



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 231 547** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **C 12 N 9/28**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 2001129163/13, 28.03.2000

(24) Дата начала действия патента:
28.03.2000ii.1-13

(30) Приоритет: 30.03.1999 DK PA 199900437

(43) Дата публикации заявки: 20.07.2003

(46) Дата публикации: 27.06.2004

(56) Ссылки: WO 9741213, 30.04.1997. US 5989169,
23.11.1999. WO 9418314, 18.08.1994.
MACGREGOR, J. PROTEIN CHEMISTRY, № 7,
1988, p.399-415.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную
фазу: 30.10.2001

(86) Заявка РСТ:
DK 00/00148 (28.03.2000)

(87) Публикация РСТ:
WO 00/60059 (12.10.2000)

(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Н.Г.Лебедевой

(72) Изобретатель: АНДЕРСЕН Карстен (DK),
ЙОРГЕНСЕН Кристель Теа
(DK), БИСГОР-ФРАНТСЕН Хенрик
(DK), СВЕНСЕН Аллан (DK), КЬЕРУЛЬФФ
Серен (DK)

(73) Патентообладатель:
НОВОЗИМС А/С (DK)

(74) Патентный поверенный:
Лебедева Наталья Георгиевна

(54) **ВАРИАНТЫ АЛЬФА-АМИЛАЗЫ**

(57)
Изобретение относится к биотехнологии.
Вариант исходной Термамил-подобной
альфа-амилазы содержит изменение в одном
или нескольких положениях исходной
альфа-амилазы. Такие изменения
представляют собой инсерции, делеции и
замены аминокислот в аминокислотной
последовательности. При этом указанный
вариант сохраняет альфа-амилазную

активность и проявляет измененные свойства,
такие как пониженная способность
расщепления субстрата вблизи точки
ветвления, улучшенная субстратная
специфичность. Данное изобретение
повышает эффективность использования
альфа-амилазы в моющих композициях, при
производстве этанола, для обработки тканей
или одежды. 12 з.п. ф-лы, 3 табл.



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 231 547** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **C 12 N 9/28**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2001129163/13, 28.03.2000

(24) Effective date for property rights:
28.03.2000 c1. 1-13

(30) Priority: 30.03.1999 DK PA 199900437

(43) Application published: 20.07.2003

(46) Date of publication: 27.06.2004

(85) Commencement of national phase: 30.10.2001

(86) PCT application:
DK 00/00148 (28.03.2000)

(87) PCT publication:
WO 00/60059 (12.10.2000)

(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, str.
3, OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. N.G.Lebedevoj

(72) Inventor: **ANDERSEN Karsten (DK),
JORGENSEN Kristel' Tea
(DK), BISGOR-FRANTSEN Khenrik
(DK), SVENSEN Allan (DK), K'ERUL'FF Seren
(DK)**

(73) Proprietor:
NOVOZIMS A/S (DK)

(74) Representative:
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) **ALPHA-AMYLASE VARIANTS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, biochemistry,
enzymology.

SUBSTANCE: variant of the parent
Termamil-like alpha-amylase comprises change
in one or some positions of the parent
alpha-amylase. Such changes represent
insertions, deletions and substitutions of
amino acids in amino acid sequence of this
enzyme. Indicated variant retains activity

of alpha-amylase and elicits alternated
properties such as reduced capacity for
substrate cleavage near the branching point
and improved substrate specificity.
Invention enhances effectiveness in using
alpha-amylase in detergent compositions, in
manufacturing ethanol, for treatment of
fabrics or dressings.

EFFECT: valuable properties of enzyme.
13 cl, 5 ex

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится, *inter alia*, к новым вариантам исходных Термамил-подобных альфа-амилаз, в особенности к вариантам, проявляющим измененный характер расщепления (относительно исходной альфа-амилазы), которые являются выгодными в отношении применений этих вариантов, в частности в промышленной переработке крахмала (например, разжижении или осахаривании крахмала).

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Альфа-амилазы

(альфа-1,4-глюкан-4-глюканогидролазы, ЕС 3.2.1.1) составляют группу ферментов, которые катализируют гидролиз крахмала и других неразветвленных или разветвленных 1,4-глюкозидных олиго- и полисахаридов.

Имеется большая масса патентной и научной литературы, относящейся к этому очень важному в промышленном отношении классу ферментов. Ряд альфа-амилаз, таких как варианты Термамил-подобных альфа-амилаз, известны, например, из WO 90/11352, WO 95/10603, WO 95/26397, WO 96/23873, WO 96/23874 и WO 97/41213.

Среди недавних описаний, относящихся к альфа-амилазам, в WO 96/23874 приведены данные по трехмерной, рентгеновской кристаллографии для Термамил-подобной альфа-амилазы, называемой BA2, которая состоит из 300 N-концевых аминокислотных остатков альфа-амилазы *B. amyloliquefaciens*, содержащей аминокислотную последовательность, показанную здесь в SEQ ID NO:6, и C-концевых аминокислот 301-483 альфа-амилазы *B. licheniformis*, содержащей аминокислотную последовательность, показанную здесь в SEQ ID NO:4 (последняя доступна коммерчески под товарным названием Термамил™), и которая, следовательно, является близкородственной промышленно важным альфа-амилазам *Bacillus* (которые в данном контексте охватываются понятием "Термамил-подобные альфа-амилазы" и которые включают в себя, *inter alia*, альфа-амилазы *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* и *B. stearothermophilus*). В WO 96/23874 описана, кроме того, методология для конструирования на основе анализа структуры исходной Термамил-подобной альфа-амилазы вариантов исходной Термамил-подобной альфа-амилазы, которые проявляют измененные свойства относительно исходного фермента.

В WO 96/23874 и WO 97/41213 (Novo Nordisk) описаны варианты Термамил-подобной альфа-амилазы с измененным характером расщепления, содержащие мутации в аминокислотных остатках V54, D53, Y56, Q333, G57 и A52 последовательности, показанной здесь в SEQ ID NO:4.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Данное изобретение относится к новым альфа-амилолитическим вариантам (мутантам) Термамил-подобной альфа-амилазы, в частности вариантам, проявляющим измененный характер расщепления (относительно исходного фермента), которые являются выгодными в связи с технологией производства крахмала (разжижения крахмала, осахаривания

крахмала и т.п.).

Авторы изобретения неожиданно обнаружили варианты с измененными свойствами, в частности измененным характером расщепления, которые имеют пониженную способность расщепления субстрата вблизи точки ветвления и, кроме того, имеют повышенную субстратную специфичность и/или повышенную удельную активность, в сравнении с описанными в WO 96/23874 вариантами Термамил-подобной альфа-амилазы с измененным характером расщепления, содержащими мутации в аминокислотных остатках V54, D53, Y56, Q333, G57 и A52 последовательности, показанной здесь в SEQ ID NO:4.

Далее, данное изобретение относится к конструкциям ДНК, кодирующим варианты данного изобретения, композициям, содержащим варианты данного изобретения, способам получения вариантов данного изобретения и применению вариантов и композиций данного изобретения, отдельно или в комбинации с другими альфа-амилолитическими ферментами, в различных промышленных процессах, например в разжижении крахмала, и в детергентных композициях, таких как композиции для стирки белья, мытья посуды и чистки твердых поверхностей; в производстве этанола, например в производстве топливного, питьевого и промышленного этанола; в расщеплении текстильных изделий, тканей или одежды и т.д.

Номенклатура

В данном описании и формуле изобретения используются общепринятые однобуквенные и трехбуквенные коды для аминокислотных остатков. Для легкости ссылки варианты альфа-амилазы данного изобретения описаны с использованием следующей номенклатуры:

Исходная аминокислота (аминокислоты):положение (положения): замененная аминокислота (аминокислоты)

Согласно этой номенклатуре, например, замена аланина на аспарагин в положении 30 представляется как:

Ala30Asn или A30N

делеция аланина в том же самом положении представляется как:

Ala30* или A30*

и инсерция дополнительного аминокислотного остатка, такого как лизин, представляется как:

*30aLys или *30aK

Делеция последовательного отрезка аминокислотных остатков, таких как аминокислотные остатки 30-33, указывается как (30-33)* или Δ (A30-N33) или дельта(A30-N33).

Если конкретная альфа-амилаза содержит "делецию" в сравнении с другими альфа-амилазами и произведена инсерция в таком положении, это указывается как:

*36aAsp или *36aD

для инсерции аспарагиновой кислоты в положении 36.

Множественные мутации разделяются знаками плюс, т.е.:

Ala30Asp+Glu34Ser или A30N+E34S

что обозначает мутации в положениях 30 и 34, заменяющие аланин и глутаминовую кислоту на аспарагин и серин соответственно. Множественные мутации могут также

разделяться следующим образом, т.е. обозначая то же самое, что и знак плюс:

Ala30Asp/Glu34Ser или A30N/E34S

При встраивании одного или нескольких альтернативных аминокислотных остатков в конкретное положение это указывается как

A30N,E или

A30N или A30E

Кроме того, когда положение, пригодное для модификации, идентифицируется здесь без предложения какой-либо конкретной модификации, или A30X, следует понимать, что любой аминокислотный остаток может быть заместителем для аминокислотного остатка, присутствующего в этом положении. Так, например, при упоминании модификации аланина в положении 30, но без уточнения или указания в виде X, должно быть понятно, что этот аланин может быть делегирован или заменен любой другой аминокислотой, т.е. любой из R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ Термамил-подобная альфа-амилаза

Хорошо известно, что ряд альфа-амилаз, продуцируемых *Bacillus* spp., являются высокоомологичными на аминокислотном уровне. Например, было обнаружено, что альфа-амилаза *B. licheniformis*, содержащая аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:4 (коммерчески доступная как Термамил™), является гомологичной приблизительно на 89% альфа-амилазе *B. amyloliquefaciens*, содержащей аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:6, и гомологичной приблизительно на 79% альфа-амилазе *B. stearothermophilus*, содержащей аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:8. Дополнительные гомологичные альфа-амилазы включают в себя альфа-амилазу, полученную из штамма *Bacillus* sp. NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 или DSM 9375, все они описаны подробно в WO 95/26397, и альфа-амилазу № 707, описанную Tsukamoto et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 151 (1988), pp. 25-31.

Другие гомологичные альфа-амилазы включают в себя альфа-амилазу, продуцируемую штаммом *B. licheniformis*, описанным в EP 0252666 (ATCC 27811), и альфа-амилазы, идентифицированные в WO 91/00353 и WO 94/18314. Другими коммерческими Термамил-подобными альфа-амилазами *B. licheniformis* являются Optitherm™ и Takatherm™ (доступные из Solvay), Maxamyl™ (доступная из Gist-Brocades/Genencor), Spezym AA™ и Spezyme Delta AA™ (доступные из Genencor), и Keistase™ (доступная из Daiwa).

Вследствие существенной гомологии, обнаруженной между этими альфа-амилазами, считают, что они принадлежат к одному и тому же классу альфа-амилаз, а именно классу "Термамил-подобных альфа-амилаз".

Таким образом, в данном контексте, термин "Термамил-подобная альфа-амилаза" обозначает альфа-амилазу, которая на аминокислотном уровне проявляет существенную гомологию относительно Термамил™, т.е. альфа-амилазы *B. licheniformis*, имеющей аминокислотную

последовательность, показанную здесь в SEQ ID NO:4. Другими словами, Термамил-подобная альфа-амилаза представляет собой альфа-амилазу, которая имеет последовательность, показанную здесь в SEQ ID NO:2, 4, 6 или 8, и аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:1 или 2 WO 95/26397 или в Tsukamoto et al., 1988, или i) которая обнаруживает по меньшей мере 60%-ную, по меньшей мере 70%-ную, предпочтительно по меньшей мере 75%-ную, более предпочтительно по меньшей мере 80%-ную, более предпочтительно по меньшей мере 85%-ную, особенно предпочтительно по меньшей мере 90%-ную, еще более предпочтительно по меньшей мере 95%-ную гомологию, более предпочтительно по меньшей мере 97%-ную, более предпочтительно по меньшей мере 99%-ную гомологию по меньшей мере с одной из указанных аминокислотных последовательностей, и/или ii) проявляет иммунологическую перекрестную реактивность с антителом, индуцированным по меньшей мере против одной из указанных альфа-амилаз, и/или iii) кодируется последовательностью ДНК, которая гибридизуется с последовательностями ДНК, кодирующими указанные выше альфа-амилазы, которые представлены в SEQ ID NO:1, 3, 5 и 7 данной заявки и SEQ ID NO: 4 и 5 WO 95/26397 соответственно.

