coli* (Fowler et al., Molec. Gen. Genet., 133, 1974, Seiten 179–191), *S. cereviseae* oder jeder andere mikrobielle Organismus kann für die zufällige Mutagenese der DNA verwendet werden, die die alpha-Amylase kodiert, z.B. durch Transformieren eines Plasmides, das die ursprüngliche Glycosylase enthält, in den Mutatorstamm, Wachsen des Mutatorstammes mit den Plasmid und Isolieren des mutierten Plasmides aus dem Mutatorstamm. Das mutierte Plasmid kann nachfolgend in den Expressionsorganismus transformiert werden. Die DNA-Sequenz, die mutagenisiert werden soll, kann üblicherweise in einer genomischen Bibliothek oder cDNA-Bibliothek vorliegen, die aus einem Organismus hergestellt wird, der die ursprüngliche alpha-Amylase exprimiert. Alternativ kann die DNA-Sequenz in einem geeigneten Vektor vorliegen, wie ein Plasmid oder ein Bakteriophage, die als solche mit dem Mutagenesemittel inkubiert werden kann oder in anderer Weise dem Mutagenesemittel ausgesetzt werden kann. Die DNA, die mutagenisiert werden soll, kann auch in einer Wirtszelle vorliegen, wobei sie entweder in das Genom der Zelle integriert sein kann oder auf einem Vektor vorliegt, der in der Zelle vorliegt. Schließlich kann die DNA, die mutagenisiert werden soll, in isolierter Form vorliegen. Es soll verstanden werden, dass die DNA-Sequenz, die einer zufälligen Mutagenese unterzogen wird, vorzugsweise eine cDNA oder eine genomische DNA-Sequenz ist. In einigen Fällen kann es geeignet sein, die mutierte DNA-Sequenz zu amplifizieren, bevor der Expressionsschritt b) oder der Screening-Schritt c) durchgeführt wird. Eine solche Amplifikation kann gemäß auf dem Gebiet bekannter Verfahren durchgeführt werden, wobei das gegenwärtig bevorzugte Verfahren die PCR-erzeugte Amplifizierung unter Verwendung von Oligonucleotid-Primern ist, die auf der Basis der DNA- oder Aminosäuresequenz des ursprünglichen Enzyms hergestellt werden. Nach der Inkubation oder der Exposition gegenüber dem Mutagenesemittel wird die DNA durch Kultivieren einer geeigneten Wirtszelle, die die DNA-Sequenz trägt, unter Bedingungen kultiviert, die die Expression ermöglicht statt zu finden. Die Wirtszelle, die für diesen Zweck verwendet wird, kann eine sein, die mit der mutierten DNA-Sequenz transformiert wurde, die gegebenenfalls auf einem Vektor vorliegt, oder eine, die die DNA-Sequenz trägt, die das ursprüngliche Enzym während der Mutagenesebehandlung kodiert. Beispiele geeigneter Wirtszellen sind die folgenden: grampositive Bakterien, wie *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lenthus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circularis*, *Bacillus laetus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces lividans* oder *Streptomyces murinus*; und grammnegative Bakterien, wie *E. coli*. Die mutierte DNA-Sequenz kann weiterhin eine DNA-Sequenz umfassen, die Funktionen kodiert, die die Expression der mutierten DNA-Sequenz zu erlauben.

Lokalisierte zufällige Mutagenese

[0077] Die zufällige Mutagenese kann vorteilhafterweise auf einen Teil der ursprünglichen in Rede stehenden alpha-Amylase lokalisiert sein. Dies kann z.B. vorteilhaft sein, wenn bestimmte Regionen des Enzyms identifiziert wurden, dass sie von besonderer Bedeutung für eine gegebene Eigenschaft des Enzyms sind, und wenn sie modifiziert ist, erwartet wird, dass sie in einer Variante resultiert, die verbesserte Eigenschaften hat. Solche Regionen können normalerweise identifiziert werden, wenn die Tertiärstruktur des ursprünglichen Enzyms aufgeklärt wurde und in Bezug zur Funktion des Enzyms steht.

[0078] Die lokalisierte oder Region-spezifische zufällige Mutagenese wird günstigerweise unter Verwendung der vorstehend beschriebenen PCR-erzeugten Mutagenesetechniken oder jeder anderen geeigneten Technik, die auf dem Gebiet bekannt ist, erzeugt. Alternativ kann die DNA-Sequenz, die den Teil der DNA-Sequenz kodiert, der modifiziert werden soll, isoliert werden, z.B. durch Insertion in einen geeigneten Vektor, und der Teil kann nachfolgend einer Mutagenese unterzogen werden, indem irgendeine der vorstehend diskutierten Verfahren verwendet wird.

Alternative Verfahren zur Bereitstellung von alpha-Amylase-Varianten

[0079] Alternative Verfahren zur Bereitstellung von Varianten der Erfindung umfassen so genannte Gen-Shuffling-Verfahren, die auf diesem Gebiet bekannt sind, einschließlich der Verfahren, die z.B. in WO 95/22625 (von Affymax Technologies N.V.) und WO 96/00343 (von Novo Nordisk) beschrieben sind.

Expression der alpha-Amylase-Varianten

[0080] Erfindungsgemäß kann eine DNA-Sequenz, die die Variante erzeugt, die durch die vorstehend beschriebenen Verfahren oder durch irgendein alternatives Verfahren, das auf diesem Gebiet bekannt ist, hergestellt wurde, in Enzymform exprimiert werden, wobei ein Expressionsvektor verwendet wird, der typischerweise eine Kontrollsequenz umfasst, die einen Promotor, einen Operator, eine Ribosomenbindungsstelle, ein Translationsinitiationssignal und ggf. ein Repressorgene oder verschiedene Aktivatorgene kodiert.

[0081] Der rekombinante Expressionsvektor, der die DNA-Sequenz trägt, die eine erfindungsgemäße alpha-Amylase-Variante kodiert, kann jeder Vektor sein, der üblicherweise rekombinannten DNA-Verfahren unterzogen wird, und die Wahl des Vektor wird oft von der Wirtszelle abhängen, in die er eingeführt wird. Somit kann der Vektor ein autonom replizierender Vektor sein, d.h. ein Vektor, der als extrachromosomal Entität existiert, dessen Replikation unabhängig von der Chromosomenreplikation ist, z.B. ein Plasmid, ein Bakteriophage oder ein extrachromosomal Element, ein Minichromosom oder ein artificielles Chromosom. Alternativ kann der Vektor einer sein, der, wenn er in eine Wirtszelle eingeführt ist, in das Wirtszellgenom integriert und zusammen mit den Chromosom(en), in das/die er integriert wurde, repliziert wird.

[0082] In dem Vektor sollte die DNA-Sequenz operativ mit einer geeigneten Promotor-Sequenz verbunden sein. Der Promotor kann jede DNA-Sequenz sein, die eine Transkriptionsaktivität in der Wirtszelle der Wahl zeigt, und kann von Genen stammen, die entweder ein homologes oder eine heterologes Protein zur Wirtszelle kodieren. Beispiele geeigneter Promotoren für die Steuerung der Transkription der DNA-Sequenz, die eine alpha-Amylase-Variante der Erfindung kodiert, insbesondere in einem bakteriellen Wirt, sind die Promotoren des lac-Operons von E. coli, die Streptomyces coelicolor-Agarase-Gen-dagA-Promotoren, die Promotoren des Bacillus licheniformis-alpha-Amylase-Gen (amyL), die Promotoren des Bacillus stearothermophilus-Maltogen-Amylase-Gen (amyM), die Promotoren des Bacillus amyloliquefaciens-alpha-Amylase (amyQ), die Promotoren des Bacillus subtilis xylA- und xylB-Gene usw. Für die Transkription in einem Pilzwirt sind Beispiele geeigneter Promotoren die, die von dem Gen stammt, das kodiert für A. oryzae-TAKA-Amylase, Rhizomucor miehei-Aspartinproteinase, A. niger-neutral-alpha-Amylase, A. niger-säurestabile alpha-Amylase, A. niger-Glucoamylase, Rhizomucor miehei-Lipase, A. oryzae-alkalische Protease, A. oryzae-Triosephosphat isomerase oder A. nidulans-Acetamidase.

[0083] Der Expressionsvektor der Erfindung kann auch einen geeigneten Transkriptionsterminator und in Eukaryoten Polyadenylations-Sequenzen umfassen, die operativ mit der DNA-Sequenz verbunden sind, die die alpha-Amylase-Variante der Erfindung kodieren. Die Terminations- und Polyadenylationssequenzen können geeigneterweise von den gleichen Quellen stammen wie der Promotor.

[0084] Der Vektor kann weiterhin eine DNA-Sequenz umfassen, die den Vektor befähigen, in der in Rede stehenden Wirtszelle zu replizieren. Beispiele solcher Sequenzen sind die Replikationsursprünge der Plasmide pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 und pIJ702.

[0085] Der Vektor kann auch einen selektierbaren Marker umfassen, z.B. ein Gen, dessen Produkt einen Defekt in der Wirtszelle ausgleicht, wie die dal-Gene aus B. subtilis oder B. licheniformis, oder die eine Antibiotikaresisten verleihen, wie Ampicillin-, Kanamycin-, Chloramphenicol- oder Tetracyklin-Resistenz. Weiterhin kann der Vektor Aspergillus-Selektionsmarker, wie amdS, argB, niaD und sC, einen Marker, der eine Hygromycin-Resistenz erzeugt, umfassen, oder die Selektion kann durch eine Co-Transformation, wie sie z.B. in der WO 91/17243 beschrieben ist, erreicht werden.

[0086] Während die intrazelluläre Expression in mancher Hinsicht vorteilhaft sein kann, wenn z.B bestimmte Bakterien als Wirtszellen verwendet werden, ist es im Allgemeinen bevorzugt, dass die Expression extrazellulär abläuft. Im Allgemeinen umfasst die hier genannte *Bacillus-alpha-Amylase* eine Prä-Region, die die Sekretion der exprimierten Protease in das Kulturmedium ermöglicht. Wenn es erwünscht wird, kann diese Prä-Region durch eine davon verschiedene Prä-Region oder eine Signal-Sequenz ersetzt sein, was üblicherweise durch die Substitution der DNA-Sequenzen erreicht wird, die die entsprechenden Prä-Regionen kodieren.

[0087] Die Verfahren, die verwendet werden, um das DNA-Konstrukt der Erfindung, das die alpha-Amylase-Variante kodiert, den Promotor, Terminator bzw. die anderen Elemente zu ligieren und sie in einen geeigneten Vektor zu insertieren, der für die Replikation notwendigen Informationen enthält, sind dem Fachmann auf diesem Gebiet gut bekannt (vgl. z. B. Smabrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor, 1989).

[0088] Die Zelle der Erfindung, die entweder ein DNA-Konstrukt oder einen Expressionsvektor der Erfindung umfasst, wie sie vorstehend definiert sind, wird vorteilhafterweise als Wirtszelle bei der rekombinanten Herstellung einer alpha-Amylase der Erfindung verwendet. Die Zelle kann mit dem DNA-Konstrukt der Erfindung transformiert sein, das die Variante kodiert, geeigneterweise durch Integrieren des DNA-Konstrukts (in einer oder mehreren Kopien) in das Wirtschromosom. Diese Integration wird allgemein als vorteilhaft angesehen, da die DNA-Sequenz viel eher stabil in der Zelle verbleibt. Die Integration der DNA-Konstrukte in das Wirtschromosom kann gemäß üblicher Verfahren durchgeführt werden, z. B. die homologe oder heterologe Rekombination. Alternativ kann die Zelle mit einem Expressionsvektor, wie er vorstehend beschrieben wurde, in Verbindung mit den verschiedenen Typen von Wirtszellen transformiert wird.