В связи со свойством i) "гомология" может быть определена с использованием любого общепринятого алгоритма, предпочтительно с использованием программы GAP из версии 7.3 пакета GCG (июнь 1993) с использованием величин штрафа за вставку по умолчанию, которые равны величинам штрафа за открытие вставки 3,0 и штрафа за удлинение вставки 0,1 (Genetic Computer Group (1991) Programme Manual for the GCG Package, version 7, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711).

Структурное сопоставление между альфа-амилазой Термамил и Термамил-подобной альфа-амилазой может быть использовано для идентификации эквивалентных/соответствующих положений в других Термамил-подобных альфа-амилазах. Одним из способов получения указанного структурного сопоставления является применение программы Pile up из пакета GCG с использованием величин штрафа за вставку по умолчанию, т.е. штрафа за открытие вставки 3,0 и штрафа за удлинение вставки 0,1. Другие способы структурного выравнивания включают в себя гидрофобный кластерный анализ (Gaboriaud et al., (1987, FEBS LETTERS 224, pp. 149-155) и обратный фолдинг (Huber, T; Torda, AE, PROTEIN SCIENCE Vol. 7, No. 1, pp. 142-149 (1998)). Свойство ii) альфа-амилазы, т.е. иммунологическая перекрестная реактивность, может анализироваться с использованием антитела, индуцированного по меньшей мере против одного эпитопа или реактивного по меньшей мере с одним эпитопом релевантной Термамил-подобной альфа-амилазы. Это антитело, которое может быть моноклональным или поликлональным, может быть получено способами, известными в данной области, например, как описано Hudson et al., *Practical Immunology*, Third edition (1989), Blackwell Scientific

Publications. Иммунологическая перекрестная реактивность может быть определена анализами, известными в данной области, примерами которых являются Вестерн-блоттинг или анализ радиальной иммунодиффузии, например, описанный Hudson et al., 1989. В этом отношении была обнаружена иммунологическая перекрестная реактивность между альфа-амилазами, имеющими последовательности SEQ ID NO:2, 4, 6 или 8 соответственно.

Олигонуклеотидный зонд, используемый в характеристике Термамил-подобной альфа-амилазы в соответствии со свойством iii), указанным выше, может быть легко получен на основе полной или частичной нуклеотидной или аминокислотной последовательности рассматриваемой альфа-амилазы.

Подходящие условия для тестирования гибридизации включают в себя предварительное замачивание в 5× SSC и предгибридизацию в течение 1 часа при -40° C в растворе 20% формамида, 5х растворе Денхардта, 50 мМ фосфате натрия, pH 6,8, и 50 мг денатурированной обработанной ультразвуком ДНК тимуса теленка, с последующей гибридизацией в том же самом растворе, дополненном 100 мМ АТФ, в течение 18 час при -40° C, с последующими тремя промывками фильтра 2× SSC, 0,2% ДСН при 40° C в течение 30 мин (низкая жесткость), предпочтительно при 50° C (умеренная жесткость), более предпочтительно при 65° C (высокая жесткость), даже более предпочтительно при ~75° C (очень высокая жесткость). Более подробные детали относительно способа гибридизации могут быть найдены в Sambrook et al., Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989.

В данном контексте "происходящая из" обозначает не только альфа-амилазу, продуцируемую или продуцируемую рассматриваемым штаммом организма, но также альфа-амилазу, кодируемую последовательностью ДНК, выделенной из такого штамма, и продуцируемую в организме-хозяине, трансформированном указанной последовательностью ДНК. Наконец, этот термин обозначает альфа-амилазу, которая кодируется последовательностью ДНК синтетического происхождения или кДНК-происхождения и которая имеет идентифицирующие характеристики рассматриваемой альфа-амилазы.

Этот термин указывает также, что исходная альфа-амилаза может быть вариантом природной альфа-амилазы, т.е. вариантом, который является результатом модификации (инсерции, замены, делении) одного или нескольких аминокислотных остатков природной альфа-амилазы.

Исходные гибридные альфа-амилазы.

Исходная альфа-амилаза может представлять собой гибридную альфа-амилазу, т.е. альфа-амилазу, которая содержит комбинацию частичных аминокислотных последовательностей, происходящих по меньшей мере из двух альфа-амилаз.

Исходная гибридная альфа-амилаза

может быть альфа-амилазой, которая может быть определена на основе аминокислотной гомологии и/или иммунологической перекрестной реактивности и/или гибридизации ДНК (как определено выше) как принадлежащая к семейству Термамил-подобных альфа-амилаз. В этом случае гибридная альфа-амилаза обычно состоит по меньшей мере из одной части Термамил-подобной альфа-амилазы и части (частей) одной или нескольких других альфа-амилаз, выбранных из Термамил-подобных альфа-амилаз или не-Термамил-подобных альфа-амилаз микробного (бактериального или грибкового) происхождения и/или происходящих из млекопитающих.

Таким образом, исходная гибридная альфа-амилаза может содержать комбинацию частичных последовательностей, происходящих по меньшей мере из двух Термамил-подобных альфа-амилаз или по меньшей мере из одной Термамил-подобной альфа-амилазы и по меньшей мере одной грибковой альфа-амилазы. Термамил-подобная альфа-амилаза, из которой происходит частичная аминокислотная последовательность, может быть, например, любой из указанных здесь Термамил-подобных альфа-амилаз.

Например, исходная альфа-амилаза может содержать С-концевую часть альфа-амилазы, происходящей из штамма *B. licheniformis*, и N-концевую часть альфа-амилазы, происходящую из штамма *B. amyloliquefaciens* или из штамма *B. stearothermophilus*. Например, исходная альфа-амилаза может содержать по меньшей мере 430 аминокислотных остатков С-концевой части альфа-амилазы *B. licheniformis* и может содержать, например, а) аминокислотный сегмент, соответствующий 37 N-концевым аминокислотным остаткам альфа-амилазы *B. amyloliquefaciens*, имеющей аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:6, и аминокислотный сегмент, соответствующий 445 С-концевым остаткам альфа-амилазы *B. licheniformis*, имеющей аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:4, или б) аминокислотный сегмент, соответствующий 68 N-концевым аминокислотным остаткам альфа-амилазы *B. stearothermophilus*, имеющей аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:8, и аминокислотный сегмент, соответствующий 415 С-концевым аминокислотным остаткам альфа-амилазы *B. licheniformis*, имеющей аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:4.

В предпочтительном варианте исходная Термамил-подобная альфа-амилаза является гибридной Термамил-подобной альфа-амилазой, идентичной альфа-амилазе *B. licheniformis*, показанной в SEQ ID NO:4, за исключением того, что 35 N-концевых аминокислотных остатков (зрелый белок) заменены 33 N-концевыми аминокислотными остатками зрелого белка альфа-амилазы *B. amyloliquefaciens* (BAN), показанной в SEQ ID NO:6. Указанный гибрид может дополнительно иметь следующие мутации: H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S (с

использованием нумерации в SEQ ID NO:4), и этот гидрид назван LE174.

Другой предпочтительной исходной альфа-амилазой является LE429, показанная в SEQ ID NO:2.

Не-Термамил-подобной альфа-амилазой может быть, например, грибковая альфа-амилаза, альфа-амилаза млекопитающего или растения или бактериальная альфа-амилаза (отличающаяся от Термамил-подобной альфа-амилазы). Конкретные примеры таких альфа-амилаз включают в себя альфа-амилазу TAKA *Aspergillus oryzae*, альфа-амилазу *A. niger*, альфа-амилазу *Bacillus subtilis*, свиную панкреатическую альфа-амилазу и альфа-амилазу ячменя. Все эти альфа-амилазы имеют выясненные структуры, которые заметно отличаются от структуры типичной Термамил-подобной альфа-амилазы, на которую здесь ссылаются.

Грибковые альфа-амилазы, указанные выше, т.е. происходящие из *A. niger* и *A. oryzae*, являются высокоомологичными на аминокислотном уровне и обычно считаются принадлежащими к тому же самому семейству альфа-амилаз. Грибковая альфа-амилаза, происходящая из *Aspergillus oryzae*, является коммерчески доступной под товарным названием Фунгамил™.

Кроме того, при упоминании конкретного варианта Термамил-подобной альфа-амилазы (варианта данного изобретения) - общепринятым образом - ссылкой на модификацию (например, делецию или замену) конкретных аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности конкретной Термамил-подобной альфа-амилазы, должно быть понятно, что сюда включены и варианты другой Термамил-подобной альфа-амилазы, модифицированной в эквивалентном положении (положениях) (как определено из сопоставления наиболее возможных аминокислотных последовательностей между соответствующими аминокислотными последовательностями).

Предпочтительный вариант данного изобретения является вариантом, происходящим из альфа-амилазы *B. licheniformis* (в качестве исходной Термамил-подобной альфа-амилазы), например одним из указанных выше, таким как альфа-амилаза *B. licheniformis*, имеющая аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO:4.

Конструирование вариантов изобретения Конструирование представляющего интерес варианта может быть выполнено культивированием микроорганизма, содержащего последовательность ДНК, кодирующую этот вариант, в условиях, которые являются благоприятными для получения данного варианта. Затем этот вариант может быть извлечен из полученной культуральной среды. Это описано подробно дополнительно ниже.

Измененные свойства

Далее обсуждается взаимосвязь между мутациями, которые могут присутствовать в вариантах данного изобретения, и желательными изменениями в свойствах (относительно свойств исходной Термамил-подобной альфа-амилазы), которые могут возникать из них.

В первом аспекте данное изобретение относится к варианту исходной Термамил-подобной альфа-амилазы, содержащему изменение в одном или нескольких положениях, выбранных из группы:

W13, G48, T49, S50, Q51, A52, D53, V54, G57, G107, G108, A111, S168, M197, где (a) это изменение (эти изменения) представляют собой независимо:

(i) инсерцию аминокислоты справа от аминокислоты, которая занимает это положение;

(ii) делецию аминокислоты, которая занимает это положение, или

(iii) замену аминокислоты, которая занимает это положение, отличающейся аминокислотой,

(b) этот вариант имеет альфа-амилазную активность и (c) каждое положение соответствует положению аминокислотной последовательности исходной Термамил-подобной альфа-амилазы, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4.

В предпочтительном воплощении вышеуказанные варианты данного изобретения содержат мутацию в положении, соответствующем по меньшей мере одной из следующих мутаций в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:4:

V54N, A52S, A52S+V54N, T49L, T49+G107A, A52S+V54N+T49L+G107A, A52S+V54N+T49L, G107A, Q51R, Q51R+A52S, A52N; или

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; или

T49V, T49I, T49D, T49N, T49S, T49Y, T49F, T49W, T49M, T49E, T49Q, T49K, T49R, A52T, A52L, A52I, A52V, A52M, A52F, A52Y, A52W, V54M, G107V, G107I, G107L, G107C.

В предпочтительном воплощении вариант данного изобретения содержит по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем следующим мутациям в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:4:

W13F, L, I, V, Y, A;
G48A, V, S, T, I, L;
*48aD или *48aY (т.е. инсерция D или Y);
T49X;

*49aX (т.е. инсерция любого возможного аминокислотного остатка)

S50X, в частности D, Y, L, T, V, I;
Q51R, K;
A52X, в частности A52S, N, T, F, L, I, V;
D53E, Q, Y, I, N, S, T, V, L;

V54X, в частности V54I, N, W, Y, F, L;
G57S, A, V, L, I, F, Y, T;
G107X, в частности G107A, V, S, T, I, L, C;
G108X, в частности G108A, V, S, T, I, L;
A111V, I, L;
S168Y;

M197X, в частности Y, F, L, I, T, A, G.

В предпочтительном воплощении вариант данного изобретения содержит следующие мутации, соответствующие следующим мутациям в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:4: T49X+A52X+V54N/I/L/Y/F/W+G107A, и

может дополнительно включать в себя G108A.