[0089] Die Zelle der Erfindung kann eine Zelle eines höheren Organismus sein, wie ein Säuger oder ein Insekt, aber sie ist vorzugsweise eine mikrobielle Zelle, z. B. eine bakterielle oder eine pilzliche Zelle (einschließlich Hefezellen).

[0090] Beispiele geeigneter Bakterien sind grampositive Bakterien, wie *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus latus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circularis*, *Bacillus laetus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis* oder *Streptomyces lividans* oder *Streptomyces murinus* oder grammnegative Bakterien, wie *E. coli*. Die Transformation der Bakterien kann z.B. durch Protoplastentransformation oder durch Verwendung kompetenter Zelle in einer an sich bekannten An erfolgen.

[0091] Der Hefeorganismus kann bevorzugterweise ausgewählt werden von einer Spezies von *Saccharomyces* oder *Schizosaccharomyces*, z.B. *Saccharomyces cerevisiae*. Der filamentöse Pilz kann vorteilhafterweise gehören zu einer Spezies von *Aspergillus*, z.B. *Aspergillus oryzae* oder *Aspergillus niger*. Pilzzellen können durch ein Verfahren transformiert werden, das die Protoplastenbildung und die Transformation der Protoplasten, gefolgt von der Regeneration der Zellwand in einer an sich bekannten An umfasst. Ein geeignetes Verfahren zur Transformation von *Aspergillus*-Wirtszellen ist in EP 238 023 beschrieben.

[0092] In einem noch weiteren Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auf ein Verfahren zur Herstellung einer alpha-Amylase-Variante der Erfindung, wobei das Verfahren die Kultivierung einer Wirtszelle, wie sie vorstehend beschrieben ist, unter für die Produktion der Variante förderlichen Bedingungen, und Gewinnen der Variante aus den Zellen und/oder dem Kulturmedium umfasst.

[0093] Das Medium, das verwendet wird, um die Zellen zu kultivieren, kann jedes konventionelle Medium sein, das für das Wachsen der in Rede stehenden Wirtszelle und die Erreichung einer Expression einer alpha-Amylase-Variante der Erfindung geeignet ist. Geeignete Medien sind von kommerziellen Lieferanten erhältlich oder können nach veröffentlichten Rezepten hergestellt werden (z.B. wie in den Katalogen der American Type Culture Collection beschrieben).

[0094] Die alpha-Amylase-Variante, die aus der Wirtszelle sekretiert, kann üblicherweise aus dem Kulturmedium durch gut bekannte Verfahren gewonnen werden, einschließlich Trennen der Zellen aus dem Medium durch Zentrifugation oder Filtration, Präzipitation von proteinartigen Bestandteilen des Mediums mittels eines Salzes, wie Ammoniumsulfat, gefolgt von dem Einsatz chromatographischer Verfahren, wie Ionenaustausch-chromatographie, Affinitätschromatographie oder dergleichen.

Industrielle Anwendungen

[0095] Die alpha-Amylase-Varianten der Erfindung besitzen wertvolle Eigenschaften, die eine Vielzahl von industriellen Anwendungen ermöglichen. Insbesondere sind die Enzymvarianten der Erfindung als Komponente in Wasch-, Spül- und Hartflächen-Reinigungs-Detergenzzusammensetzung anwendbar. Eine Vielzahl von Varianten ist zur Herstellung von Süßungsmitteln und Ethanol, z.B. Brenn-, Drink- und Industrieethanol, aus Stärke und/oder zur Entschichtung von Textilien besonders nützlich. Die Bedingungen für die konventionellen Stärkeumwandlungsprozesse, einschließlich der Stärkeverflüssigungs- und/oder der Verzuckerungsprozesse sind z.B. in US 3,912,590 und in den EP-Veröffentlichungen Nr. 252 730 und 63 909 beschrieben.

Herstellung von Süßungsmitteln aus Stärke

[0096] Ein „traditionelles“ Verfahren zur Umwandlung von Stärke in Fruktosesyrup besteht normalerweise aus drei konsekutiven enzymatischen Prozessen, nämlich ein Verflüssigungsprozess gefolgt von einem Verzuckerungs-Prozess und einem Isomerisierungsprozess. Während des Verflüssigungsprozesses wird Stärke in Dextrine durch eine alpha-Amylase (z.B. Termamyl™) bei pH-Werten zwischen 5,5 und 6,2 und bei Temperaturen von 95–160 °C für eine Zeitspanne von etwa 2 Stunden abgebaut. Um eine optimale Enzymstabilität unter diesen Bedingungen sicher zu stellen wird 1 mM Calcium (40 ppm freie Calcium-Ionen) zugegeben.

[0097] Nach dem Verflüssigungsprozess werden die Dextrine in Dextrose durch Zugabe einer Glucoamylase (z.B. AMG™) und einem Verzweigung-entfernenden Enzym, wie eine Isoamylase oder eine Pullulanase (z.B. Promozym™) umgewandelt. Vor diesem Schritt wird der pH auf einen Wert von unter 4,5 reduziert, wobei die hohe Temperatur (über 95 °C) beibehalten bleibt, und die verflüssigende alpha-Amylase-Aktivität wird denaturiert. Die Temperatur wird auf 60 °C erniedrigt, und die Glucoamylase und das Verzweigung-entfernende Enzym wird zugegeben. Der Verzuckerungs-Prozess schreitet für 24 bis 72 Stunden fort.

[0098] Nach dem Verzuckerungsprozess wird der pH auf einen Wert im Bereich von 6–8 erhöht, vorzugsweise 7,5, und das Calcium wird durch Ionenaustausch entfernt. Der Dextrosesyrup wird dann in den Hochfruktosyrum unter Verwendung einer immobilisierten Glucoisomerase (wie Sweetzyme™) umgewandelt.

[0099] Mindestens eine enzymatische Verbesserung dieses Prozesses könnte ins Auge gefasst werden: die Reduktion der Calciumabhängigkeit der verflüssigenden alpha-Amylase. Die Zugabe von freiem Calcium ist erforderlich, um die adäquate hohe Stabilität der alpha-Amylase sicher zu stellen, aber freies Calcium inhibiert die Aktivität der Glucoseisomerase stark und muss mittels einer teuren Einheitsoperation in einem Ausmaß entfernt werden, der die Menge an freiem Calcium unter 3 – 5 ppm reduziert. Eine Kostensparnis kann erreicht werden, wenn eine solche Operation vermieden werden könnte, und der Verflüssigungsprozess ohne Zugabe von freien Calciumionen durchgeführt werden könnte.

[0100] Um dies zu erreichen ist eine weniger Calcium-abhängige Termamyl-ähnliche alpha-Amylase erforderliche, die bei niedrigen Konzentrationen von freiem Calcium (< 40 ppm) stabil und hoch aktiv ist. Eine solche Termamyl-ähnliche alpha-Amylase sollte ein pH-Optimum in einem pH im Bereich von 4,5 bis 6,5, vorzugsweise im Bereich von 4,5 bis 5,5, besitzen.

[0101] Die Erfindung betrifft auch eine Zusammensetzung, die ein Gemisch von einer oder mehreren Varianten der Erfindung umfasst, die (als die ursprüngliche Termamyl-ähnliche alpha-Amylase) von der B. stearothermophilus alpha-Amylase mit der in SEQ ID Nr. 8 gezeigten Sequenz und einer Termamyl-ähnlichen alpha-Amylase von der B. licheniformis-alpha-Amylase mit der in SEQ ID Nr. 4 gezeigten Sequenz stammt.

[0102] Eine alpha-Amylase-Variante der Erfindung oder eine Zusammensetzung der Erfindung kann in einem Aspekt der Erfindung zur Stärkeverflüssigung, in einer Detergenzzusammensetzung, wie ein Waschmittel, eine Spülmittelzusammensetzung und einen Hartflächenreiniger, zur Ethanolproduktion, wie Brenn-, Trink- und Industrieethanol-Herstellung, zum Entschichten von Textilien, Textilstoffen und Bekleidung verwendet werden.

MATERIAL UND METHODEN

Enzyme

LE174: Hybrid-alpha-Amylase-Variante:

[0103] LE174 ist ein Termamyl-ähnliches alpha-Amylase-Hybrid, die mit der Termamyl-Sequenz identisch ist, d.h. der in SEQ ID Nr. 4 gezeigten *Bacillus licheniformis*-alpha-Amylase mit der Ausnahme, dass die 35 N-terminalen Aminosäurereste (des reifen Peptides) durch die 33 N-terminalen Reste von BAN (reifes Peptid) ersetzt sind, d. h. *Bacillus amyloliquefaciens*-alpha-Amylase, die in SEQ ID Nr. 6 gezeigt ist, die weiterhin die folgenden Mutationen aufweist: H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S (SEQ ID Nr. 4)

LE429 Hybrid-alpha-Amylase-Variante:

[0104] LE429 ist ein Termamyl-ähnliches alpha-Amylase-Hybrid, das mit der Termamyl-Sequenz identisch ist, d.h. der in SEQ ID Nr. 4 gezeigten *Bacillus licheniformis*-alpha-Amylase, mit der Ausnahme, dass die 35 N-terminalen Aminosäurereste (des reifen Peptides) durch die 33 N-terminalen Reste von BAN (reifes Peptid) ersetzt wurden, d.h. *Bacillus amyloliquefaciens*-alpha-Amylase, die in SEQ ID Nr. 6 gezeigt ist, das weiterhin die folgenden Mutationen aufweist:

H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + I291F (SEQ ID Nr. 4). LE329 ist in SEQ ID Nr. 2 gezeigt und wurde mittels SOE-PCR (Higuchi et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:7351) konstruiert.

[0105] Dextrozym™ E: eine ausgeglichenes Gemisch der Glucoamylase (AMG) und Pullulanase, die aus ausgewählten Stämmen von *Aspergillus niger* und *Bacillus deramificans* (erhältlich von Novo Nordisk A/S) erhältlich ist.

Fermentation und Reinigung der alpha-Amylase-Varianten

[0106] Ein *B. subtilis*-Stamm, der das relevante Expressionsplasmid trägt, wird auf einer LB-Agar-Platte mit 10 µg/ml Kanamycin von –80 °C Ausgangsmaterial ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C gewachsen.

[0107] Die Kolonien wurden in 100 ml BPX-Medium, das mit 10 µg/ml Kanamycin ergänzt war, in einen 500 ml Schüttelkolben transferiert.

Zusammensetzung des BPX-Medium:

| | |
|--|---------|
| Kartoffelstärke | 100 g/l |
| Gerstenmehl | 50 g/l |
| BAN 5000 SKB | 0,1 g/l |
| Natriumcaseinat | 10 g/l |
| Sojabohnenmehl | 20 g/l |
| Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O | 9 g/l |
| Pluronic™ | 0,1 g/l |

[0108] Die Kulturen werden bei 37 °C bei 270 U/Min für 5 Tage geschüttelt.