В предпочтительном воплощении вариант данного изобретения содержит по меньшей мере одну мутацию, соответствующую следующим мутациям в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:4:

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;
T49L+G108A;
T49I+G108A;
T49L+G108A+V54I;
T49I+G108A+V54I.

Все из вышеуказанных вариантов данного изобретения имеют измененные свойства (т.е. усиленные или ослабленные свойства), в частности, по меньшей мере одно из следующих свойств, относительно исходной альфа-амилазы: пониженную способность расщеплять субстрат вблизи точки ветвления, повышенную субстратную специфичность и/или повышенную удельную активность, измененный профиль pH-активности, измененный профиль pH-стабильности, измененную устойчивость к окислению, измененную Ca^{2+} -зависимость.

Стабильность

В контексте данного изобретения мутации (в том числе аминокислотные замены и/или делеции), важные в отношении достижения измененной стабильности, в частности улучшенной стабильности (т.е. более высокой или более низкой), особенно при низком pH (т.е. pH 4-6), включают в себя все мутации, перечисленные в разделе "Измененные свойства" выше, и варианты, указанные непосредственно ниже.

Следующие варианты: Q360A,K; N102A, N326A,L; N190G, N190K; Y262A,K,E (с использованием нумерации BAN, т.е. SEQ ID NO:6) испытывали на их pH-стабильность. Предпочтительной исходной альфа-амилазой может быть BA2, описанная выше. pH-стабильность определяли, как описано в разделе "Материалы и способы".

Устойчивость к Ca^{2+}

Измененная устойчивость к Ca^{2+} обозначает улучшенную стабильность фермента при низком содержании Ca^{2+} , т.е. более высокую или более низкую стабильность. В контексте данного изобретения мутации (в том числе аминокислотные замены), важные в отношении достижения измененной устойчивости к Ca^{2+} , в частности улучшенной устойчивости к Ca^{2+} , т.е. более высокой или более низкой устойчивости, особенно при низком pH (т.е. pH 4-6), включают в себя любые из мутаций, перечисленных в разделе "Измененные свойства" выше.

Удельная активность

В дополнительном аспекте данного изобретения важные мутации в отношении получения вариантов, проявляющих измененную удельную активность, в

частности увеличенную или уменьшенную активность, особенно при температурах 60-100° C, предпочтительно 70-95° C, особенно 80-90° C, включают в себя любые из мутаций, перечисленных в разделе "Измененные свойства" выше.

Удельную активность LE174 и LE429 определяли до 16000 NU/мг с использованием анализа Phadebas®, описанного в разделе "Материалы и способы".

Измененный характер расщепления

В процессе разжижения крахмала желательным является использование альфа-амилазы, которая способна разрушать молекулы крахмала на длинные, разветвленные олигосахариды, а не альфа-амилазы, которая образует более короткие разветвленные олигосахариды (подобно общепринятым Термамил-подобным альфа-амилазам). Короткие разветвленные олигосахариды (предшественники панозы) не гидролизуются удовлетворительно пуллуланазами, которые используют после обработки альфа-амилазами в процессе разжижения или одновременно с осаживающей амилоглюкозидазой (глюкоамилазой) или перед добавлением осаживающей амилоглюкозидазы (глюкоамилазы). Таким образом, в присутствии предшественников панозы смесь продуктов, присутствующая после глюкоамилазной обработки, содержит значительную долю короткого, разветвленного, так называемого предельного (остаточного) декстрина, а именно трисахарида панозы. Присутствие панозы значительно снижает выход осаживания и, следовательно, является нежелательным.

Ранее сообщалось (патент США 5234823), что при осаживании глюкоамилазой и пуллулазой присутствие остаточной альфа-амилазной активности, возникающей из процесса разжижения, может приводить к более низким выходам глюкозы, если альфа-амилаза не инактивируется перед стадией осаживания. Эту инактивацию можно обычно проводить доведением pH до менее 4,7 при 95° C перед снижением температуры до 60° C для осаживания.

Причина этого отрицательного действия на выход глюкозы полностью не выяснена, но предполагается, что разжижающая альфа-амилаза (например, Термамил 120 L из B. licheniformis) генерирует "предельные (остаточные) декстрины" (которые являются плохими субстратами для пуллулазы) гидролизом 1,4-альфа-глюкозидных связей вблизи от точек ветвления или по обе стороны от точек ветвления в амилопектине. Гидролиз этих предельных декстринов глюкоамилазой приводит к накоплению трисахарида панозы, которая лишь слабо гидролизуются глюкоамилазой.

Получение термостабильной альфа-амилазы, которая не страдает этим недостатком, было бы значительным усовершенствованием, так как не требовалась бы отдельная стадия инактивации.

Таким образом, целью данного изобретения является получение мутантной альфа-амилазы, имеющей подходящим образом модифицированные характеристики

деградации крахмала, но сохраняющей термостабильность исходной Термамил-подобной альфа-амилазы.

Таким образом, данное изобретение относится к варианту Термамил-подобной альфа-амилазы, который имеет улучшенную пониженную способность расщеплять субстрат вблизи точки ветвления и дополнительно имеет улучшенную субстратную специфичность и/или улучшенную удельную активность.

Особый интерес представляет вариант, который расщепляет субстрат-амилопектин, от восстанавливающего конца, на расстоянии более одного глюкозного звена от точки ветвления, предпочтительно на расстоянии более двух или трех глюкозных звеньев от точки ветвления, т.е. при большем расстоянии от точки ветвления, чем это расстояние при применении альфа-амилазы *B. licheniformis* дикого типа.

Здесь можно упомянуть, что согласно WO 96/23874 ожидается, что варианты, содержащие по меньшей мере одну из следующих мутаций, предотвращают расщепление вблизи от точки ветвления:

V54L,I,F,Y,W,R,K,H,E,Q;

D53L,I,F,Y,W;

Y56W;

Q333W;

G57, все возможные аминокислотные остатки;

A52, аминокислотные остатки, большие чем А, например A52W,Y, L,F,I.

Мутации, представляющие особенный интерес в связи с получением вариантов в соответствии с данным изобретением, имеющие улучшенную уменьшенную способность расщеплять субстрат вблизи точки ветвления и, кроме того, имеющие улучшенную субстратную специфичность и/или улучшенную удельную активность, включают в себя мутации в следующих положениях в альфа-амилазе *B. licheniformis*, SEQ ID NO:4:

H156, A181, N190, A209, Q264 и 1201.

Следует подчеркнуть, что могут быть использованы не только специально указанные ниже Термамил-подобные альфа-амилазы.

Могут быть также использованы другие коммерческие Термамил-подобные альфа-амилазы. Неограничивающий перечень таких альфа-амилаз включает: альфа-амилазы, продуцируемые штаммом *B. licheniformis*, описанные в EP 0252666 (ATCC 27811), и альфа-амилазы, идентифицированные в WO 91/00353 и WO 94/18314. Другими коммерческими Термамил-подобными альфа-амилазами *B. licheniformis* являются Optitherm™ и Takatherm™ (доступные из Solvay), Maxamyl™ (доступная из Gist-Brocades/Genencor), Spezym AA™ и Spezyme Delta AA™ (доступные из Genencor), и Keistase™ (доступная из Daiwa).

Все Термамил-подобные альфа-амилазы могут быть выгодным образом использованы в качестве скелета макромолекулы для получения вариантов данного изобретения.

В предпочтительном варианте данного изобретения исходная Термамил-подобная альфа-амилаза является гибридной альфа-амилазой SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:6. Конкретно, исходная гибридная

Термамил-подобная альфа-амилаза может быть гибридной альфа-амилазой, содержащей 445 С-концевых аминокислотных остатков альфа-амилазы *B. licheniformis*, показанной в SEQ ID NO: 4, и 37 N-концевых аминокислотных остатков зрелой альфа-амилазы, происходящей из *B. amyloliquefaciens*, показанной в SEQ ID NO:6, которая может выгодно иметь дополнительно следующие мутации:

5 H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S (с использованием нумерации SEQ ID NO:4). Этот гибрид называют LE174. Гибрид LE174 может быть объединен с дополнительной мутацией I201F с образованием исходной гибридной Термамил-подобной

10 альфа-амилазы, имеющей следующие мутации H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+I201F (с использованием SEQ ID NO:4 для нумерации). Этот гибридный вариант показан в SEQ ID NO:2 и использован в примерах, приведенных ниже, и назван LE429.

15 Также LE174 или LE429 (SEQ ID NO: 2) или альфа-амилаза *B. licheniformis*, показанная в SEQ ID NO:4, содержащая одну или несколько следующих мутаций, могут быть использованы в качестве скелета макромолекулы (с использованием SEQ ID NO:4 для нумерации мутаций):

E119C;

S130C;

D124C;

R127C;

30 A52 все возможные аминокислотные остатки;

S85 все возможные аминокислотные остатки;

35 N96 все возможные аминокислотные остатки;

V129 все возможные аминокислотные остатки;

A269 все возможные аминокислотные остатки;

40 A378 все возможные аминокислотные остатки;

S148 все возможные аминокислотные остатки, в частности S148N;

E211 все возможные аминокислотные остатки, в частности E211Q;

45 N188 все возможные аминокислотные остатки, в частности N188S, N188P;

M197 все возможные аминокислотные остатки, в частности M197T, M197A, M197G, M197I, M197L, M197Y, M197F, M197I;

M138 все возможные аминокислотные остатки, в частности W138Y;

50 D207 все возможные аминокислотные остатки, в частности D207Y;

H133 все возможные аминокислотные остатки, в частности H133Y;

55 H205 все возможные аминокислотные остатки, в частности H205H, H205C, H205R;

S187 все возможные аминокислотные остатки, в частности S187D;

A210 все возможные аминокислотные остатки, в частности A210S, A210T;

60 H405 все возможные аминокислотные остатки, в частности H405D;

K176 все возможные аминокислотные остатки, в частности K176R;

F279 все возможные аминокислотные остатки, в частности F279Y;

Q298 все возможные аминокислотные остатки, в частности Q298H;

G299 все возможные аминокислотные остатки, в частности G299R;

L308 все возможные аминокислотные остатки, в частности L308F;

T412 все возможные аминокислотные остатки, в частности T412A;

Кроме того, альфа-амилаза B. licheniformis, показанная в SEQ ID NO:4, содержащая по меньшей мере одну из следующих мутаций, может быть использована в качестве скелета макромолекулы:

M15 все возможные аминокислотные остатки;

A33 все возможные аминокислотные остатки.

При использовании LE429 (показанной в SEQ ID NO: 2) в качестве скелета макромолекулы. (т.е. в качестве исходной Термамил-подобной альфа-амилазы) объединением LE174 с мутацией I201F (нумерация SEQ ID NO:4) могут быть произведены мутации/изменения, в частности замены, делеции и инсерции в соответствии с данным изобретением в одном или нескольких положениях для улучшения уменьшенной способности расщеплять субстрат вблизи точки ветвления и для улучшения субстратной специфичности и/или улучшенной удельной активности: W13, G48, T49, S50, Q51, A52, D53, V54, G57, G107, G108, A111, S168, M197 (с использованием нумерации SEQ ID NO:4), где (a) это изменение (эти изменения) представляют собой:

(i) инсерцию аминокислоты справа от аминокислоты, которая занимает это положение;

(ii) делецию аминокислоты, которая занимает это положение, или

(iii) замену аминокислоты, которая занимает это положение, отличающейся аминокислотой,

(b) этот вариант имеет альфа-амилазную активность и (c) каждое положение соответствует положению аминокислотной последовательности исходной Термамил-подобной альфа-амилазы, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4.

В предпочтительном воплощении вариант данного изобретения содержит по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем следующим мутациям в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:4:

V54N, A52S, A52S+V54N, T49L, T49+G107A, A52S+V54N+T49L+G107A, A52S+V54N+T49L, G107A, Q51R, Q51R+A52S, A52N; или

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; или

T49V, T49I, T49D, T49N, T49S, T49Y, T49F, T49W, T49M, T49E, T49Q, T49K, T49R, A52T, A52L, A52I, A52V, A52M, A52F, A52Y, A52W, V54M, G107V, G107I, G107L, G107C.

В предпочтительном воплощении вариант данного изобретения содержит по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем следующим мутациям в аминокислотной последовательности,

показанной в SEQ ID NO:4:

W13F,L,I,V,Y,A;

G48A,V,S,T,I,L;

*48aD или *48aY (т.е. инсерция D или Y);

T49X;

5 *49aX (т.е. инсерция любого возможного аминокислотного остатка)

S50X, в частности D,Y,L,T,V,I;

Q51R,K;

A52X, в частности A52S,N,T,F,L,I,V;

10 D53E,Q,I,N,S,T,V,L;

V54X, в частности V54I,N,W,Y,F,L;

G57S,A,V,L,I,F,Y,T;

G107X, в частности G107A,V,S,T,I,L,C;

G108X, в частности G108A,V,S,T,I,L;

A111V,I,L;

15 S168Y;

M197X, в частности Y,F,L,I,T,A,G.

В предпочтительном воплощении вариант данного изобретения содержит по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем следующим мутациям в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:4:

T49X+A52X+V54N/I/L/Y/F/W+G107A, и может дополнительно включать в себя G108A.

25 В предпочтительном воплощении вариант данного изобретения содержит по меньшей мере одну мутацию в положении, соответствующем следующим мутациям в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO:4:

30 T49L+G107A;

T49I+G107A;

T49L+G107A+V54I;

T49I+G107A+V54I;

A52S+V54N+T49L+G107A;

35 A52S+V54I+T49L+G107A;

A52S+T49L+G107A;

A52T+T49L+G107A;

A52S+V54N+T49I+G107A;

A52S+V54I+T49I+G107A;

A52S+T49I+G107A;

40 T49L+G108A;

T49I+G108A;

T49L+G108A+V54I;

T49I+G108A+V54I.

Общие мутации в вариантах данного изобретения

45 Может быть предпочтительным, чтобы вариант данного изобретения содержал одну или несколько модификаций, кроме описанных выше. Так, может быть выгодным, чтобы один или несколько остатков пролина, присутствующих в части варианта

50 альфа-амилазы, которая является модифицированной, был/были заменены другим остатком (не остатком пролина), который может быть любым из возможных природных остатков, отличных от пролина, и который предпочтительно является аланином, глицином, серином, треонином, валином или лейцином.

55 Аналогично, может быть предпочтительным, чтобы один или несколько остатков цистеина среди аминокислотных остатков, которыми модифицирована исходная альфа-амилаза, был/были заменены другим остатком (не остатком цистеина), таким как серин, аланин, треонин, глицин, валин или лейцин.

60 Кроме того, вариант данного изобретения может быть - либо в виде единственной модификации, либо в комбинации с любой из

вышеописанных модификаций - модифицирован таким образом, что один или несколько Asp и/или Glu, присутствующих в аминокислотном фрагменте, соответствующем аминокислотному фрагменту 185-209 SEQ ID NO:4, является замененным Asp и/или Gln соответственно. Также представляет интерес замена, в Термамил-подобной альфа-амилазе, одного или нескольких остатков Lys, присутствующих в аминокислотном фрагменте, соответствующем аминокислотному фрагменту 185-209 SEQ ID NO:4, посредством Arg.

Должно быть понятно, что данное изобретение включает в себя варианты, содержащие две или несколько вышеописанных модификаций.

Кроме того, может быть выгодным введение точковых мутаций в любом из описанных здесь вариантов.

Способы получения вариантов альфа-амилазы

Несколько способов введения мутаций в гены известны в данной области. После краткого обсуждения клонирования кодирующих альфа-амилазу последовательностей ДНК будут обсуждены способы генерирования мутаций в специфических сайтах в кодирующей альфа-амилазу последовательности.

Клонирование последовательности ДНК, кодирующей альфа-амилазу

Последовательность ДНК, кодирующая исходную альфа-амилазу, может быть выделена из любой клетки или микроорганизма, продуцирующих рассматриваемую альфа-амилазу, с использованием различных способов, хорошо известных в данной области. Во-первых, должна быть сконструирована библиотека геномной ДНК и/или библиотека кДНК с использованием хромосомной ДНК или матричной РНК из организма, который продуцирует исследуемую альфа-амилазу. Затем, если аминокислотная последовательность этой альфа-амилазы известна, могут быть синтезированы гомологичные меченые олигонуклеотидные зонды и использованы для идентификации кодирующих альфа-амилазу клонов из геномной библиотеки, полученной из рассматриваемого организма. Альтернативно, меченый олигонуклеотидный зонд, содержащий последовательность, гомологичную известному гену альфа-амилазы, мог бы быть использован в качестве зонда для идентификации кодирующих альфа-амилазу клонов с использованием условий гибридизации и промывки низкой жесткости.

Еще один способ для идентификации кодирующих альфа-амилазу клонов включает в себя встраивание фрагментов геномной ДНК в экспрессирующий вектор, такой как плаزمид, трансформацию альфа-амилаза-отрицательных бактерий полученной библиотекой геномной ДНК и затем посев трансформированных бактерий на агар, содержащий субстрат для альфа-амилазы, что позволяет в результате идентифицировать клоны, экспрессирующие альфа-амилазу.

Альтернативно, последовательность ДНК, кодирующая этот фермент, может быть

получена синтетически при помощи установленных стандартных способов, например фосфоамидитного способа, описанного S.L. Beaucage and M.H. Caruthers (1981), или способа, описанного Matthes et al., (1984). В фосфоамидитном способе олигонуклеотиды синтезируют, например, в автоматическом ДНК-синтезаторе, очищают, лигируют и клонируют в подходящих векторах.

Наконец, последовательность ДНК может быть смешанного геномного и синтетического происхождения, смешанного синтетического и кДНК-происхождения или смешанного геномного и кДНК-происхождения, полученная лигированием фрагментов синтетического, геномного или кДНК-происхождения (если требуется, фрагментов, соответствующих различным частям полной последовательности ДНК), в соответствии со стандартными способами.

Последовательность ДНК может быть также получена полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с использованием специфических праймеров, например, как описано в патенте США 4683202 или R.K. Saiki et al. (1988).

Сайт-направленный мутагенез

После выделения кодирующей альфа-амилазу последовательности ДНК и идентификации желательных сайтов для мутации мутации могут быть введены с использованием синтетических олигонуклеотидов. Эти олигонуклеотиды содержат нуклеотидные последовательности, фланкирующие желательные сайты мутации; мутантные нуклеотиды встраивают во время синтеза олигонуклеотидов. В конкретном способе одноцепочечный разрыв ДНК, соединяющей кодирующую альфа-амилазу последовательность, создают в векторе, несущем ген альфа-амилазы. Затем синтетический нуклеотид, несущий желаемую мутацию, отжигают с гомологичной частью этой одноцепочечной ДНК. Затем оставшийся пропуск заполняют с использованием ДНК-полимеразы I (фрагмента Кленова) и эту конструкцию лигируют при помощи лигазы T4. Характерный пример этого способа описан в Morinaga et al., (1984). Патент США 4760025 описывает введение олигонуклеотидов, кодирующих множественные мутации, выполнением минорных изменений этой кассеты. Однако еще большее разнообразие мутаций может быть введено одномоментно по способу Morinaga, так как может быть введено множество олигонуклеотидов различной длины.

Другой способ введения мутаций в кодирующую альфа-амилазу ДНК описан в Nelson and Long (1989). Он включает в себя 3-стадийное генерирование ПЦР-фрагмента, содержащего желательную мутацию, введенную с использованием химически синтезированной цепи ДНК в качестве одного из праймеров в реакциях ПЦР. Из ПЦР-генерированного продукта фрагмент ДНК, несущий мутацию, может быть выделен расщеплением рестрикционными эндонуклеазами (рестриктазами) и повторно встроен в экспрессионную кассету.

Случайный мутагенез

Случайный мутагенез удобно проводить либо в виде локализованного, либо в виде область-специфического случайного мутагенеза по меньшей мере в трех частях

гена, транскрибируемого в аминокислотную последовательность, или в целом гене.

Случайный мутагенез последовательности ДНК, кодирующей исходную альфа-амилазу, может быть удобным образом выполнен с использованием любого известного в данной области способа.

В связи с вышесказанным, следующий аспект данного изобретения относится к способу генерирования варианта исходной альфа-амилазы, в котором, например, этот вариант проявляет пониженную способность расщепления олигосахаридного субстрата вблизи точки ветвления и дополнительно проявляет повышенную субстратную специфичность и/или повышенную удельную активность относительно исходного фермента, причем этот способ предусматривает:

(а) подвергание последовательности ДНК, кодирующей исходную альфа-амилазу, случайному мутагенезу,

(б) экспрессию мутированной последовательности ДНК, полученной в стадии (а), в клетке-хозяине и

(с) скрининг на клетки-хозяева, экспрессирующие вариант альфа-амилазы, который имеет измененное свойство (т.е. термостабильность) относительно исходной альфа-амилазы.

Стадию (а) указанного выше способа данного изобретения предпочтительно выполняют с использованием легированных (doped) праймеров. Например, случайный мутагенез может быть выполнен с использованием подходящего физического или химического мутагенного агента, с использованием подходящего олигонуклеотида, или подверганием последовательности ДНК генерируемому ПЦР мутагенезу. Кроме того, случайный мутагенез может быть выполнен с использованием любой комбинации этих мутагенных агентов. Мутагенный агент может, например, быть агентом, который индуцирует транзиции, трансверсии, инверсии, перетасовку, делеции и/или инсерции (вставки).

Примеры физического или химического мутагенного агента, пригодного для этой цели, включают в себя облучение ультрафиолетом (УФ), гидроксилламин, N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин (MNNG), O-метилгидроксилламин, азотистую кислоту, этилметансульфонат (EMS), бисульфит натрия, муравьиную кислоту и аналоги нуклеотидов. При использовании таких агентов мутагенез обычно проводят инкубированием последовательности ДНК, кодирующей исходный фермент, который должен быть мутагенизирован, в присутствии предпочтительного мутагенного агента при подходящих условиях для осуществления мутагенеза и отбора на мутированную ДНК, имеющую желательные свойства. При проведении мутагенеза с использованием олигонуклеотида этот олигонуклеотид может быть легирован (doped) или снабжен (spiked) тремя вставленными, не содержащимися в исходном ферменте нуклеотидами во время синтеза этих олигонуклеотидов в положениях, которые должны быть изменены. Это "легиrowание" или "вставка" может быть выполнено таким образом, что кодоны для нежелательных аминокислот избегаются. "Легиrowанный" или "снабженный

вставленными нуклеотидами" олигонуклеотид может быть включен в ДНК, кодирующую альфа-амилазный фермент, любым опубликованным способом, с использованием, например, ПЦР, ЛЦР или любой ДНК-полимеразы и лигазы, которые считаются подходящими. Предпочтительно, "легиrowание" проводят с использованием "постоянного случайного легиrowания", в котором процент дикого типа и мутации в каждом положении является предварительно определенным. Кроме того, "легиrowание" может проводиться в направлении предпочтения для введения определенных нуклеотидов и, тем самым, предпочтения для введения одного или нескольких специфических аминокислотных остатков. "Легиrowание" может быть выполнено, например, таким образом, чтобы сделать возможным введение 90% дикого типа и 10% мутаций в каждом положении. Дополнительное соображение в выборе схемы "легиrowания" основано на генетических, а также белковых структурных соображениях. Схема "легиrowания" может быть построена с использованием программы DOPE, которая, *inter alia*, гарантирует, что введение стоп-кодонов избегается. При использовании ПЦР-генерируемого мутагенеза химически обработанный или не обработанный ген, кодирующий исходную альфа-амилазу, подвергают ПЦР в условиях, которые увеличивают ошибочное включение нуклеотидов (Deshler 1992; Leung et al., *Technique*, Vol. 1, 1989, pp. 11-15). Мутуирующий штамм *E. coli* (Fowler et al., *Molec. Gen. Genet.*, 133, 1974, pp. 179-191), *S. cerevisiae* или любой другой микробный организм может быть использован для случайного мутагенеза ДНК, кодирующей альфа-амилазу, например, трансформацией плазмиды, содержащей исходную гликозилазу, в мутуирующем штамме, выращиванием мутуирующего штамма с этой плазмидой и выделением мутуированной плазмиды из мутуирующего штамма. Затем мутуированной плазмидой может быть трансформирован экспрессирующий организм. Подлежащая мутагенезу последовательность ДНК может для удобства присутствовать в библиотеке геномной ДНК или кДНК, полученной из организма, экспрессирующего исходную альфа-амилазу. Альтернативно, эта последовательность ДНК может присутствовать на подходящем векторе, таком как плазида или бактериофаг, который в таком виде может быть инкубирован с мутагенным агентом или иным образом экспонирован мутагенному агенту. ДНК, которая должна быть мутагенизирована, может также присутствовать в клетке-хозяине либо будучи интегрированной в геном этой клетки, либо присутствуя на векторе, уловленном в этой клетке. Наконец, ДНК, которая должна быть мутагенизирована, может быть в выделенной форме. Должно быть понятно, что последовательность ДНК, подлежащая случайному мутагенезу, является предпочтительно кДНК-последовательностью или последовательностью геномной ДНК. В некоторых случаях может быть удобной амплификация мутуированной последовательности ДНК перед выполнением стадии экспрессии б) или стадии скрининга