[0109] Zellen und Zellbruchstücke werden aus der Fermentationsbrühe durch Zentrifugation bei 4500 U/Min während 20 – 25 Minuten abgetrennt. Danach wurde der Überstand filtriert, um eine vollständig klare Lösung zu erhalten. Das Filtrat wird konzentriert und an einem UF-Filter (1000 Ausschlussgrenze-Membran) gewaschen, und der Puffer wird zu 20 mM Acetat pH 5,5 gewechselt. Das UF-Filtrat wird an eine S-Sepharose F.F. aufgetragen und die Elution wird mittels einer Stufenelution mit 0,2 M NaCl mit dem gleichen Puffer durchgeführt. Das Eluat wird gegen 10 mM Tris pH 9,0 dialysiert und auf eine Q-Sepharose F.F. aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 0 – 0,3 M NaCl über 6 Säulenvolumen eluiert. Die Fraktionen, die die Aktivität enthalten (gemessen mittels Phadebas-Assay), werden vereinigt, der pH wird eingestellt auf einen pH von 7,5 und die verbleibende Farbe wurde durch Behandeln mit 0,5 % Gewicht/Volumen Aktivkohle während 5 Minuten entfernt.

Aktivitätsbestimmung-(KNU)

[0110] Ein (1) Kilo-alpha-Amylase-Einheit (1 KNU) ist die Menge des Enzyms, die 5,26 g Stärke (Merck, Amy-

Ium Solubile, Erg. B 6, Batch 9947275) pro Stunde im Novo Nordisk-Standardverfahren für die Bestimmung der alpha-Amylase abbaut, basierend auf den folgenden Bedingungen:

| | |
|---------------------------------|-----------------|
| Substrat | lösliche Stärke |
| Calcium-Gehalt im Lösungsmittel | 0,0043 M |
| Reaktionszeit | 7 – 20 Minuten |
| Temperatur | 37 °C |
| pH | 5,6 |

[0111] Die genaue Beschreibung des analytischen Verfahrens von Novo Nordisk (AF 9) ist auf Anfrage erhältlich.

Assay für die alpha-Amylase-Aktivität

[0112] Die alpha-Amylase-Aktivität wird mittels eines Verfahrens bestimmt, bei dem Phadebas®-Tabletten als Substrat eingesetzt werden. Phadebas-Tabletten (Phadebas®-Amylase-Test, erhältlich von Pharmacia Diagnostic) enthält ein vernetztes unlösliches blau-gefärbtes Stärke-Polymer, das mit bovinem Serumalbumin und einer Puffer-Substanz gemischt und zu einer Tablette verarbeitet wurde.

[0113] Für jede einzelne Messung wird eine Tablette in einem Röhrchen mit 5 ml 50 mM Britton-Robinson-Puffer (50 mM Essigsäure, 50 mM Phosphorsäure, 50 mM Borsäure, 0,1 mM CaCl₂, pH auf den interessierenden Wert mit NaOH eingestellt). Der Test wird in einem Wasserbad bei der interessierenden Temperatur durchgeführt. Die alpha-Amylase, die getestet werden soll, wird in x ml 50 mM Britton-Robinson-Puffer verdünnt. 1 ml dieser alpha-Amylase-Lösung wird zu 5 ml 50 mM Britton-Robinson-Puffer zugegeben. Die Stärke wird durch die alpha-Amylase hydrolysiert, was lösliche blaue Fragmente ergibt. Die Extinktion der resultierenden blauen Lösung, die spektralphotometrisch bei 620 nm gemessen wird, ist eine Funktion der alpha-Amylase-Aktivität.

[0114] Es ist wichtig, dass die bei 620 nm gemessene Extinktion nach 10 oder 15 Minuten der Inkubation (Testzeit) im Bereich von 0,2 bis 2,0 Extinktionseinheiten bei 620 nm liegt. In diesem Extinktions-Bereich liegt eine Linearität zwischen der Aktivität und Extinktion (Lamber-Beer-Gesetz) vor. Die Verdünnung des Enzyms sollte daher eingestellt werden, um dieses Kriterium zu erfüllen. Unter einem speziellen Satz von Bedingungen (Temperatur, pH, Reaktionszeit, Pufferbedingungen) wird 1 mg einer gegebenen alpha-Amylase eine bestimmte Menge des Substrates hydrolysiert und eine blaue Farbe erzeugt werden. Die Farbtiefe wird bei 620 nm gemessen. Die gemessene Extinktion ist direkt proportional zur spezifischen Aktivität (Aktivität/mg des reinen alpha-Amylase-Proteins) der in Rede stehenden alpha-Amylase unter dem gegebenen Satz an Bedingungen.

Bestimmen der spezifischen Aktivität

[0115] Die spezifische Aktivität wird unter Verwendung des Phadebas-Assays (Pharmacia) als Aktivität/mg Enzym bestimmt.

Messen des pH -Aktivitätsprofils (pH-Stabilität)

[0116] Die Variante wird in 20 mM Tris pH 7,5, 0,1 mM CaCl₂ aufbewahrt und bei 30 °C, 50 mM Britton-Robinson, 0,1 mM CaCl₂ getestet. Die pH-Aktivität wird bei pH 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 7,0, 8,0, 9,5, 9,5, 10 und 10,5 gemessen, wobei der vorstehend beschriebene Phadabas-Assay verwendet wurde.

Bestimmung der AGU-Aktivität und als AGU/mg

[0117] Eine (1) Novo Amyloglucosidase-Einheit (AGU) ist als die Menge Enzym definiert, die 1 µmol Maltose pro Minute bei 37 ° und pH 4,3 hydrolysiert. Eine genaue Beschreibung des analytischen Verfahrens (AEL-SM-0131) ist auf Anfrage von Novo Nordisk erhältlich.

[0118] Die Aktivität wird als AGU/ml durch ein Verfahren bestimmt, das danach (AEL-SM-0131) modifiziert wurde, wobei der Glucose-GOD-Perid-Kit von Boehringer Mannheim 124036 verwendet wurde. AMG-Standard, Scharge 7-1195, 195 AGU/ml.

[0119] 375 µl Substrat (1 % Maltose in 50 mM Natriumacetat, pH 4,3) wird 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. 25

μ l Enzym, das in Natriumacetat verdünnt ist, wird zugegeben. Die Reaktion wird nach 10 Minuten durch Zugabe von 100 μ l 0,25 M NaOH gestoppt. 20 μ l wird auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte transferiert, und 200 μ l GOD-Perid-Lösung wird zugegeben. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wird die Absorption bei 650 nm gemessen und die Aktivität in AGU/ml aus dem AMG-Standard berechnet.

[0120] Die spezifische Aktivität in AGU/mg wird dann aus der Aktivität (AGU/ml) geteilt durch die Proteinkonzentration (mg/ml) berechnet.

BEISPIELE

BEISPIEL 1 (Referenzbeispiel)

Konstruktion von Termamyl-Varianten gemäß der Erfindung.

[0121] Termamyl (*B. licheniformis* alpha-Amylase SEQ ID Nr. 4) wird in *B. subtilis* aus dem Plasmid exprimiert, das als pDN1528 bezeichnet ist. Dieses Plasmid enthält das vollständige Gen, das Termamyl kodiert, amyL, dessen Expression durch seinen eigenen Promotor gesteuert wird. Ferner enthält das Plasmid den Replikationsursprung, ori, aus dem Plasmid pUB110 und das cat-Gen aus dem Plasmid pC194, das Resistenz gegenüber Chloramphenicol verleiht. pDN1528 ist in **Fig. 9** der WO 96/23874 dargestellt. Ein spezifischer Mutagenesevektor, der den Hauptteil der kodierenden Region der SEQ ID No. 3 enthält, wurde hergestellt. Das wichtige Merkmal dieses Vektors, der als pJeEN1 bezeichnet wird, umfasst den Replikationsursprung, der vom Plasmid pUC stammt, das cat-Gen, das Resistenz gegen Chloramphenicol verleiht, und eine Frameshift-haltige Version des bla-Gens, dessen Wildtyp normalerweise Resistenz gegenüber Ampicillin (amp^R-Phänotyp) verleiht. Diese mutierte Version resultiert in einem amp^S-Phänotyp. Das Plasmid pJeEN1 ist in **Fig. 1** der WO 96/23874 dargestellt, und der Replikationsursprung von *E. coli*, ori, bla, cat, die 5'-trunkierte Version des Termamyl-Amylase-Gens und ausgewählten Restriktionsstellen sind auf dem Plasmid angegeben.

[0122] Mutationen werden in amyL durch das von Deng und Nickoloff (1992, Anal. Biochem. 200, Seiten 81 – 88) beschriebene Verfahren eingeführt, mit der Ausnahme, dass Plasmide die mit dem „Selektionsprimer“ (Primer #6616, siehe unten) inkorporiert sind, basierend auf dem amo^R-Phänotyp der transformierten *E. coli*-Zellen ausgewählt werden, die ein Plasmid mit einem reparierten bla-Gen tragen, anstelle des Einsatzes der Selektion durch Restriktionsenzymverdauung, die von Deng und Nickoloff dargestellt wurden. Chemikalien und Enzyme, die für die Mutagenese verwendet wurden, wurden aus dem ChameleonÔ-Mutagenese-Kit von Stratagene (Katalog-Nummer 200509) erhalten.

[0123] Nach der Verifikation der DNA-Sequenz in Variantenplasmiden wird das trunkierte Gen, das die gewünschte Änderung enthält, in pDN1528 als PstI-EcoRI-Fragment subkloniert und in den Protease- und Amylase-depletierten *Bacillus subtilis*-Stamm SHA273 (beschrieben in WO 92/11357 und WO 95/10603) transformiert, um das Variantenenzym zu exprimieren.

[0124] Die Termamyl-Variante V54W wurde durch Verwendung der folgenden Mutagenese-primer konstruiert (geschrieben von 5' zu 3', links nach rechts):

PG GTC GTA GGC ACC GTA GCC CCA ATC CGC TTG (SEQ ID Nr. 9)

[0125] Die Termamyl-Variante A52W + V54W wurde durch Verwendung der folgenden Mutageneseprimer konstruiert (geschrieben von 5' zu 3', links nach rechts):

PG GTC GTA GGC ACC GTA GCC CCA ATC CCA TTG GCT CG (SEQ ID Nr. 10)

Primer #6616 (geschrieben von 5' zu 3', links nach rechts; P bezeichnet ein 5'-Phosphat):

P CTG TGA CTG GTG AGT ACT CAA CCA AGT C (SEQ ID Nr. 11)

[0126] Die Termamyl-Variante V54E wurde unter Verwendung des folgenden Mutageneseprimers konstruiert (geschrieben von 5' – 3', links nach rechts):

PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCC TCA TCC GCT TG (SEQ ID Nr. 12)

[0127] Die Termamyl-Variante V54M wurde unter Verwendung des folgenden Mutageneseprimers konstruiert (geschrieben 5' – 3', links nach rechts):

PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCC ATA TCC GCT TG (SEQ ID Nr. 13)

[0128] Die Termamyl-Variante V54I wurde unter Verwendung des folgenden Mutageneseprimers konstruiert (geschrieben 5' – 3', links nach rechts):

PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCA ATA TCC GCT TG (SEQ ID Nr. 14)

[0129] Die Termamyl-Varianten Y290E und Y290K wurden unter Verwendung des folgenden Mutageneseprimers konstruiert (geschrieben 5' – 3', links nach rechts):

PGC AGC ATG GAA CTG CTY ATG AAG AGG CAC GTC AAA C (SEQ ID Nr. 15)

Y stellt eine gleiche Mischung von C und T dar. Das vorliegen eines Codons, das entweder Glutamat oder Lysin in der Position 290 kodiert, wurde durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

[0130] Die Termamyl-Avariante N190F wurde durch Verwendung des folgenden Mutageneseprimers konstruiert (geschrieben von 5' – 3', links nach rechts).