с). Такая амплификация может проводиться в соответствии со способами, известными в данной области, причем предпочтительным в настоящее время способом является ПЦР-генерируемая амплификация с использованием олигонуклеотидных праймеров, полученных на основе последовательности ДНК или аминокислотной последовательности исходного фермента. После инкубации с мутагенным агентом или экспонирования мутагенному агенту мутированную ДНК экспрессируют культивированием подходящей клетки-хозяина, несущей эту последовательность ДНК, в условиях, обеспечивающих протекание экспрессии. Клеткой-хозяином, используемой для этой цели, может быть любая клетка, которая была трансформирована мутированной последовательностью ДНК, необязательно присутствующей на векторе, или клетка, которая несла последовательность ДНК, кодирующую исходный фермент, во время мутагенной обработки. Примерами подходящих клеток-хозяев являются следующие: грамположительные бактерии, такие как *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces lividans* или *Streptomyces murinus*; и грамотрицательные бактерии, такие как *E. coli*. Мутированная последовательность ДНК может дополнительно содержать последовательность ДНК, кодирующую функции, делающие возможной экспрессию этой мутированной последовательности ДНК.

Локализованный случайный мутагенез

Случайный (спонтанный) мутагенез может быть выгодно локализован в части рассматриваемой исходной альфа-амилазы. Это может быть, например, выгодным, когда определенные области этого фермента были идентифицированы как области, особенно важные для конкретного свойства этого фермента, и ожидается, что при модификации они приводят к варианту, имеющему улучшенные свойства. Такие области могут быть обычно идентифицированы, когда третичная структура исходного фермента была выяснена и соотнесена с функцией этого фермента.

Локализованный или область-специфический спонтанный мутагенез удобно проводить с использованием способов ПЦР-генерируемого мутагенеза, как описано выше, или любым другим подходящим способом, известным в данной области. Альтернативно, последовательность ДНК, кодирующая часть последовательности ДНК, которая должна быть модифицирована, может быть выделена, например, встраиванием в подходящий вектор, и указанная часть может быть подвергнута мутагенезу при помощи любого из обсуждаемых выше способов мутагенеза.

Альтернативные способы обеспечения вариантов альфа-амилазы

Альтернативные способы для обеспечения вариантов данного изобретения

включают в себя способ перетасовки генов, известный в данной области, в том числе способы, описанные в WO 95/22625 (из Affymax Technologies N.V.) и WO 96/00343 (из Novo Nordisk A/S).

Экспрессия вариантов альфа-амилазы
Согласно данному изобретению последовательность ДНК, кодирующая вариант, полученная описанными выше способами или любыми альтернативными способами, известными в данной области, может быть экспрессирована, в форме фермента, с использованием экспрессирующего вектора, который обычно включает в себя регуляторные последовательности, кодирующие промотор, оператор, сайт связывания рибосом, сигнал инициации трансляции и, необязательно, репрессорный ген или различные гены-активаторы.

Рекомбинантный экспрессирующий вектор, несущий последовательность ДНК, кодирующую вариант альфа-амилазы данного изобретения, может быть любым вектором, который может быть легко подвергнут процедурам рекомбинантных ДНК, и выбор вектора будет часто зависеть от клетки-хозяина, в которую он должен вводиться. Таким образом, этот вектор может быть автономно реплицирующимся вектором, т.е. вектором, который существует в виде внехромосомной сущности, репликация которой является независимой от хромосомной репликации, например плазмидой, бактериофагом или внехромосомным элементом, минихромосомой или искусственной хромосомой. Альтернативно, этот вектор может быть вектором, который при введении в клетку-хозяина интегрируется в геном клетки-хозяина и реплицируется вместе с хромосомой (хромосомами), в которую (в которые) он был интегрирован.

В этом векторе последовательность ДНК должна быть функционально соединена с подходящей промоторной последовательностью. Промотор может быть любой последовательностью ДНК, которая обнаруживает транскрипционную активность в выбранной клетке-хозяине и может быть получена из генов, кодирующих белки, либо гомологичные, либо гетерологичные относительно клетки-хозяина. Примерами подходящих промоторов для направления транскрипции последовательности ДНК, кодирующей вариант альфа-амилазы данного изобретения, в частности в бактериальном хозяине, являются промотор *lac*-оперона *E. coli*, промоторы гена агаразы *dagA* *Streptomyces coelicolor*, промоторы гена альфа-амилазы (*amyL*) *B. licheniformis*, промоторы гена мальтогенной амилазы (*amyM*) *B. stearothermophilus*, промоторы гена альфа-амилазы (*amyQ*) *B. amyloliquefaciens*, промоторы генов *xylA* и *xylB* *Bacillus subtilis*. Для транскрипции в грибковом хозяине примерами применимых промоторов являются промоторы, происходящие из гена, кодирующего ТАКА-амилазу *A. oryzae*, протеиназу аспарагиновой кислоты *Rhizomucor miehei*, нейтральную альфа-амилазу *A. niger*, кислотоустойчивую альфа-амилазу *A. niger*, липазу *Rhizomucor miehei*, щелочную протеазу *A. oryzae*, триозо-фосфатизомеразу *A. oryzae* или

ацетамидазу *A. nidulans*.

Экспрессирующий вектор данного изобретения может также содержать подходящий терминатор транскрипции и, в эукариотах, последовательности полиаденилирования, функционально связанные с последовательностью ДНК, кодирующей вариант альфа-амилазы данного изобретения. Последовательности терминации и полиаденилирования могут быть подходящим образом получены из тех же самых источников, что и промотор.

Вектор может дополнительно содержать последовательность ДНК, позволяющую вектору реплицироваться в рассматриваемой клетке-хозяине. Примерами такой последовательности являются точки начала репликации плазмид pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 и pIJ702.

Вектор может также содержать селективируемый маркер, например ген, продукт которого восполняет дефект в клетке-хозяине, такой как гены *dal* из *Bacillus subtilis* или *B. licheniformis*, или ген, который придает устойчивость к антибиотику, например устойчивость к ампициллину, канамицину, хлорамфениколу или тетрациклину. Кроме того, вектор может содержать селективируемые маркеры *Aspergillus*, такие как *amdS*, *argB*, *niaD* и *sC*, маркер, сообщаящий устойчивость к гигромицину, или отбор может быть выполнен с использованием котрансформации, например, как описано в WO 91/17243.

Хотя внутриклеточная экспрессия может быть выгодной в некоторых отношениях, например при использовании некоторых бактерий в качестве клеток-хозяев, обычно предпочтительно, чтобы эта экспрессия была внеклеточной. Обычно альфа-амилазы *Bacillus*, указанные здесь, содержат пре-район, делающий возможной секрецию экспрессируемой протеазы в культуральную среду. Если желательно, этот пре-район может быть заменен отличающимся пре-районом или сигнальной последовательностью, что удобно выполняется заменой последовательностей ДНК, кодирующих соответствующие пре-районы.

Процедуры, используемые для лигирования конструкции ДНК данного изобретения, кодирующей вариант альфа-амилазы, промотор, терминатор и другие элементы соответственно, и для инсертирования их в подходящие векторы, содержащие информацию, необходимую для репликации, хорошо известны специалистам в данной области (см., например, Sambrook et al., (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989).

Клетку данного изобретения, содержащую либо конструкцию ДНК, либо экспрессирующий вектор данного изобретения, определенные здесь, выгодно используют в качестве клетки-хозяина в рекомбинантном получении варианта альфа-амилазы данного изобретения. Эта клетка может быть легко трансформирована конструкцией ДНК данного изобретения, кодирующей этот вариант, путем интеграции этой конструкции ДНК (в виде одной или более копий) в хромосому хозяина. Обычно считается, что эта интеграция является выгодной, так как эта последовательность

ДНК с большей вероятностью стабильно сохраняется в клетке. Интеграция конструкций ДНК в хромосому хозяина может выполняться в соответствии с общепринятыми способами, например гомологичной или гетерологичной рекомбинацией. Альтернативно, клетка может быть трансформирована экспрессирующим вектором, как описано выше, в связи с различными типами клеток-хозяев.

Клетка данного изобретения может быть клеткой высшего организма, такого как млекопитающее или насекомое, но предпочтительно она является микробной клеткой, например бактериальной или грибковой (в том числе дрожжевой) клеткой.

Примерами подходящих бактерий являются грамположительные бактерии, такие как *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces lividans* или *Streptomyces murinus*, и грамотрицательные бактерии, такие как *E. coli*. Трансформация бактерий может выполняться, например, трансформацией протопластов или с использованием компетентных клеток известным *per se* способом.

Дрожжевой организм может быть предпочтительно выбран из видов *Saccharomyces* или *Schizosaccharomyces*, например *Saccharomyces cerevisiae*. Нитевидный гриб может предпочтительно принадлежать к видам *Aspergillus*, например *Aspergillus oryzae* или *Aspergillus niger*. Грибковые клетки могут быть трансформированы способом, включающим в себя образование протопластов и трансформацию этих протопластов с последующей регенерацией клеточной стенки известным *per se* образом. Подходящая процедура для трансформации клеток-хозяев *Aspergillus* описана в EP 238023.

Еще в одном аспекте данное изобретение относится к способу получения варианта альфа-амилазы данного изобретения, предусматривающему культивирование клетки-хозяина, описанной выше, в условиях, способствующих образованию этого варианта, и извлечение этого варианта из клеток и/или культуральной среды.

Среда, используемая для культивирования клеток, может быть любой общепринятой средой, пригодной для выращивания рассматриваемой клетки-хозяина и получения экспрессии варианта альфа-амилазы данного изобретения. Подходящие среды доступны от коммерческих поставщиков или могут быть приготовлены в соответствии с опубликованными руководствами (например, как описано в каталогах Американской Коллекции Типовых Культур).

Вариант альфа-амилазы, секретируемый из клеток-хозяев, может быть извлечен из культуральной среды хорошо известными процедурами, в том числе отделением клеток от среды центрифугированием или фильтрованием и осаждением белковых компонентов среды высаливанием, например, при помощи сульфата аммония, с последующим применением

хроматографических процедур, таких как ионообменная хроматография, аффинная хроматография или т.п.

Промышленная применимость

Варианты альфа-амилазы данного изобретения обладают ценными свойствами, позволяющими разнообразными промышленными применениями. В частности, варианты фермента данного изобретения применимы в качестве компонента в моющих композициях для стирки, мытья посуды и чистки твердых поверхностей. Многочисленные варианты применимы, в частности, в производстве подсластителей и этанола, например топливного, питьевого или промышленного этанола, из крахмала, и для расщипки текстильных изделий. Условия для общепринятых процессов превращения крахмала, в том числе процессов разжижения крахмала и/или осахаривания крахмала, описаны, например, в патенте США 3912590 и в патентных публикациях EP с номерами 252730 и 63909.

Получение подсластителей из крахмала:

Традиционный способ превращения крахмала во фруктозные сиропы обычно состоит из трех последовательных ферментативных процессов, а именно процесса разжижения с последующими процессом осахаривания и процессом изомеризации. Во время процесса разжижения крахмал деградируется до декстринов альфа-амилазой (например, Термамил[™]) при величинах pH между 5,5 и 6,2 и при температурах 95-160° C в течение периода приблизительно 2 часов. Для обеспечения оптимальной стабильности фермента при этих условиях добавляют 1 мМ кальций (40 м.д. свободных ионов кальция).