PCA TAG TTG CCG AAT TCA TTG GAA ACT TCC C (SEQ ID Nr. 16)

[0131] Die Termamyl-Variante N188P + N190F wurde unter Verwendung des folgenden Mutageneseprimers konstruiert (geschrieben von 5' – 3', links nach rechts):

PCA TAG TTG CCG AAT TCA GGG GAA ACT TCC CAA TC (SEQ ID Nr. 17)

[0132] Die Termamyl-Variante H140K + H142D wurde unter Verwendung des folgenden Mutageneseprimers konstruiert (geschrieben von 5' – 3', links nach rechts):

PCC GGC CCC CGG GAA ATC AAA TTT TGT CCA GGC TTT AAT TAG (SEQ ID Nr. 18)

[0133] Die Termamyl-Variante H156Y wurde unter Verwendung des folgenden Mutageneseprimers konstruiert (geschrieben von 5' – 3', links nach rechts):

PCA AAA TGG TAC CAA TAC CAC TTA AAA TCG CTG (SEQ ID Nr. 19)

[0134] Die Termamyl-variante A181T wurde unter Verwendung des folgenden Mutageneseprimers konstruiert (geschrieben 5' – 3', links nach rechts):

PCT TCC CAA TCC CAA GTC TTC CCT TGA AAC (SEQ ID Nr. 20)

[0135] Die Termamyl-Variante A209V wurde unter Verwendung des folgenden Mutageneseprimers konstruiert (geschrieben 5' – 3', links nach rechts):

PCTT AAT TTC TGC TAC GAC GTC AGG ATG GTC ATA ATC (SEQ ID Nr. 21)

[0136] Die Termamyl-Variante Q264S wurde unter Verwendung des folgenden Mutageneseprimers konstruiert (geschrieben 5' – 3', links nach rechts):

PCG CCC AAG TCA TTC GAC CAG TAC TCA GCT ACC GTA AAC (SEQ ID Nr. 22)

[0137] Die Termamyl-Variante S187D wurde unter Verwendung des folgenden Mutageneseprimers konstruiert (geschrieben 5' – 3', links nach rechts):

PGC CGT TTT CAT TGT CGA CTT CCC AAT CCC (SEQ ID Nr. 23)

[0138] Die Termamyl-Variante DELTA (K370-G371-D372) (d.h. deletierte Aminosäurereste Nr. 370 371 und 372) wurde unter Verwendung des folgenden Mutageneseprimers konstruiert (geschrieben 5' – 3', links nach rechts):

PGG AAT TTC GCG CTG ACT AGT CCC GTA CAT ATC CCC (SEQ ID Nr. 24)

[0139] Die Termamyl-Variante DELTA(D372 – S373 – Q374) wurde unter Verwendung des folgenden Mutageneseprimers konstruiert (geschrieben 5' – 3', links nach rechts):

PGG CAG GAA TTT CGC GAC CTT TCG TCC CGT ACA TAT C (SEQ ID Nr. 25)

[0140] Die Termamyl-Varianten A181T und A209V wurden zu A181T + A209V kombiniert, in dem das A181T-enthaltende pDN1528-ähnliche Plasmid (d.h. pDN1528, das in dem amyL die Mutation enthält, die aus der A181T-Änderung resultiert) und das A209V-enthaltende pDN1528-ähnliche Plasmid (d.h. pDN1528, das in amyL die Mutation enthält, die aus der A209V-Änderung resultiert) mit dem Restriktionsenzym Clal, das die pDN1528-ähnlichen Plasmide zweimal schneidet, was in einem Fragment mit 1116 Basenpaaren resultiert, und der Vektor-Teil (d.h. er enthält den Replikationsursprung des Plasmids) von 3850 Basenpaaren. Das Fragment, das die A209V-Mutation enthält, und der Vektor-Teil, der die A181T-Mutation enthält, wurden mit einem QIAquick-Gel-Extraktions-Kit (gekauft von QIAGEN) nach der Trennung an einem Agarose-Gel gereinigt. Das Fragment und der Vektor wurden ligiert und in den Protease- und Amylase-depletierten *Bacillus subtilis*-Stamm transformiert, auf den oben Bezug genommen wurde. Das Plasmid amy+ (Clearing-Zone an Stärke-haltigen Agar-Platten) und Chloramphenicol-resistente Transformanten wurden auf das Vorliegen beider Mutanten auf

dem Plasmid untersucht.

[0141] In ähnlicher Weise wie vorstehend beschrieben wurden H156Y und A209V kombiniert, wobei die Restriktionsendonukleasen Acc65I und EcoRI verwendet wurden, die H156Y + A209V ergaben.

[0142] H156Y + A209V und A181T + A209V wurden zu H156Y + A181T + A209V durch Verwendung der Restriktionsendonuclease Acc65I und HindIII kombiniert.

[0143] Die 35 N-terminalen Reste des reifen Teils der Termamyl-Variante H156Y + A181T + A209V wurden durch die 33 N-terminalen Reste der *B. amyloliquefaciens*-alpha-Amylase (SEQ ID Nr. 4) (die im vorliegenden Zusammenhang als BAN bezeichnet wird) durch einen SOE-PCR-Ansatz (Higuchi et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:7351) wie folgt substituiert:

Primer 19364 (Sequenz 5' – 3'): CCT CAT TCT GCA GCA GCA GCC GTA AAT GGC ACG CTG (SEQ ID Nr. 26)

Primer 19362: CCA GAC GGC AGT AAT ACC GAT ATC CGA TAA ATG TTC CG (SEQ ID Nr. 27)

Primer 19363: CGG ATA TCG GTA TTA CTG CCG TCT GGA TTC (SEQ ID Nr. 28)

Primer 1 C: CTC GTC CCA ATC GGT TCC GTC (SEQ ID Nr. 29)

[0144] Eine Standard PCR, Polymerasekettenreaktion, wurde durchgeführt, wobei die Pwothermostabile Polymerase von Boehringer Mannheim nach den Vorschriften der Herstellers und den Temperaturzyklen verwendet wurde: 5 Minuten bei 94 °C, 25 Zyklen von (94 °C für 30 Sekunden, 50 °C für 45 Sekunden, 72 °C für 1 Minute), 72 °C für 10 Minuten.

[0145] Ein etwa 130 Basenpaar-Fragment wurde in einer ersten PCR mit den Primern 19364 und 19362 an einem DNA-Fragment mit dem Gen, das die *B. amyloliquefaciens*-alpha-Amylase kodiert, amplifiziert, die als PCR1 bezeichnet wurde.

[0146] Ein etwa 400 Basenpaar-Fragment wurde in einer anderen PCR mit den Primern 19363 und 1 C an einem Templat pDN1528 amplifiziert, die als PCR2 bezeichnet wurde.

[0147] Die PCR1 und die PCR2 wurden vom Agarose-Gel gereinigt und als Vorlagen in der PCR3 mit den Primeern 19364 und 1 C verwendet, was in einem Fragment von etwa 520 Basenpaaren resultiert. Dieses Fragment enthielt somit einen Teil der DNA, die den N-Terminus von BAN kodiert, der an einen Teil der DNA fusioniert ist, der das Termamyl von der 35. Aminosäure kodiert.

[0148] Das 520-Basenpaar-Fragment wurde in ein pDN1528-ähnliches Plasmid (das das Gen enthält, das die Termamyl-Variante H156Y + A181T + A209V kodiert) durch Verdauen mit den Restriktionsendonukleasen PstI und SacII, Ligation und Transformation des *B. subtilis* Stammes, wie vorstehend beschrieben, subkloniert. Die DNA-Sequenz zwischen den Restriktionsstellen PstI und SacII wurde durch DNA-Sequenzierung in einem extrahierten Plasmid aus amy+ und Chloramphenicol-resistenten Transformanten verifiziert.

[0149] Das Endkonstrukt, das den korrekten N-Terminus aus BAN und H156Y + A181T + A209V enthielt, wurde als BAN(1 – 35) + H156Y + A181T + A209V bezeichnet.

[0150] N190 wurde mit BAN(1 – 35) + H156Y + A181T + A209V kombiniert, was BAN(1 – 35) + H156Y + A181T + N190F + A209V ergibt, indem eine Mutagenese wie sie vorstehend beschrieben wurde, durchgeführt wurde, mit der Ausnahme, dass die Sequenz amyL in pJeEN1 durch die DNA-Sequenz substituiert wurde, die die Termamyl-Variante BAN(1 – 35) + H156Y + A181T + A209V kodiert.

[0151] Q264S wurde mit BAN(1 – 35) + H156Y + A181T + A209V kombiniert, was BAN(1 – 35) + H156Y + A181T + A209V + Q264S ergibt, indem eine Mutagenese, wie sie vorstehend beschrieben wurde, durchgeführt wurde, mit der Ausnahme, dass die Sequenz amyL in pJeEN durch die DNA-Sequenz substituiert wurde, die die Termamyl-Variante BAN(1 – 35) + H156Y + A181T + A209V kodiert.

[0152] BAN(1 – 35) + H156Y + A181T + A209V + Q264S und BAN(1 – 35) + H156Y + A181T + N190F + A209V wurden in BAN(1 – 35) + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S kombiniert, indem die Restriktionsendonukleasen BsaHI (BsaHI-Stelle wurde nahe der A209-Mutation eingeführt) und PstI verwendet wurden.

[0153] I201F wurde mit BAN(1 – 35) + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S kombiniert, was BAN(1 – 35) + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + I201F (SEQ ID Nr. 2 ergibt, indem eine vorstehend be-

schriebene Mutagenese durchgeführt wurde. Der Mutageneseprimer AM100 wurde verwendet, der die I20F-Substitution einführt, und gleichzeitig eine Cla I-Restriktionstelle entfernt, was das leichte Nadelpunktier („pinpointing“) der Mutanten erleichtert.

[0154] Primer AM 100:

5' GATGTATGCCGACTTCGATTATGACC 3' (SEQ ID Nr. 3)

BEISPIEL 2 (Referenzbeispiel)

[0155] Konstruktion der Termamyl-ähnlichen alpha-Amylase-Varianten mit einem geändertem Spaltmuster gemäß der Erfindung

[0156] Die Variante der thermostabilen B. licheniformis-alpha-Amylase umfasst die 445 C-terminalen Aminosäurereste der in SEQ ID Nr. 4 gezeigten B. licheniformis-alpha-Amylase und den 37 N-terminalen Aminosäureresten der alpha-Amylase, die von B. aymoliquefaciens stammt und in SEQ ID Nr. 6 gezeigt ist, und weiterhin umfasst sie folgende Mutation:

H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + I201F (die Konstruktion dieser Variante ist in Beispiel 1 beschrieben, und die Aminosäuresequenz ist in SEQ ID Nr. 2 gezeigt), die eine verminderte Fähigkeit zur Spaltung des Substrates nahe dem Verzweigungspunkt aufweist.

[0157] In einem Versuch, die verminderte Fähigkeit zur Spaltung des Substrates nahe dem Verzweigungspunkt der alpha-Amylase-Variante zu verbessern, wurde eine ortsspezifische Mutagenese unter Verwendung des Mega-Primer-Verfahrens durchgeführt, das bei Sarkar und Sommer, 1990 (BioTechniques 8: 404-407) beschrieben ist.

Konstruktion von LE313: BAN/Termamyl-Hybrid + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + V54N:

[0158] Der genspezifische Primer 27274 und der mutagene Primer AM115 wurden verwendet, um mittels PCR ein etwa 440 Basenpaar-DNA-Fragment aus dem pDN1528-ähnlichen Plasmid (das die BAN(1 – 35) + H156Y + A181T + N190F + I201F + A209V + Q264S-Mutationen in dem Gen trägt, das die Amylase aus SEQ ID Nr. 4 kodiert) zu amplifizieren.

[0159] Das 440 Basenpaar-Fragment wird von einem Agarose-Gel gereinigt und als Mega-Primer zusammen mit dem Primer 113711 in einer zweiten PCR verwendet, die an dem gleichen Template durchgeführt wird.

[0160] Das resultierende etwa 630 Basenpaar-Fragment wird mit den Restriktionsenzymen EcoR V und Acc65I verdaut, und das resultierende etwa 370 Basenpaar-Fragment wird gereinigt und mit dem pDN1528-ähnlichen Plasmid, das mit den gleichen Enzymen verdaut wurde, ligiert.

[0161] Kompetente *Bacillus subtilis* SHA273-Zellen (Amylase und Protease niedrig) wurden mit der Ligation transformiert, und Chloramphenicol-resistenten Transformanten wurden mittels DNA-Sequenzierung überprüft, um das Vorliegen der korrekten Mutation auf dem Plasmid zu verifizieren.

Primer 27274:

5' CATAGTTGCCGAATTCAATTGGAAACTTCCC 3' (SEQ ID Nr. 31)

Primer 1 B:

5' CCGAATTGCTGACGCTGTTATTGC 3' (SEQ ID Nr. 32)

Primer AM115:

5' GCCAAGCGGATAACGGCTACGGTGC 3' (SEQ ID Nr. 33)

[0162] Konstruktion von LE314: BAN/Termamyl-Hybrid + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + A52S wird in ähnlicher Weise ausgeführt mit der Ausnahme, dass der mutagene Primer AM116 verwendet wird.

AM116:

5' GAACGAGCCAATCGGACGTGGCTACGG 3' (SEQ ID Nr. 34)

[0163] Die Konstruktion von LE315: BAN/Termamyl-Hybrid + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + A52S + V54N wird in ähnlicher Weise durchgeführt mit der Ausnahme, dass der mutagene Primer AM117 verwendet wird.

Am117:

5' GGAACGAGCCAATCGGATAACGGCTACGGTGC 3' (SEQ ID Nr. 35)

[0164] Konstruktion von LE316: BAN/Termamyl-Hybrid + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + T49L wird in ähnliche Weise ausgeführt mit der Ausnahme, das der Primer AM118 verwendet wird.
AM118
5' GCATATAAGGGACTGAGCCAAGCGG 3' (SEQ ID Nr. 36)

[0165] Konstruktion von LE317: BAN/Termamyl-Hybrid + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + T49L + G107A wird in ähnlicher Weise durchgeführt mit der Ausnahme, dass der mutagene Primer AM118 und der mutagene Primer AM119 gleichzeitig verwendet werden.
AM119:
5' CAACCACAAAGCCGGCGCTGATGCG 3' (SEQ ID Nr. 37)

[0166] Konstruktion von LE318: BAN/Termamyl-Hybrid + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + A52S + V54N + T49L + G107A wird in ähnlicher Weise durchgeführt mit der Ausnahme, dass der mutagene Primer AM120 und der mutagenen Primer gleichzeitig verwendet werden.
AM120:
5' GCATATAAGGGACTGAGCCAATCGGATAACGGCTACGGTGC 3' (SEQ ID Nr. 38)

[0167] Konstruktion von LE319: BAN/Termamyl-Hybrid + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + A52S + V54N + T49L wird in ähnlicher Weise durchgeführt mit der Ausnahme, dass der mutagene Primer AM120 verwendet wird.

[0168] Konstruktion von LE320: BAN/Termamyl-Hybrid + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + A52S + G107A wird in ähnlicher Weise durchgeführt mit der Ausnahme, dass der mutagene Primer AAM119 verwendet wird.

[0169] Konstruktion von LE322: BAN/Termamyl-Hybrid + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + Q51R + A52S wird in ähnlicher Weise durchgeführt mit der Ausnahme, dass der mutagene Primer AM121 verwendet wird.

AM121:
5' GAACGAGCCGATCGGACGTGGGCTACGG 3' (SEQ ID Nr. 39)

[0170] Konstruktion von LE323: BAN/Termamyl-Hybrid + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + A52N wird in ähnlicher Weise durchgeführt mit der Ausnahme, dass der mutagene Primer AM122 verwendet wird:
5' GAACGAGCCAAACGACGTGGGCTACGG 3' (SEQ ID Nr. 40)

BEISPIEL 3 (Referenzbeispiel)

Testen der LE429-Varianten (Verzuckerung)

[0171] Die Standardreaktionsbedingungen waren:

| | |
|--------------------------|------------------|
| Substratkonzentration: | 30 Gew.-% |
| Temperatur | 60 °C |
| initialer pH (bei 60 °C) | 5,5 |
| Enzymdosierung | |
| Glucoamylase | 0,18 AGU/g DS |
| Pullulanase | 0,06 PUN/g DS |
| alpha-Amylase | 10 µg Enzym/g DS |

[0172] Dextrozym™ wurde verwendet, um die Glucoamylase- und Pullulanase-Aktivitäten bereitzustellen.

[0173] Die Substrate für die Verzuckerung wurden durch Auflösen üblicher Maisstärke in deionisiertem Wasser und Einstellen der trockenen Substanz auf etwa 30 Gew.-% hergestellt. Der pH wurde auf 5,5 (gemessen bei 60 °C) eingestellt, und Aliquote des Substrates, die 10 g Trockengewicht entsprechen, wurden in einen Blue-Cap-Glasskolben („blue cap glass flaks“) übertragen.

[0174] Die Kolben wurden dann in ein Wasserbad, das geschüttelt wird, platziert, auf 60 °C äquilibriert, und die Enzyme wurden zugegeben. Falls erforderlich wurde der pH wieder auf 5,5 eingestellt. Proben wurden nach 48 Stunden der Verzuckerung entnommen; der pH wurde auf etwa 3,0 eingestellt und dann in einem kochenden Wasserbad für 15 Minuten erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren. Nach dem Kühlen wurden die Pro-

ben mit etwa 0,1 g eines gemischten Bettionenaustauschharzes („mixed bed ion exchange resin“) (BIO-RAD 501 X8 (D)) während 30 Minuten mit einem Rotationsmischer behandelt, um Salz und lösliche Substanzen zu entfernen. Nach der Filtration wurde die Kohlenhydratzusammensetzung mittels HPLC bestimmt. Die folgenden Ergebnisse wurden erhalten:

Die ursprüngliche alpha-Amylase für die Varianten LE429

| Zugegebene alpha-Amylase-Variante | DP ₁ | DP ₂ | DP ₃ | Spezifische Aktivität (NU/mg) |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------------------|
| V54N | 96,1 | 1,75 | 1,18 | 8200 |
| A52s | 95,9 | 1,80 | 1,11 | 18800 |
| A52S + V54N | 96,3 | 1,84 | 1,08 | 10000 |
| T49L | 96,3 | 1,77 | 1,11 | 12300 |
| T49L +G107A | 96,4 | 1,87 | 0,72 | 13600 |
| A52S + V54N + T49L + G107A | 80,5 | 2,55 | 0,43 | 10000 |
| A52S + V54N + T49L | 95,8 | 1,76 | 0,84 | 8400 |
| G107A | 94,4 | 1,89 | 1,04 | 19600 |
| Q51R + A52S | 95,9 | 1,77 | 1,27 | 16500 |
| A52N | 95,5 | 1,89 | 1,56 | 17600 |
| LE174 (Kontrolle) | 95,9/95,8 | 1,87/1,83 | 1,17/1,35 | 16000 |

[0175] Verglichen mit der Kontrolle resultiert das Vorliegen einer aktiven alpha-Amylase-Variante der Erfindung während der Verflüssigung in einer verminderten Panose-Menge (DP₃).

[0176] Insbesondere resultieren die T49L + G107A-Variante von LE429 bzw. die ASZS + V54N + T49L-Variante von LE429 in einer drastisch verminderten Panos-Menge (DP₃). Wenn diese alpha-Amylase-Varianten für die Stärkeverflüssigung verwendet werden, wird es nicht erforderlich sein, das Enzym vor Beginn der Verzuckerung zu inaktivieren.

BEISPIEL 4 (Referenzbeispiel)

Verflüssigung und Verzuckerung von LE429-Varianten

[0177] Das Experiment von Beispiel 3 wurde mit einer Anzahl von anderen LE429-Varianten unter den gleichen Bedingungen wiederholt.

[0178] Das Ergebnis ist unten dargestellt:

| Variante/Zuckerprofil | DP1 | DP2 | DP3 | DP4 |
|-----------------------|--------|--------|--------|--------|
| T49V + G107A | 95,9 % | 1,72 % | 1,27 % | 1,11 % |
| T49Y + G107A | 95,3 % | 1,73 % | 1,29 % | 1,65 % |
| T49N + G107A | 95,7 % | 1,64 % | 1,51 % | 1,18 % |
| T49L+A52S+G107A | 95,7 % | 1,73 % | 0,95 % | 1,67 % |
| T49L+A52T+G107A | 95,8 % | 1,66 % | 1,03 % | 1,48 % |
| T49L+A52F+G107A | 95,7 % | 1,69 % | 1,16 % | 1,42 % |
| T49L+A52L+G107A | 95,5 % | 1,70 % | 1,40 % | 1,38 % |
| T49L+A52I+G107A | 95,9 % | 1,72 % | 1,31 % | 1,07 % |
| T49L+A52V+G107A | 94,7 % | 1,69 % | 1,16 % | 2,44 % |
| T49L+A52V+G107A+A111V | 94,5 % | 1,75 % | 0,72 % | 2,99 % |
| LE429 | 94,9 % | 1,71 % | 1,85 % | 1,51 % |

BEISPIEL 5 (Referenzbeispiel)

[0179] Das Experiment von Beispiel 3 wurde mit einer Anzahl von LE429-Varianten wiederholt mit der Ausnahme, dass die Verflüssigung bei 95 °C, pH 6,0 und die Verzuckerung bei 60 °C, pH 4,5 40 ppm CaCl₂ durchgeführt wurde, gefolgt von der Inaktivierung. Die nachfolgend angegebenen Varianten sind LE429-Varianten. Die Ergebnisse sind wie folgt:

| Variante/Zuckerprofil | DP4+ | DP3 | DP2 | DP1 |
|-----------------------|------|------|------|-------|
| T49F | 1,15 | 0,92 | 1,83 | 96,12 |
| T49D+G107A | 0,84 | 1,03 | 1,82 | 96,3 |
| T49I+G107A | 0,97 | 0,64 | 1,84 | 96,55 |
| T49L+G107A | 0,96 | 0,81 | 1,82 | 96,42 |
| T49L+A52S+G107A | 1,37 | 0,75 | 1,88 | 96,01 |
| T49L+A52T+G107A | 0,87 | 0,81 | 1,8 | 96,52 |
| T49L+A52F+G107A | 0,98 | 0,83 | 1,87 | 96,31 |
| T49V+G107A | 0,65 | 0,8 | 2,13 | 96,43 |
| T49Y+G107A | 0,83 | 0,94 | 1,89 | 96,35 |
| LE429 | 1,16 | 1,21 | 1,77 | 95,87 |

Zitierte Veröffentlichungen

Klein, C., et al., Biochemistry 1992, 31, 8740-8746,

Mizuno, H., et al., J. Mol. Biol. (1993) 234, 12821283,

Chang, C., et al., J. Mol. Biol. (1993) 229, 235-238,

Larson, S.B., J. Mol. Biol. (1994) 235, 1560-1584,

Lawson, C.L., J. Mol. Biol. (1994) 236, 590-600,

Qian, M., et al., J. Mol. Biol. (1993) 231, 785-799,

Brady, R.L., et al., Acta crystallogr. Sect. B, 47, 527-535,

Swift, H.J., et al., Acta Crystallogr. Sect B, 47, 535-544

A. Kadziola, Dissertation: "An alpha-amylase from Barley and its Complex with a Substrate Analogue Inhibitor Studied by X-ray Crystallography", Department of Chemistry University of Copenhagen 1993

MacGregor, E.A., Food Hydrocolloids, 1987, Bd.1, Nr. 5-6, p.