После процесса разжижения декстрины превращают в декстрозу добавлением глюкоамилазы (например, AMG[™]) и деветвящего фермента, такого как изоамилаза или пуллулаза (например, Промозим[™]). Перед этой стадией pH снижают до величины менее 4,5, поддерживая высокую температуру (выше 95° C), и разжижающая альфа-амилазная активность денатурируется. Температуру понижают до 60° C и добавляют глюкоамилазу и деветвящий фермент. Процесс осахаривания протекает в течение 24-72 час.

После процесса осахаривания pH увеличивают до величины в диапазоне 6-8, предпочтительно 7,5, и кальций удаляют посредством ионообмена. Затем декстрозный сироп превращают во фруктозный сироп с использованием, например, иммобилизованной глюкоизомеразы (такой как Sweetzyme[™]).

Можно представить себе по меньшей мере одно ферментативное усовершенствование этого процесса: уменьшение зависимости от кальция разжижающей альфа-амилазы. Добавление свободного кальция требуется для гарантии адекватной высокой стабильности альфа-амилазы, но свободный кальций сильно ингибирует активность глюкоизомеразы и требует удаления с использованием операции дорогостоящего узла до такой степени, которая снижает свободный кальций до менее 3-5 м.д. Экономия могла бы быть получена, если можно было бы избежать такой операции и

процесс разжижения мог бы выполняться без добавления свободных ионов кальция.

Для достижения этого требуется менее кальций-зависимая Термамил-подобная альфа-амилаза, которая является стабильной и высокоактивной при низких концентрациях свободного кальция (<40 м.д.). Такая Термамил-подобная альфа-амилаза должна иметь оптимум pH при pH в диапазоне 4,5-6,5, предпочтительно в диапазоне 4,5-5,5.

Данное изобретение относится также к композиции, содержащей смесь одного или нескольких вариантов данного изобретения, происходящих из (в качестве исходной Термамил-подобной альфа-амилазы) альфа-амилазы *B. stearothermophilus*, имеющей последовательность, показанную в SEQ ID NO:8, и Термамил-подобной альфа-амилазы, происходящей из альфа-амилазы *B. licheniformis*, имеющей последовательность, показанную в SEQ ID NO:4.

Далее, данное изобретение относится также к композиции, содержащей смесь одного или нескольких вариантов данного изобретения, происходящих из (в качестве исходной Термамил-подобной

альфа-амилазы) альфа-амилазы *B. stearothermophilus*, имеющей последовательность, показанную в SEQ ID NO:8, и гибридной альфа-амилазы, включающей в себя часть альфа-амилазы *B. amyloliquefaciens*, показанной в SEQ ID NO:6, и часть альфа-амилазы *B. licheniformis*, показанной в SEQ ID NO:4. Последняя

указанная гибридная Термамил-подобная альфа-амилаза содержит 445 C-концевых аминокислотных остатков альфа-амилазы *B. licheniformis*, показанной в SEQ ID NO: 4, и 37 N-концевых аминокислотных остатков альфа-амилазы, происходящей из *B. amyloliquefaciens*, показанной в SEQ ID NO:6. Указанная последняя гибридная альфа-амилаза может предпочтительно

содержать следующие мутации: H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S (с использованием нумерации SEQ ID NO:4). Предпочтительно, указанная последняя гибридная альфа-амилаза может предпочтительно

содержать следующие мутации: H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+I201F (с использованием нумерации SEQ ID NO:4). В примерах ниже указанную последнюю гибридную Термамил-подобную альфа-амилазу, называемую LE429 (показанную в SEQ ID NO:2), используют для получения вариантов данного изобретения, которые могут быть использованы в композициях данного изобретения.

Вариант альфа-амилазы данного изобретения или композиция данного изобретения могут быть в аспекте данного изобретения использованы для разжижения крахмала, в детергентных композициях, таких как композиции для стирки, мытья посуды и чистки твердых поверхностей, для производства этанола, такого как топливный, питьевой и промышленный этанол, расщипки текстильных изделий, ткани и одежды.

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ

Ферменты:

LE174: гибридный вариант альфа-амилазы:

LE174 представляет собой гибридную Термамил-подобную альфа-амилазу, идентичную последовательности Термамила, т.е. альфа-амилазы *B. licheniformis*, показанной в SEQ ID NO:4, за исключением того, что 35 N-концевых аминокислотных остатков (зрелого белка) были заменены 33 N-концевыми остатками BAN (зрелого белка), т.е. альфа-амилазы *B. amyloliquefaciens*, показанной в SEQ ID NO:6, которая дополнительно имеет следующие мутации: H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S (SEQ ID NO:4). LE429: гибридный вариант альфа-амилазы:

LE429 представляет собой гибридную Термамил-подобную альфа-амилазу, идентичную последовательности Термамила, т.е. альфа-амилазы *B. licheniformis*, показанной в SEQ ID NO:4, за исключением того, что 35 N-концевых аминокислотных остатков (зрелого белка) были заменены 33 N-концевыми остатками BAN (зрелого белка), т.е. альфа-амилазы *B. amyloliquefaciens*, показанной в SEQ ID NO:6, которая дополнительно имеет следующие мутации: H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+I201F (SEQ ID NO:4). LE429 показана как SEQ ID NO:2 и была сконструирована с использованием SOE-PCR (Higuchi et al. 1988, Nucleic Acids Research 16:7351).

Декстрозим™ E: сбалансированная смесь глюкоамилазы (AMG) и пуллулаказы, полученная из выбранных штаммов *Aspergillus niger* и *Bacillus deramificans* (доступных из Novo Nordisk A/S).

Ферментация и очистка вариантов альфа-амилазы

Штамм *B. subtilis*, несущий релевантную экспрессирующую плазмиду, высевают штрихом на чашку с LB-агаром с 10 мкг/мл канамицина из исходного раствора, хранящегося при -80 ° C, и выращивают в течение ночи при 37° C.

Колонии переносят в 100 мл среды BPX, дополненной 10 мкг/мл канамицина, в колбе для встряхивания на 500 мл. Состав среды BPX, г/л:

Картофельный крахмал 100
Ячменная мука 50
BAN 5000 SKB 0,1
Казеинат натрия 10
Соевая мука 20
NaH₂PO₄ 12 H₂O 9
Плуроник™ 0,1

Культуру встряхивают при 37° C при 270 об/мин в течение 5 дней.

Клетки и клеточный дебрис удаляют из ферментационного бульона центрифугированием при 4500 об/мин в течение 20-25 мин. После этого супернатант фильтруют с получением полностью прозрачного раствора. Фильтрат концентрируют и промывают на УФ-фильтре (мембране с отсечением 10000) и буфер заменяют на 20 мМ ацетат pH 5,5. УФ-фильтрат наносят на S-сефарозу F.F. и элюцию проводят ступенчатой элюцией 0,2 М NaCl в том же самом буфере. Элюат диализуют против 10 мМ Трис, pH 9,0 и наносят на Q-сефарозу F.F. и элюируют линейным градиентом 0-0,3 М NaCl на протяжении протекания 6 колоночных объемов. Фракции, которые содержат активность (измеренную при помощи анализа Phadebas), объединяют, pH доводят до pH 7,5

и остаточную окраску удаляют обработкой 0,5% мас./об. активированным углем в течение 5 минут.

Определение активности - (KNU)

Одной альфа-амилазной килоединицей (1 KNU) является количество фермента, которое разрушает 5,26 г крахмала (Merck, Amylum Solubile, Erg. B 6, Batch 9947275) в час в стандартном способе Novo Nordisk для определения альфа-амилазы, основанном на следующих условиях:

Субстрат растворимый крахмал

Содержание кальция в растворителе, М 0,0043

Время реакции, мин 7-20

Температура, ° C 37

pH 5,6

Подробное описание аналитического способа Novo Nordisk (AF 9) доступно по запросу.

Анализ на альфа-амилазную активность

Альфа-амилазную активность определяют по способу с использованием таблеток Phadebas® в качестве субстрата. Таблетки Phadebas (Амилазный тест Phadebas®, поставляемый Pharmacia Diagnostic) содержат сшитый нерастворимый полимер крахмала синего цвета, который был смешан с бычьим сывороточным альбумином и буферным веществом и таблетирован.

Для каждого отдельного измерения одну таблетку суспендируют в пробирке, содержащей 5 мл 50 мМ буфера Бриттона-Робинсона (50 мМ уксусная кислота, 50 мМ фосфорная кислота, 50 мМ борная кислота, 0,1 мМ CaCl₂, pH, доведенный до нужной величины при помощи NaOH). Тест проводят в водяной бане при представляющей интерес температуре. Тестируемую альфа-амилазу разбавляют в × мл 50 мМ буфера Бриттона-Робинсона. 1 мл этого раствора альфа-амилазы добавляют в 5 мл 50 мМ буфера Бриттона-Робинсона. Крахмал гидролизует альфа-амилазой с образованием растворимых синих фрагментов. Поглощение полученного синего раствора, измеренное спектрофотометрически при 620 нм, является функцией альфа-амилазной активности.

Важно, чтобы измеренное поглощение при 620 нм после 10 или 15 минут инкубации (времени тестирования) находилось в диапазоне 0,2-2,0 единиц поглощения при 620 нм. В этом диапазоне абсорбции существует линейность между активностью и абсорбцией (закон Ламберта-Бееера). Таким образом, разбавление фермента должно быть скорректировано для удовлетворения этого критерия. При указанном наборе условий (температуре, pH, времени реакции, буферных условиях) 1 мг конкретной альфа-амилазы будет гидролизовать определенное количество субстрата и будет образовываться синяя окраска. Интенсивность окраски измеряют при 620 нм. Измеренная абсорбция прямо пропорциональна удельной активности (активность/мг белка чистой альфа-амилазы) рассматриваемой альфа-амилазы при данном конкретном наборе условий.

Определение удельной активности

Удельную активность определяют с использованием теста Phadebas (Pharmacia) в виде активности/мг фермента.

Измерение pH-профиля активности

(рН-стабильности)

Вариант альфа-амилазы хранят в 20 мМ Трисе рН 7,5, 0,1 М CaCl₂ и тестируют при 30 ° С, 50 мМ буфера Бриттона-Робинсона, 0,1 мМ CaCl₂. Активность измеряют при рН 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 9,5, 10 и 10,5 с использованием анализа Phadebas, описанного выше.

Определение активности AGU и AGU/мг

Одна амилоглюкозидазная единица Novo (AGU) определяется как количество фермента, которое гидролизует 1 микроль мальтозы в минуту при 37° С и рН 4,3. Подробное описание этого аналитического способа можно получить по запросу из Novo Nordisk.

Активность определяют в виде AGU/мл по способу, модифицированному по (AEL-SM-0131), с использованием набора Glucose GOD-Perid Kit из Boehringer Mannheim, 124036. Стандарт: AMG-стандарт, партия 7-1195, 195 AGU/мл.

375 мкл субстрата (1% мальтозы в 50 мМ ацетате натрия, рН 4,3) инкубируют 5 минут при 37° С. Добавляют 25 мкл фермента, разбавленного в ацетате натрия. Реакцию останавливают после 10 минут добавлением 100 мкл 0,25 М NaOH. 20 мкл переносят в 96-луночный микротитрационный планшет и добавляют 200 мкл раствора GOD-Perid. После 30 минут при комнатной температуре поглощение измеряют при 650 нм и активность рассчитывают в AGU/мл на основании AMG-стандарта.

Затем рассчитывают удельную активность в AGU/мг из активности (AGU/мл), деленной на концентрацию белка (мг/мл).

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

Конструирование вариантов Термамила в соответствии с данным изобретением

Термамил (альфа-амилазу *B. licheniformis* SEQ ID NO:4) экспрессируют в *B. subtilis* из плазмиды, названной рDN1528. Эта плазида содержит полный ген, кодирующий Термамил, amyL, экспрессия которого направляется его собственным промотором. Далее, эта плазида содержит точку начала репликации, ori, из плазмиды pUB110 и ген cat из плазмиды pC194, придающий устойчивость к хлорамфениколу. рDN1528 показана на фиг.9 WO 96/23874. Получали вектор специфического мутагенеза, содержащий основную часть кодирующей области SEQ ID NO:3. Важные признаки этого вектора, названного рJeEN1, включают в себя начало репликации, происходящее из плазмид pUC, ген cat, придающий устойчивость к хлорамфениколу, и содержащую сдвиг рамки версию гена bla, дикий тип которого обычно придает устойчивость к ампициллину (фенотип amp^R). Эта мутированная версия приводит к фенотипу amp^S. Плазида рJeEN1 показана на фиг.10 WO 96/23874, и на этой плазмиде показаны начало репликации *E. coli*, ori, bla, cat, 5'-укороченная версия гена Термамил-амилазы и сайты рестрикции.

Мутации вводят в amyL по способу, описанному Deng and Nickoloff (1992, Anal. Biochem. 200, pp. 81-88), за исключением того, что плазмиды с включенным "праймером отбора" (праймером № 6616; см. ниже) выбраны на основе фенотипа amp^R трансформированных клеток *E. coli*,

несущих плазмиду с репарированным геном bla, вместо применения отбора расщеплением рестриктазами, описанного Deng and Nickoloff. Химикалии и ферменты, используемые для мутагенеза, получали из набора для мутагенеза Chameleon[®] из Stratagene (номер по каталогу 200509).

После подтверждения последовательности ДНК в плазмидах с вариантом укороченный ген, содержащий желательное изменение, субклонировали в рDN1528 в виде PstI-EcoRI-фрагмента и им трансформировали дефицитный по протеазе и амилазе штамм *Bacillus subtilis* SHA273 (описанный в WO 92/11357 и WO 95/10603) для экспрессии вариантного фермента.

Вариант V54W Термамила конструировали с использованием следующего мутагенного праймера (написанного 5'-3', слева направо):
PG GTC GTA GGC ACC GTA GCC CCA ATC CGC TTG (SEQ ID NO:9)

Вариант Термамила A52W+V54W конструировали с использованием следующего мутагенного праймера (написанного 5'-3', слева направо):

PG GTC GTA GGC ACC GTA GCC CCA ATC CCA TTG GCT CG (SEQ ID NO:10)

Праймер № 6616 (написанный 5'-3', слева направо); Р обозначает 5'-фосфат:

P CTG TGA CTG GTG AGT ACT CAA CCA AGT C (SEQ ID NO:11)

Вариант Термамила V54E конструировали с использованием следующего мутагенного праймера (написанного 5'-3', слева направо):

PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCC TCA TCC GCT TG (SEQ ID NO:12)

Вариант Термамила V54M конструировали с использованием следующего мутагенного праймера (написанного 5'-3', слева направо):

PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCC ATA TCC GCT TG (SEQ ID NO:13)

Вариант Термамила V54I конструировали с использованием следующего мутагенного праймера (написанного 5'-3', слева направо):

PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCA ATA TCC GCT TG (SEQ ID NO:14)

Варианты Термамила Y290E и Y290K конструировали с использованием следующего мутагенного праймера (написанного 5'-3', слева направо):

PGC AGC ATG GAA CTG CTY ATG AAG AGG CAC GTC AAA C (SEQ ID NO:15)

Y обозначает равную смесь C и T. Присутствие кодона, кодирующего глутамат или лизин в положении 290, подтверждали секвенированием ДНК.

Вариант Термамила N190F конструировали с использованием следующего мутагенного праймера (написанного 5'-3', слева направо):

PCA TAG TTG CCG AAT TCA TTG GAA ACT TCC C (SEQ ID NO:16)

Вариант Термамила N188P+N190F конструировали с использованием следующего мутагенного праймера (написанного 5'-3', слева направо):

PCA TAG TTG CCG AAT TCA GGG GAA ACT TCC CAA TC (SEQ ID NO:17)

Вариант Термамила H140K+H142D конструировали с использованием следующего мутагенного праймера (написанного 5'-3', слева направо):

PCC GCG CCC CGG GAA ATC AAA TTT TGT CCA CGC TTT AAT TAG (SEQ ID NO:18)

Вариант Термамила H156Y

конструировали с использованием следующего мутагенного праймера (написанного 5'-3', слева направо):

PCA AAA TGG TAC CAA TAC CAC TTA AAA TCG CTG (SEQ ID NO:19)

Вариант Термамила A181T конструировали с использованием следующего мутагенного праймера (написанного 5'-3', слева направо):

PCT TCC CAA TCC CAA GTC TTC CCT TGA AAC (SEQ ID NO:20)

Вариант Термамила A209V конструировали с использованием следующего мутагенного праймера (написанного 5'-3', слева направо):

PCTT AAT TTC TGC TAC GAC GTC AGG ATG GTC ATA ATC (SEQ ID NO:21);

Вариант Термамила Q264S конструировали с использованием следующего мутагенного праймера (написанного 5'-3', слева направо):

PCG CCC AAG TCA TTC GAC CAG TAC TCA GCT ACC GTA AAC (SEQ ID NO:22)

Вариант Термамила S187D конструировали с использованием следующего мутагенного праймера (написанного 5'-3', слева направо):

PGC CGT TTT CAT TGT CGA CTT CCC AAT CCC (SEQ ID NO:23)

Вариант Термамила DELTA(K370-G371-D372) (т.е. делетированные аминокислотные остатки с номерами 370, 371 и 372) конструировали с использованием следующего мутагенного праймера (написанного 5'-3', слева направо):

PGG AAT TTC GCG CTG ACT AGT CCC GTA CAT ATC CCC (SEQ ID NO:24)

Вариант Термамила DELTA(D372-S373-Q374) конструировали с использованием следующего мутагенного праймера (написанного 5'-3', слева направо):

PGG CAG GAA TTT CGC GAC CTT TCG TCC CGT ACA TAT C (SEQ ID NO:25)

Варианты термамила A181T и A209V объединяли с A181T+A209V расщеплением A181T-содержащей рDN1528-подобной плазмиды (т.е. рDN1528, содержащей в гене *amyL* мутацию, приводящую к изменению A181T) и A209V-содержащей рDN1528-подобной плазмиды (т.е. рDN1528, содержащей в гене *amyL* мутацию, приводящую к изменению A209V) рестриктазой *Clal*, которая разрезает рDN1528-подобные плазмиды дважды, приводя к образованию фрагмента длиной 1116 п.н. и векторной части (т.е. содержит точку начала репликации плазмиды) длиной 3850 п.н. Фрагмент, содержащий мутацию A209V, и векторную часть, содержащую мутацию A181T, очищали с использованием набора для экстракции гелей QIAquick (купленного в QIAGEN) после разделения на агарозном геле. Этот фрагмент и вектор лигировали и им трансформировали дефицитный по протеазе и амилазе штамм *Bacillus subtilis*, указанный выше. Плазмиду из *amy+* (просветленные зоны на содержащих крахмал чашках с агаром) и устойчивые к хлорамфениколу трансформанты анализировали на присутствие обеих мутаций на плазмиде.

Подобно описанному выше, объединяли H156Y и A209V с использованием рестриктаз *Acc651* и *EcoRI* с получением H156Y+A209V.

H156Y+A209V и A181T+A209V

объединяли в H156Y+A181T+A209V с использованием рестриктаз *Acc651* и *HindIII*.

35 N-концевых остатков зрелой части варианта Термамила H156Y+A181T+A209V заменяли 33 N-концевыми остатками альфа-амилазы *B. amyloliquefaciens* (SEQ ID NO:4) (которую в данном контексте называют BAN) с использованием методики SOE-PCR (Higuchi et al. 1988, *Nucleic Acids Research* 16:7351) следующим образом:

Праймер 19364 (последовательность 5'-3'): CCT CAT TCT GCA GCA GCC GTA AAT GGC ACG CTG (SEQ ID NO:26)

Праймер 19362: CCA GAC GGC AGT AAT ACC GAT ATC CGA TAA ATG TTC CG (SEQ ID NO:27)

Праймер 19363: CGG ATA TCG GTA TTA CTG CCG TCT GGA TTC (SEQ ID NO:28)

Праймер 1C: CTC GTC CCA ATC GGT TCC GTC (SEQ ID NO:29)

Стандартную ПЦР, полимеразную цепную реакцию, проводили с использованием термостабильной полимеразы Pwo из Boehringer Mannheim в соответствии с инструкциями изготовителя и с температурным циклом: 5 мин при 94° C, 25 циклов (94° C в течение 30 сек, 50° C в течение 45 сек, 72° C в течение 1 мин), 72° C в течение 10 мин.

Фрагмент длиной приблизительно 130 п.н. амплифицировали в первой ПЦР, обозначаемой ПЦР1, с праймерами 19364 и 19362 на ДНК-фрагменте, содержащем ген, кодирующий альфа-амилазу *B. amyloliquefaciens*.

Фрагмент длиной приблизительно 400 п.н. амплифицировали в другой ПЦР, обозначаемой ПЦР2, с праймерами 19363 и 1C на матрице рDN1528.

Продукты ПЦР1 и ПЦР2 выделяли из агарозного геля и использовали в качестве матриц в ПЦР3 с праймерами 19364 и 1C, что приводило к фрагменту длиной приблизительно 520 п.н. Таким образом, этот фрагмент содержал одну часть ДНК, кодирующей N-конец из BAN, слитый с частью ДНК, кодирующей Термамил, от 35-ой аминокислоты.

Фрагмент длиной 520 п.н. субклонировали в рDN1528-подобную плазмиду (содержащую ген, кодирующий вариант Термамила H156Y+A181T+A209V) расщеплением рестриктазами *PstI* и *SacII*, лигированием и трансформацией штамма *B. subtilis*, как описано ранее. Последовательность ДНК между сайтами рестрикции *PstI* и *SacII* проверяли ДНК-секвенированием в экстрагированных плаزمидках из *amy+* и устойчивых к хлорамфениколу трансформантов.

Конечная конструкция, содержащая правильный N-конец из BAN и H156Y+A181T+A209V, была названа BAN(1-35)+H156Y+A181T+A209V.

N190F объединяли с BAN(1-35)+H156Y+A181T+A209V с получением

BAN(1-35)+H156Y+A181T+N190F+A209V проведением мутагенеза, как описано выше, за исключением того, что последовательность *amyL* в *rJeENI* заменяли последовательностью ДНК, кодирующей вариант Термамила

BAN(1-35)+H156Y+A181T+A209V.

Q264S объединяли с

BAN(1-35)+H156Y+A181T+A209V с получением BAN(1-35)+H156Y+A181T+A209V+Q264S проведением мутагенеза, как описано выше, за исключением того, что последовательность amyL в pJeEN1 заменяли последовательностью ДНК, кодирующей вариант Термамила BAN(1-35)+H156Y+A181T+A209V.

BAN(1-35)+H156Y+A181T+A209V+Q264S и BAN(1-35)+H156Y+A181T+N190F+A209V объединяли в BAN(1-35)+H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S с использованием рестриктаз BsaHI (BsaHI-сайт вводили вблизи от мутации A209V) и PstI.

I201F объединяли с BAN(1-35)+H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S с получением BAN(1-35)+H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+I201F (SEQ ID NO:2) проведением мутагенеза, как описано выше. Использовали праймер мутагенеза AM100, вводили замену I201F и удаляли одновременно сайт рестрикции ClaI, что облегчает легкое получение точковых мутантов.

Праймер AM100:
5' GATGTATGCCGACTTCGATTATGACC 3' (SEQ ID NO:30)

ПРИМЕР 2

Конструирование вариантов Термамил-подобной альфа-амилазы с измененным характером расщепления в соответствии с данным изобретением

Вариант термостабильной альфа-амилазы B. licheniformis, содержащий 445 С-концевых аминокислотных остатков альфа-амилазы B. licheniformis, показанной в SEQ ID NO:4, и 37 N-концевых аминокислотных остатков альфа-амилазы, происходящей из B. amyloliquefaciens, показанной в SEQ ID NO:6, и дополнительно содержащий следующие мутации: H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+I201F (конструирование этого варианта описано в примере 1, а аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO:2), имел пониженную способность расщепления субстрата вблизи точки ветвления.