B. Diderichsen und L. Christiansen, Cloning of a maltogenic amylase from *Bacillus stearothermophilus*, FEMS

Microbiol. letters: 56: Seiten 53-60 (1988)

Hudson et al., Practical Immunology, 3. Auflage (1989), Blackwell Scientific Publications,

Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2. Auflage., Cold Spring harbour, 1989

S.L. Beaucage und M.H. Caruthers, Tetrahedron Letters, 22, 1981, Seiten 1859-1869

Mattbes et al., The EMBO J. 3, 1984, Seiten 801-805.

R.K. Saiki et al., Science 239, 1988, Seiten 487-491.

Morinaga et al., (1984, Biotechnology 2:646-639).

Nelson und Long, Analytical Biochemistry 1989, Seiten 147-151

Hunkapiller et al., 1984, Nature 310:105-111

R. Higuchi, B. Krummel, und R.K. Saiki (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. Nucl. Acids Res. 16:7351-7367.

Dubnau et al., 1971, J. Mol. Biol. 56, Seiten 209-221.

Gryczan et al., 1978, J. Bacteriol. 134, Seiten 318-329.

S.D. Erlich, 1977, Proc. Natl. Acad. Sei. 74, Seiten 1680-1682.

Boel et al., 1990, Biochemistry 29, Seiten 6244-6249.

Sarkar und Sommer, 1990, BioTechniques 8, Seiten 404-407

Sequenzprotokoll

<110> Novo Nordisk A/S

<120>

<130>

<160> 40

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1443

<212> DNA

<213> Bacillus amyloliquefaciens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1443)

<400> 1

| | |
|---|----|
| gta aat ggc acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tat acg ccg aac gac | 48 |
| Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp | |
| 1 5 10 15 | |

| | |
|---|----|
| ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat gcg gaa cat tta tcg gat | 96 |
| Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp | |
| 20 25 30 | |

| | |
|---|-----|
| atc ggt att act gcc gtc tgg att ccc ccg gca tat aag gga acg agc | 144 |
| Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Thr Ser | |
| 35 40 45 | |

| | |
|---|-----|
| caa gcg gat gtg ggc tac ggt gct tac gac ctt tat gat tta ggg gag | 192 |
| Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu | |
| 50 55 60 | |

| | |
|---|-----|
| ttt cat caa aaa ggg acg gtt cgg aca aag tac ggc aca aaa gga gag | 240 |
| Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gly Glu | |
| 65 70 75 80 | |

| | |
|---|-----|
| ctg caa tct gcg atc aaa agt ctt cat tcc cgc gac att aac gtt tac | 288 |
| Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn Val Tyr | |
| 85 90 95 | |

| | |
|---|-----|
| ggg gat gtg gtc atc aac cac aaa ggc ggc gct gat gcg acc gaa gat | 336 |
| Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp | |
| 100 105 110 | |

| | |
|---|-----|
| gta acc gcg gtt gaa gtc gat ccc gct gac cgc aac ccg gta att tca | 384 |
| Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val Ile Ser | |
| 115 120 125 | |

| | |
|---|-----|
| gga gaa cac cta att aaa gcc tgg aca cat ttt cat ttt ccg ggg cgc | 432 |
| Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro Gly Arg | |
| 130 135 140 | |

| | |
|---|-----|
| ggc agc aca tac agc gat ttt aag tgg tat tgg tac cat ttt gac gga | 480 |
| Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Tyr Trp Tyr His Phe Asp Gly | |
| 145 150 155 160 | |

| | |
|---|-----|
| acc gat tgg gac gag tcc cga aag ctg aac cgc atc tat aag ttt caa | 528 |
| Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys Phe Gln | |
| 165 170 175 | |

| | |
|---|------|
| ggg aag act tgg gat tgg gaa gtt tcc aat gaa ttc ggc aac tat gat Gly Lys Thr Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Phe Gly Asn Tyr Asp 180 185 190 | 576 |
| tat ttg atg tat gcc gac ttt gat tat gac cat cct gat gtc gta gca Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Phe Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Val Ala 195 200 205 | 624 |
| gag att aag aga tgg ggc act tgg tat gcc aat gaa ctg caa ttg gac Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln Leu Asp 210 215 220 | 672 |
| ggt ttc cgt ctt gat gct gtc aaa cac att aaa ttt tct ttt ttg cgg Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg 225 230 235 240 | 720 |
| gat tgg gtt aat cat gtc agg gaa aaa acg ggg aag gaa atg ttt acg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr 245 250 255 | 768 |
| gta gct gag tac tgg tcg aat gac ttg ggc gcg ctg gaa aac tat ttg Val Ala Glu Tyr Trp Ser Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu 260 265 270 | 816 |
| aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt cat tat Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr 275 280 285 | 864 |
| cag ttc cat gct gca tcg aca cag gga ggc ggc tat gat atg agg aaa Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys 290 295 300 | 912 |
| ttg ctg aac ggt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa tcg gtt aca Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser Val Thr 305 310 315 320 | 960 |
| ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tcg ctt gag tcg act Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr 325 330 335 | 1008 |
| gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct ttt att ctc aca agg Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg 340 345 350 | 1056 |
| gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg acg aaa Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys 355 360 365 | 1104 |
| gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att gaa ccg Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro 370 375 380 | 1152 |
| atc tta aas gcg aca aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat gat tat Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr 385 390 395 400 | 1200 |
| ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac agc tcg Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser 405 410 415 | 1248 |
| gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc ggt ggg Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly 420 425 430 | 1296 |
| gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca tgg cat Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His 435 440 445 | 1344 |

| | |
|---|------|
| gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc aat tcg gaa ggc | 1392 |
| Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly | |
| 450 455 460 | |
| tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca att tat gtt caa | 1440 |
| Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln | |
| 465 470 475 480 | |
| aga | 1443 |
| Arg | |
| <210> 2 | |
| <211> 481 | |
| <212> PRT | |
| <213> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> | |
| <400> 2 | |
| Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp | |
| 1 5 10 15 | |
| Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp | |
| 20 25 30 | |
| Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Thr Ser | |
| 35 40 45 | |
| Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu | |
| 50 55 60 | |
| Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gly Glu | |
| 65 70 75 80 | |
| Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn Val Tyr | |
| 85 90 95 | |
| Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp | |
| 100 105 110 | |
| Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val Ile Ser | |
| 115 120 125 | |
| Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro Gly Arg | |
| 130 135 140 | |
| Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Tyr Trp Tyr His Phe Asp Gly | |
| 145 150 155 160 | |
| Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys Phe Gln | |
| 165 170 175 | |
| Gly Lys Thr Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Phe Gly Asn Tyr Asp | |
| 180 185 190 | |
| Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Phe Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Val Ala | |
| 195 200 205 | |
| Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln Leu Asp | |
| 210 215 220 | |
| Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg | |
| 225 230 235 240 | |
| Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr | |
| 245 250 255 | |

Val Ala Glu Tyr Trp Ser Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu
 260 265 270
 Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr
 275 280 285
 Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys
 290 295 300
 Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser Val Thr
 305 310 315 320
 Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr
 325 330 335
 Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg
 340 345 350
 Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys
 355 360 365
 Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro
 370 375 380
 Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr
 385 390 395 400
 Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser
 405 410 415
 Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly
 420 425 430
 Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His
 435 440 445
 Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly
 450 455 460
 Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln
 465 470 475 480
 Arg

<210> 3
 <211> 1920
 <212> DNA
 <213> *Bacillus licheniformis*

<220>
 <221> CDS
 <222> (421)..(1872)

<400> 3
 cggaaaggattg gaagtacaaa aataagcaaa agattgtcaa tcatgtcatg agccatgcgg 60
 gagacggaaa aatcgcttta atgcacgata tttatgcaac gttcgcagat gctgctgaag 120
 agattattaa aaagctgaaa gcaaaaggct atcaatttgtt aactgtatct cagcttgaag 180
 aagtgaagaa gcagagaggc tattgaataa atgagtagaa ggcgcataatc ggccgttttc 240
 ttttggaga aatatataggg aaaatggtac ttgttaaaaa ttccgaaatat ttataacaaca 300

tcatatgtt cacattgaaa ggggaggaga atcatgaaac aacaaaaacg gctttacgcc 360
 cgattgctga cgcgttatt tgccgtcatac ttcttgctgc ctcaatttcgc agcagcggcg 420
 gca aat ctt aat ggg acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tac atg ccc 468
 Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
 1 5 10 15
 aat gac ggc caa cat tgg agg cgt ttg caa aac gac tcg gca tat ttg 516
 Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu
 20 25 30
 gct gaa cac ggt att act gcc gtc tgg att ccc ccg gca tat aag gga 564
 Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
 35 40 45
 acg agc caa gcg gat gtg ggc tac ggt gct tac gac ctt tat gat tta 612
 Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
 50 55 60
 ggg gag ttt cat caa aaa ggg acg gtt cgg aca aag tac ggc aca aaa 660
 Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
 65 70 75 80
 gga gag ctg caa tct gcg atc aaa agt ctt cat tcc cgc gac att aac 708
 Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn
 85 90 95
 gtt tac ggg gat gtg gtc atc aac cac aaa ggc ggc gct gat gcg acc 756
 Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr
 100 105 110
 gaa gat gta acc gcg gtt gaa gtc gat ccc gct gac cgc aac cgc gta 804
 Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val
 115 120 125
 att tca gga gaa cac cta att aaa gcc tgg aca cat ttt cat ttt ccg 852
 Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro
 130 135 140
 ggg cgc ggc agc aca tac agc gat ttt aaa tgg cat tgg tac cat ttt 900
 Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe
 145 150 155 160
 gac gga acc gat tgg gac gag tcc cga aag ctg aac cgc atc tat aag 948
 Asp Gly Thr Asp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys
 165 170 175
 ttt caa gga aag gct tgg gat tgg gaa gtt tcc aat gaa aac ggc aac 996
 Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn
 180 185 190
 tat gat tat ttg atg tat gcc gac atc gat tat gac cat cct gat gtc 1044
 Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
 195 200 205
 gca gca gaa att aag aga tgg ggc act tgg tat gcc aat gaa ctg caa 1092
 Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln
 210 215 220
 ttg gac ggt ttc cgt ctt gat gct gtc aaa cac att aaa ttt tct ttt 1140
 Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
 225 230 235 240
 ttg cgg gat tgg gtt aat cat gtc agg gaa aac acg ggg aag gaa atg 1188
 Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met
 245 250 255

| | |
|---|------|
| ttt acg gta gct gaa tat tgg cag aat gac ttg ggc gcg ctg gaa aac Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn 260 265 270 | 1236 |
| tat ttg aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu 275 280 285 | 1284 |
| cat tat cag ttc cat gct gca tcg aca cag gga ggc ggc tat gat atg His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Tyr Asp Met 290 295 300 | 1332 |
| agg aaa ttg ctg aac ggt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa tcg Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser 305 310 315 320 | 1380 |
| gtt aca ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tcg ctt gag Val Thr Phe Val Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu 325 330 335 | 1428 |
| tcg act gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct ttt att ctc Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu 340 345 350 | 1476 |
| aca agg gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly 355 360 365 | 1524 |
| acg aaa gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile 370 375 380 | 1572 |
| gaa ccg atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His 385 390 395 400 | 1620 |
| gat tat ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp 405 410 415 | 1668 |
| agc tcg gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro 420 425 430 | 1716 |
| ggt ggg gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr 435 440 445 | 1764 |
| tgg cat gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc aat tcg Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser 450 455 460 | 1812 |
| gaa ggc tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca att tat Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr 465 470 475 480 | 1860 |
| gtt caa aga tag aagagcagag aggacggatt tcctgaagga aatccgtttt Val Gln Arg | 1912 |
| tttatTTT | 1920 |

<210> 4
<211> 483
<212> PRT
<213> Bacillus licheniformis

<400> 4
 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 Arg 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

<210> 5
 <211> 2604
 <212> DNA
 <213> *Bacillus amyloliquefaciens*

 <220>
 <221> -10 Signal
 <222> (707)..(712)

 <220>
 <221> -35 Signal
 <222> (729)..(734)

 <220>
 <221> Ribosomenbindungsstelle
 <222> (759)..(762)

 <220>
 <221> Signalpeptid
 <222> (770)..(862)

 <220>
 <221> Reifes Peptid
 <222> (863)..(2314)

 <220>
 <221> Terminator
 <222> (2321)..(2376)

 <220>
 <221> CDS
 <222> (863)..(2314)

 <400> 5
 aagtttcagg cggtaatcg gaatgtgcat ctgcgttcat acttaggttt tcacccgcat 60
 attaagcagg cgtttttggaa ccgtgtgaca gaagctgttc gaaaccccggttt 120

DE 600 34 558 T2 2007.12.27

| | |
|---|------|
| cgc atc ttt aag ttt cgt ggg gaa gga aaa gcg tgg gat tgg gaa gta Arg Ile Phe Lys Phe Arg Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val 175 180 185 | 1420 |
| tca agt gaa aac ggc aac tat gac tat tta atg tat gct gat gtt gac Ser Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp 190 195 200 | 1468 |
| tac gac cac cct gat gtc gtg gca gag aca aaa aaa tgg ggt atc tgg Tyr Asp His Pro Asp Val Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp 205 210 215 | 1516 |
| tat gcg aat gaa ctg tca tta gac ggc ttc cgt att gat gcc gcc aaa Tyr Ala Asn Glu Leu Ser Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys 220 225 230 | 1564 |
| cat att aaa ttt tca ttt ctg cgt gat tgg gtt cag gcg gtc aga cag His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln 235 240 245 250 | 1612 |
| gcg acg gga aaa gaa atg ttt acg gtt gcg gag tat tgg cag aat aat Ala Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn 255 260 265 | 1660 |
| gcc ggg aaa ctc gaa aac tac ttg aat aaa aca agc ttt aat caa tcc Ala Gly Lys Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser 270 275 280 | 1708 |
| gtg ttt gat gtt ccg ctt cat ttc aat tta cag gcg gct tcc tca caa Val Phe Asp Val Pro Leu His Phe Asn Leu Gln Ala Ser Ser Gln 285 290 295 | 1756 |
| gga ggc gga tat gat atg agg cgt ttg ctg gac ggt acc gtt gtg tcc Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser 300 305 310 | 1804 |
| agg cat ccg gaa aag gcg gtt aca ttt gtt gaa aat cat gac aca cag Arg His Pro Glu Lys Ala Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln 315 320 325 330 | 1852 |
| ccg gga cag tca ttg gaa tcg aca gtc caa act tgg ttt aaa ccg ctt Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu 335 340 345 | 1900 |
| gca tac gcc ttt att ttg aca aga gaa tcc ggt tat cct cag gtg ttc Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe 350 355 360 | 1948 |
| tat ggg gat atg tac ggg aca aaa ggg aca tcg cca aag gaa att ccc Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro 365 370 375 | 1996 |
| tca ctg aaa gat aat ata gag ccg att tta aaa gcg cgt aag gag tac Ser Leu Lys Asp Asn Ile Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr 380 385 390 | 2044 |
| gca tac ggg ccc cag cac gat tat att gac cac ccg gat gtg atc gga Ala Tyr Gly Pro Gln His Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly 395 400 405 410 | 2092 |
| tgg acg agg gaa ggt gac agc tcc gcc gca aaa tca ggt ttg gcc gct Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala 415 420 425 | 2140 |
| tta atc acg gac gga ccc ggc gga tca aag cgg atg tat gcc ggc ctg Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu | 2188 |

430

435

440

aaa aat gcc ggc gag aca tgg tat gac ata acg ggc aac cgt tca gat 2236
 Lys Asn Ala Gly Glu Thr Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp
 445 450 455

act gta aaa atc gga tct gac ggc tgg gga gag ttt cat gta aac gat 2284
 Thr Val Lys Ile Gly Ser Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp
 460 465 470

ggg tcc gtc tcc att tat gtt cag aaa taa ggtaataaaaa aaacacacctcc 2334
 Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln Lys
 475 480

aagctgagtg cgggtatcg ctggagggtg cgtttatttt ttccagccgt a tgacaaggta 2394
 ggcacatcggt gtgacaaaata cggatcgctg gctgtcatag gtgacaaaatc cgggttttgc 2454
 gccgtttggc tttttcacat gtctgatttt tgtataatca acaggcacgg agccgaaatc 2514
 tttcgcccttg gaaaaataag cggcgatcg agctgcttcc aatatggatt gttcatcggg 2574
 atcgctgctt ttaatcacaa cgtgggatcc 2604

<210> 6

<211> 483

<212> PRT

<213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 6

Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
 1 5 10 15

Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
 20 25 30

Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser
 35 40 45

Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
 50 55 60

Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ser Glu
 65 70 75 80

Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln Val Tyr
 85 90 95

Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp
 100 105 110

Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn Arg Asn Gln Glu Thr Ser
 115 120 125

Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp Phe Arg Phe Pro Gly Arg
 130 135 140

Gly Asn Thx Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly
 145 150 155 160

Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg Ile Phe Lys Phe Arg
 165 170 175

Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Ser Glu Asn Gly Asn
 180 185 190

Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
 195 200 205
 Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Ser
 210 215 220
 Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
 225 230 235 240
 Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met
 245 250 255
 Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn Ala Gly Lys Leu Glu Asn
 260 265 270
 Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
 275 280 285
 His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
 290 295 300
 Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser Arg His Pro Glu Lys Ala
 305 310 315 320
 Val Thr Phe Val Glu 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 Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp Asn Ile
 370 375 380
 Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro Gln His
 385 390 395 400
 Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
 405 410 415
 Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
 420 425 430
 Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys Asn Ala Gly Glu Thr
 435 440 445
 Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Lys Ile Gly Ser
 450 455 460
 Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp Gly Ser Val Ser Ile Tyr
 465 470 475 480
 Val Gln Lys

<210> 7
 <211> 1548
 <212> DNA
 <213> *Bacillus stearothermophilus*

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1548)

<400> 7
 gcc gca ccg ttt aac ggc acc atg atg cag tat ttt gaa tgg tac ttg Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu 48
 1 5 10 15

ccg gat gat ggc acg tta tgg acc aaa gtg gcc aat gaa gcc aac aac Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn 96
 20 25 30

tta tcc agc ctt ggc atc acc gct ctt tgg ctg ccc gct tac aaa Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys 144
 35 40 45

gga aca agc cgc agc gac gta ggg tac gga gta tac gac ttg tat gac Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp 192
 50 55 60

ctc ggc gaa ttc aat caa aaa ggg acc gtc cgc aca aaa tac gga aca Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr 240
 65 70 75 80

aaa gct caa tat ctt caa gcc att caa gcc ccc cac gcc gct gga atg Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met 288
 85 90 95

caa gtg tac gcc gat gtc gtg ttc gac cat aaa ggc ggc gct gac ggc Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly 336
 100 105 110

acg gaa tgg gtg gac gcc gtc gaa gtc aat ccg tcc gac cgc aac caa Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln 384
 115 120 125

gaa atc tcg ggc acc tat caa atc caa gca tgg acg aaa ttt gat ttt Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe 432
 130 135 140

ccc ggg cgg ggc aac acc tac tcc agc ttt aag tgg cgc tgg tac cat Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His 480
 145 150 155 160

ttt gac ggc gtt gat tgg gac gaa agc cga aaa ttg agc cgc att tac Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr 528
 165 170 175

aaa ttc cgc ggc atc ggc aaa gcg tgg gat tgg gaa gta gac acg gaa Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu 576
 180 185 190

aac gga aac tat gac tac tta atg tat gcc gac ctt gat atg gat cat Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His 624
 195 200 205

ccc gaa gtc gtg acc gag ctg aaa aac tgg ggg aaa tgg tat gtc aac Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn 672
 210 215 220

aca acg aac att gat ggg ttc cgg ctt gat gcc gtc aag cat att aag Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys 720
 225 230 235 240

ttc agt ttt ttt cct gat tgg ttg tcg tat gtg cgt tct cag act ggc Phe Ser Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly 768
 245 250 255

aag ccg cta ttt acc gtc ggg gaa tat tgg agc tat gac atc aac aag Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys 816

| 260 | 265 | 270 | |
|--|-----|-----|------|
| ttg cac aat tac att acg aaa aca gac gga acg atg tct ttg ttt gat Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp | 275 | 280 | 864 |
| | | 285 | |
| gcc ccg tta cac aac aaa ttt tat acc gct tcc aaa tca ggg ggc gca Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala | 290 | 295 | 912 |
| | | 300 | |
| ttt gat atg cgç acg tta atg acc aat act ctc atg aaa gat caa ccg Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro | 305 | 310 | 960 |
| | | 315 | |
| | | 320 | |
| aca ttg gcc gtc acc ttc gtt gat aat cat gac acc gaa ccc ggc caa Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln | 325 | 330 | 1008 |
| | | 335 | |
| gcg ctg cag tca tgg gtc gac cca tgg ttc aaa ccg ttg gct tac gec Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala | 340 | 345 | 1056 |
| | | 350 | |
| ttt att cta act cgg cag gaa gga tac cgg tgc gtc ttt tat ggt gac Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp | 355 | 360 | 1104 |
| | | 365 | |
| tat tat ggc att cca caa tat aac att cct tcg ctg aaa agc aaa atc Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile | 370 | 375 | 1152 |
| | | 380 | |
| gat ccg ctc ctc atc gcg cgc agg gat tat gct tac gga acg caa cat Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His | 385 | 390 | 1200 |
| | | 395 | |
| | | 400 | |
| gat tat ctt gat cac tcc gac atc atc ggg tgg aca agg gaa ggg ggc Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Gly | 405 | 410 | 1248 |
| | | 415 | |
| act gaa aaa cca gga tcc gga ctg gcc gca ctg atc acc gat ggg ccg Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro | 420 | 425 | 1296 |
| | | 430 | |
| gga gga agc aaa tgg atg tac gtt ggc aaa caa cac gct gga aaa gtg Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val | 435 | 440 | 1344 |
| | | 445 | |
| ttc tat gac ctt acc ggc aac cgg agt gac acc gtc acc atc aac agt Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser | 450 | 455 | 1392 |
| | | 460 | |
| gat gga tgg ggg gaa ttc aaa gtc aat ggc ggt tcg gtt tcg gtt tgg Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp | 465 | 470 | 1440 |
| | | 475 | |
| | | 480 | |
| gtt cct aga aaa acg acc gtt tct acc atc gct cgg ccg atc aca acc Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr | 485 | 490 | 1486 |
| | | 495 | |
| cga ccg tgg act ggt gaa ttc gtc cgt tgg acc gaa cca ccg ttg gtg Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val | 500 | 505 | 1536 |
| | | 510 | |
| gca tgg cct tga Ala Trp Pro 515- | | | 1548 |

<210> 8
<211> 515
<212> PRT
<213> *Bacillus stearothermophilus*

<400> 8
Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu
1 5 10 15
Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn
20 25 30
Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys
35 40 45
Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp
50 55 60
Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr
65 70 75 80
Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met
85 90 95
Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly
100 105 110
Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln
115 120 125
Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe
130 135 140
Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His
145 150 155 160
Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr
165 170 175
Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu
180 185 190
Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His
195 200 205
Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn
210 215 220
Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys
225 230 235 240
Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly
245 250 255
Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys
260 265 270
Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp
275 280 285
Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala
290 295 300
Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro
305 310 315 320
Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln

325

330

335

Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala
 340 345 350

Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp
 355 360 365

Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile
 370 375 380

Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His
 385 390 395 400

Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly
 405 410 415

Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
 420 425 430

Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val
 435 440 445

Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser
 450 455 460

Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp
 465 470 475 480

Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr
 485 490 495

Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val
 500 505 510

Ala Trp Pro
 515

<210> 9
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 9
 ggtcgttaggc accgttagccc caatcccgctt g 31

<210> 10
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 10
 ggtcgttaggc accgttagccc caatcccgatt ggctcg 36

<210> 11
 <211> 28

<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 11
ctgtgactgg ttagtactca accaaagtc 28

<210> 12
<211> 31
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 12
ggtcgttaggc accgttagccc tcatccgctt g 31

<210> 13
<211> 31
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 13
ggtcgttaggc accgttagccc atatccgctt g 31

<210> 14
<211> 31
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 14
ggtcgttaggc accgttagcca atatccgctt g 31

<210> 15
<211> 36
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 15
gcagcatgga actgctyatg aagaggcacg tcaaac 36

<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 16

| | |
|--|----|
| catagttgcc gaattcattg gaaacttccc | 30 |
| | |
| <210> 17 | |
| <211> 34 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| | |
| <220> | |
| <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer | |
| | |
| <400> 17 | |
| catagttgcc gaattcaggg gaaacttccc aatc | 34 |
| | |
| <210> 18 | |
| <211> 41 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| | |
| <220> | |
| <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer | |
| | |
| <400> 18 | |
| ccgcgcggcg ggaaatcaa ttttgtccag gctttatcta g | 41 |
| | |
| <210> 19 | |
| <211> 32 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| | |
| <220> | |
| <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer | |
| | |
| <400> 19 | |
| caaataggta ccaatccac ttaaaatcgc tg | 32 |
| | |
| <210> 20 | |
| <211> 29 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| | |
| <220> | |
| <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer | |
| | |
| <400> 20 | |
| tttcccaatc ccaagtcttc ccttgaaac | 29 |
| | |
| <210> 21 | |
| <211> 36 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |
| | |
| <220> | |
| <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer | |
| | |
| <400> .. | |
| cttaatttct gctacgacgt caggatggtc ataatc | 36 |
| | |
| <210> 22 | |
| <211> 38 | |
| <212> DNA | |
| <213> Künstliche Sequenz | |

<220> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
 <223>

<400> 22
 cggccaaatgc attcgaccag tactcagta ccgtaaac 38

<210> 23
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 23
 ggcgtttca ttgtcgactt cccaatccc 29

<210> 24
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 24
 ggaatttcgc gctgactagt cccgtacata tcccc 35

<210> 25
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 25
 ggcaggaaatt tcgacacatt tcgtcccgta catatc 36

<210> 26
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 26
 cctcattctg cagcaggcgc cgtaaatggc acgctg 36

<210> 27
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 27
 ccagacggca gtaataccga tatccgataa atgttccg 38

```

<210> 28
<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer
<223>

<400> 28
cggatatacg tattactgcc gtctggatc                                30

<210> 29
<211> 21
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 29
ctcggtcccaa tcggttccgt c                                21

<210> 30
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 30
gatgtatgcc gacttgcatt atgacc                                26

<210> 31
<211> 30
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 31
catagttgcc gaattcattt gaaaacttccc                                30

<210> 32
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 32
ccgatttgctg acgctgttat ttgc                                24

<210> 33
<211> 25
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>

```

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 33

gcacaagcgga taacggctac ggtgc

25

<210> 34

<211> 28

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 34

gaacgagcca atcggacgtg ggctacgg

28

<210> 35

<211> 32

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 35

ggaacgagcc aatcgataaa cggctacgg gc

32

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 36

gcatataagg gactgagcca agcgg

25

<210> 37

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 37

caaccacaaa gccggcgctg atgcg

25

<210> 38

<211> 41

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

<400> 38

gcatataagg gactgagcca atcggataac ggctacggtg c

41

<210> 39

<211> 28
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

 <400> 39
 gaacgagccg atcggacgtg ggctacgg

28

<210> 40
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

 <220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Primer

 <400> 40
 gaacgagcca aaacgacgtg ggctacgg

28

Patentansprüche

1. Alpha-Amylase

- i) mit der hierin in SEQ ID Nr. 4 oder 8 gezeigten Aminosäuresequenz oder
- ii) mit der in [Fig. 1](#) oder [Fig. 2](#) gezeigten Aminosäuresequenz oder
- iii) mit der in [Fig. 3](#) gezeigten Aminosäuresequenz oder
- iv) eine alpha-Amylase, die mindestens 90% Homologie mit den alpha-Amylasen von i), ii) oder iii) zeigt, wobei die alpha-Amylase die Änderung G107A umfasst und wobei Position 107 der Position 107 der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr. 4 entspricht.

2. Alpha-Amylase nach Anspruch 1, umfassend eine Mutation in einer Position entsprechend einer der folgenden Mutationen in der in SEQ ID Nr. 4 gezeigten Aminosäuresequenz:

T49L + G107A, A52S + V54N + T49L + G107A; oder T49F + G107A, T49V + G107A,
 T49D + G107A, T49Y + G107A, T49S + G107A, T49N + G107A, T49I + G107A,
 T49L + A52S + G107A, T49L + A52T + G107A, T49L + A52F + G107A,
 T49L + A52L + G107A, T49L + A52I + G107A, T49L + A52V + G107A.

3. DNA-Konstrukt umfassend eine DNA-Sequenz, die eine alpha-Amylase nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 kodiert.

4. Rekombinater Expressionsvektor, der ein DNA-Konstrukt nach Anspruch 3 trägt.

5. Zelle, die mit einem DNA-Konstrukt nach Anspruch 3 oder einem Vektor nach Anspruch 4 transformiert wird.

6. Zelle nach Anspruch 5, die ein Mikroorganismus ist, insbesondere ein Bakterium oder ein Pilz, wie ein grampositives Bakterium, wie *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lenthus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus laetus* oder *Bacillus thuringiensis*.

7. Zusammensetzung umfassend:

- (i) Gemisch der alpha-Amylase von *B. licheniformis* mit der in SEQ ID Nr. 4 gezeigten Sequenz mit einer oder mehreren alpha-Amylasen nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, die von der *B. stearothermophilus* alpha-Amylase mit der in SEQ ID Nr. 8 gezeigten Sequenz abgeleitet sind; oder
- (ii) Gemisch der alpha-Amylase von *B. stearothermophilus* mit der in SEQ ID Nr. 8 gezeigten Sequenz mit einer oder mehreren alpha-Amylasen nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, die von einer oder mehreren anderen alpha-Amylasen abgeleitet sind; oder
- (iii) Gemisch von einer oder mehreren alpha-Amylasen nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, die von der *B. stearothermophilus* alpha-Amylase mit der in SEQ ID Nr. 8 gezeigten Sequenz abgeleitet sind, mit einer oder mehreren alpha-Amylasen nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, die von einer oder mehreren anderen alpha-Amylasen abgeleitet sind.

8. Zusammensetzung umfassend:

Gemisch einer oder mehrerer alpha-Amylasen nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, die von der *B. stearothermophilus* alpha-Amylase abgeleitet sind, mit der in SEQ ID Nr. 8 gezeigten Sequenz und einer alpha-Amylase, abgeleitet von der *B. licheniformis* alpha-Amylase mit der in SEQ ID Nr. 4 gezeigten Sequenz.

9. Verwendung der alpha-Amylase nach Anspruch 1 oder Anspruch 2 oder einer Zusammensetzung nach einem beliebigen der Ansprüche 7 oder 8 zur Stärkeverflüssigung; in einer Detergentszusammensetzung, wie Waschmittel-, Spülmittel- und Hartflächen-Haushaltsreiniger-Zusammensetzungen; bei der Ethanolherstellung, wie Treibstoff, Getränke- und industrielle Ethanolherstellung; Entschlichen („desizing“) von Textilien, Textilstoffen oder Bekleidung.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig. 1
Sequence of amino acids:

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1 | 5 | 10 | 15 | | | | | | | | | | | | | |
| Leu | Pro | Asn | Asp | Gly | Asn | His | Trp | Asn | Arg | Leu | Arg | Asp | Asp | Ala | Ala | |
| 20 | 25 | 30 | | | | | | | | | | | | | | |
| Asn | Leu | Lys | Ser | Lys | Gly | Ile | Thr | Ala | Val | Trp | Ile | Pro | Pro | Ala | Trp | |
| 35 | 40 | 45 | | | | | | | | | | | | | | |
| Lys | Gly | Thr | Ser | Ser | Gln | Asn | Asp | Val | Gly | Tyr | Gly | Ala | Tyr | Asp | Leu | Tyr |
| 50 | 55 | 60 | | | | | | | | | | | | | | |
| Asp | Leu | Gly | Glu | Phe | Asn | Gln | Lys | Gly | Thr | Val | Arg | Thr | Lys | Tyr | Gly | |
| 65 | 70 | 75 | 80 | | | | | | | | | | | | | |

Fig. 1

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

Fig. 1 (Fortsetzung)

| 370 | 375 | 380 | |
|--|-----|-----|-----|
| Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Phe Ala Tyr Gly Thr 385 | 390 | 395 | 400 |
| Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu 405 | 410 | | 415 |
| Gly Asn Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp 420 | 425 | | 430 |
| Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Asn Lys Ala Gly 435 | 440 | | 445 |
| Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile 450 | 455 | | 460 |
| Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser 465 | 470 | 475 | 480 |
| Val Trp Val Lys Gln 485 | | | |

Fig. 1 (Fortsetzung)

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His
1 - - 5 10 15

Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ser
20 25 30

Asn Leu Arg Asn Arg Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Trp
35 40 45

Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
50 55 60

Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
65 70 75 80

Thr Arg Ser Gln Leu Glu Ser Ala Ile His Ala Leu Lys Asn Asn Gly
85 90 95

Fig. 2

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

Fig. 2 (Fortsetzung)

385 390 395 400
Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
405 410 415
Gly Asn Thr Thr His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp
420 425 430
Gly Pro Gly Gly Glu Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Asn Lys Ala Gly
435 440 445
Gln Val Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Lys Pro Gly Thr Val Thr Ile.
450 455 460
Asn Ala Asp Gly Trp Ala Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
465 470 475 480
Ile Trp Val Lys Arg
485

Fig. 2 (Fortsetzung)

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
 1 5 10 15

Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Asn Ser Asp Ala Ser
 20 25 30

Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
 35 40 45

Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
 50 55 60

Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
 65 70 75 80

Thr Arg Ser Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly
 85 90 95

Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
 100 105 110

Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn
 115 120 125

Gln Glu Val Thr Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Arg Phe Asp
 130 135 140

Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
 145 150 155 160

His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Arg Leu Asn Asn Arg
 165 170 175

Ile Tyr Lys Phe Arg Gly His Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp
 180 185 190

Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met
 195 200 205

Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr
 210 215 220

Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His
 225 230 235 240

Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala
 245 250 255

Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Ash Asp Leu
 260 265 270

Figur 3

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

Figur 3 (Fortsetzung)