В попытке дальнейшего улучшения пониженной способности расщепления субстрата вблизи точки ветвления указанного варианта альфа-амилазы проводили сайт-направленный мутагенез с использованием Мега-праймерного способа, описанного Sarkar and Sommer, 1990 (BioTechniques 8:404-407):

Конструирование LE313: BAN/Термамил гибрид+H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+V54N:

Ген-специфический праймер 27274 и мутагенный праймер AM115 используют для амплификации при помощи ПЦР ДНК-фрагмента длиной приблизительно 440 п.н. из rDN1528-подобной плазмиды (несущей мутации BAN(1-35)+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S в гене, кодирующем амилазу, из SEQ ID NO:4).

Фрагмент длиной 440 п.н. выделяют из агарозного геля и используют в качестве Мега-праймера вместе с праймером 113711 во второй ПЦР, проводимой на той же самой матрице.

Полученный фрагмент длиной

приблизительно 630 п.н. расщепляют рестриктазами EcoRI и Ase651 и полученный ДНК-фрагмент длиной приблизительно 370 п.н. очищают и лигируют с rDN1528-подобной плазмидой, расщепленной теми же самыми ферментами. Компетентные клетки Bacillus subtilis SHA273 (с низким содержанием амилазы и протеазы) трансформируют с лигированием и устойчивые к хлорамфениколу трансформанты проверяют ДНК-секвенированием для подтверждения присутствия правильных мутаций на плазмиде.

Праймер 27274:

5'
CATAGTTGCCGAATTCATTGGAACTTCCC 3' (SEQ ID NO:31)

Праймер 1B:

5' CCGATTGCTGACGCTGTTATTTGC 3' (SEQ ID NO:32)

Праймер AM115:

5' GCCAAGCGGATAACGGCTACGGTGC 3' (SEQ ID NO:33)

Конструирование LE314: BAN/Термамил гибрид+H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+A52S проводят сходным образом, за исключением того, что используют мутагенный праймер AM116.

AM116:

5'
GAACGAGCCAATCGGACGTGGGCTACGG 3' (SEQ ID NO:34)

Конструирование LE315: BAN/Термамил гибрид+H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+A52S+V54N проводят сходным образом, за исключением того, что используют мутагенный праймер AM117.

AM117:

5'
GGAACGAGCCAATCGGATAACGGCTACGGTGC 3' (SEQ ID NO:35)

Конструирование LE316: BAN/Термамил гибрид+H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+T49L проводят сходным образом, за исключением того, что используют мутагенный праймер AM118.

AM118:

5' GCATATAAGGGACTGAGCCAAGCGG 3' (SEQ ID NO:36)

Конструирование LE317: BAN/Термамил гибрид+H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+T49L+G107A проводят сходным образом, за исключением того, что используют одновременно мутагенный праймер AM118 и мутагенный праймер AM119.

AM119:

5' CAACCACAAAGCCGGCGCTGATGCG 3' (SEQ ID NO:37)

Конструирование LE318: BAN/Термамил гибрид+H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+A52S+V54N+T49L+G107A проводят сходным образом, за исключением того, что используют одновременно мутагенный праймер AM120 и мутагенный праймер AM119.

AM120:

5'
GCATATAAGGGACTGAGCCAATCGGATAACGGCTACGGTGC 3' (SEQ ID NO:38)

Конструирование LE319: BAN/Термамил гибрид+H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+A52S+V54N+T49L проводят сходным образом, за исключением того, что используют мутагенный праймер AM120.

Конструирование LE320: BAN/Термамил гибрид+H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+G107A проводят сходным образом, за исключением того, что используют мутагенный праймер AM119.

Конструирование LE322: BAN/Термамил гибрид+H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+Q51R+A52S проводят сходным образом, за исключением того, что используют мутагенный праймер AM121.

AM121:

5'

GAACGAGCCGATCGGACGTGGGCTACGG 3' (SEQ ID NO:39)

Конструирование LE323: BAN/Термамил гибрид+H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+A52N проводят сходным образом, за исключением того, что используют мутагенный праймер AM122.

AM122:

5'

GAACGAGCCAAAACGACGTGGGCTACGG 3' (SEQ ID NO:40)

ПРИМЕР 3

Испытание вариантов LE429 (осахаривание)

Использовали следующие стандартные условия реакции:

Концентрация субстрата 30% мас./мас.

Температура 60° C

Исходный pH (при 60° C) 5,5

Доза фермента

Глюкоамилаза 0,18 AGU/г DS

Пуллуланаза 0,06 PUN/г DS

Альфа-амилаза 10 мкг фермента/г DS

Декстрозим™ использовали для обеспечения глюкоамилазной и пуллулазной активностей.

Субстраты для осахаривания готовили растворением обычного кукурузного крахмала в деионизованной воде и доведением сухого вещества до приблизительно 30% мас./мас. pH доводили до 5,5 (измеряли при 60° C) и аликвоты субстрата, соответствующие 10 г сухого веса, переносили в стеклянные колбы с синими крышками.

Затем эти колбы помещали во встряхивающую водяную баню, уравновешенную при 60° C, и добавляли ферменты. Если необходимо, pH повторно доводили до 5,5. Пробы брали после 48 часов осахаривания; pH доводили до приблизительно 3,0 и затем нагревали в кипящей водяной бане в течение 15 минут для инактивации ферментов. После охлаждения пробы обрабатывали приблизительно 0,1 г смешанного слоя ионообменной смолы (BIO-RAD 501 X8 (D)) в течение 30 минут на ротационной мешалке для удаления солей и растворимого N. После фильтрования углеводный состав определяли при помощи ВЭЖХ. Получали следующие результаты:

Исходной альфа-амилазой для этих вариантов является LE429 (табл. 1).

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

Таблица 1

Добавленные варианты альфа-амилазы	DP ₁	DP ₂	DP ₃	Удельная активность (AGU/мг) 8200
V54N	96,1	1,75	1,18	
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	1,83	1,04	19600
Q51R+A52S	95,9	1,77	1,27	16500
A52N	95,5	1,99	1,56	17600
T5174 (контроль)	95,8/ 95,8	1,87/ 1,83	1,17/ 1,35	16000

В сравнении с контролем присутствие активного варианта альфа-амилазы данного изобретения во время разжижения приводит к уменьшенному содержанию панозы (DP₃).

Особенно вариант T49L+G107A LE429 и вариант A52S+V54N+T49L LE429 соответственно приводят к очень сильно уменьшенному содержанию панозы (DP₃). Если эти варианты альфа-амилазы используются для разжижения крахмала, исчезнет необходимость в инактивации этого фермента перед началом осахаривания.

ПРИМЕР 4

Разжижение и осахаривание с использованием вариантов LE429

Эксперимент примера 3 повторяли для ряда других вариантов LE429 при тех же самых условиях.

Результат показан в табл.2.

Таблица 2

Вариант/характеристика сахара	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%

ПРИМЕР 5

Эксперимент в примере 3 повторяли для ряда вариантов LE429, за исключением того, что разжижение проводили при 95° C, pH 6,0, а осахаривание при 60° C, pH 4,5, 40 м.д. CaCl₂, с последующей инактивацией. Этот вариант называют ниже вариантом LE429. Были получены следующие результаты (табл.3).

Таблица 3

Вариант/характеристика сахара	DP4+	DP3	DP2	DP1
T49?	1,15	0,92	1,33	96,12
T49D+G107A	0,84	1,03	1,82	96,3
T49L+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	1,83	96,01
T49L+A52T+G107A	0,97	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	95,97

Список последовательностей приведен в

конце описания.

Источники информации

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

Mizuno, H., et al., *J. Mol. Biol.* (1993) 234, 1282-1283.

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, Ph.D. Thesis: "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, Vol.1, No. 5-6. p. B.Diderichsen and L.Christiansen, Cloning of a maltogenic amylase from *Bacillus stearothermophilus*, *FEMS Microbiol. letters*: 56: pp.53-60 (1988).

Hudson et al., *Practical Immunology*, Third edition (1989), Blackwell Scientific Publications.

Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989.

S.L.Beaucage and M.H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22, 1981, pp. 1859-1869.

Matthes et al., *The EMBO J.* 3, 1984, pp. 801-805.

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

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

Nelson and Long, *Analytical Biochemistry* 180, 1989, pp.147-151.

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

R.Higuchi, B.Krummel, and 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, pp. 209-221.

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

S.D.Erlich, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, pp.1680-1682.

Boel et al., 1990, *Biochemistry* 29, pp. 6244-6249.

Sarkar and Sommer, 1990, *BioTechniques* 8, pp. 404-407.

Формула изобретения:

1. Вариант исходной Термамил-подобной альфа-амилазы, содержащий изменение в одном или нескольких положениях, выбранных из группы G48, T49, S50, Q51, A52, D53, V54, G107, G108, A111, H156, S168, A181, N190, M197, I201, A209 и Q264, где (а) указанное(ые) изменение(изменения) представляют собой независимо: (i) инсерцию аминокислоты справа от аминокислоты, которая занимает это положение; (ii) делецию аминокислоты, которая занимает это положение, или (iii) замену аминокислоты, которая занимает это положение, отличной аминокислотой, (b) указанный вариант имеет

альфа-амилазную активность, и (с) каждое положение соответствует положению аминокислотной последовательности исходной Термамил-подобной альфа-амилазы, имеющей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

5 2. Вариант по п.1, содержащий мутацию в положении, соответствующем, по меньшей мере, одной из следующих мутаций в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 4: A52S, A52S+V54N, T49L, T49+G107A, A52S+V54N+T49L+G107A, A52S+V54N+T49L, G107A, Q51R, Q51R+A52S, A52N; или 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; или T49V, T49I, T49D, T49N, T49S, T49Y, T49F, T49W, T49M, T49E, T49Q, T49K, T49R, A52T, A52L, A52I, A52V, A52M, G107V, G107I, G107C.

10 15 20 3. Вариант по п.1 или 2, содержащий мутацию в положении, соответствующем, по меньшей мере, одной из следующих мутаций в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 4:

25 G48A, V, S, T, I, L;
*48aD или *48aY (т.е. инсерция D или Y);
T49X;
*49aX (т.е. инсерция любого аминокислотного остатка);

30 S50X, в частности, D, Y, L, T, V, I;
Q51R, K;
A52S, N, T, V;
D53Q, N, S, T, V;
G107X, в частности, G107A, V, S, T, I, L, C;
35 G108X, в частности, G108A, V, S, T, I, L;
A111V, I, L;
S168Y;
M197Y, F, G.

4. Вариант по любому из пп.1-3, содержащий следующие мутации, соответствующие, по меньшей мере, одной из следующих мутаций в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 4: T49X+A52X+V54N//L/Y/F/W+G107A.

5. Вариант по любому из пп.1-4, дополнительно содержащий G108A.

45 6. Вариант по любому из пп.1-5, содержащий следующие мутации, соответствующие, по меньшей мере, одной из следующих мутаций в аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 4:

50 T49L+G107A;
T49I+G107A;
T49L+G107A+V54I;
T49I+G107A+V54I;
A52S+V54N+T49L+G107A;
A52S+V54I+T49L+G 107A;
55 A52S+T49L+G107A;
A52T+T49L+G107A;
A52S+V54N+T49I+G107A;
A52S+V54I+T49I+G107A;
A52S+T49I+G107A;
T49L+G108A;
60 T49I+G108A;
T49L+G108A+V54I;
T49I+G108A+V54I.

7. Вариант по любому из пп.1-6, где указанный вариант имеет пониженную способность расщеплять олигосахаридный субстрат вблизи точки ветвления по

сравнению с исходной альфа-амилазой.
8. Вариант по любому из пп.1-7, который дополнительно проявляет улучшенную субстратную специфичность и/или улучшенную удельную активность по сравнению с исходной Термамил-подобной альфа-амилазой.

9. Вариант по любому из пп.1-8, где исходная альфа-амилаза представляет собой гибридную альфа-амилазу SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 6.

10. Вариант по любому из пп.1-9, где исходная гибридная альфа-амилаза представляет собой гибридную альфа-амилазу, содержащую 445 С-концевых аминокислотных остатков альфа-амилазы *B. licheniformis*, показанных в SEQ ID NO: 4, и 37 N-концевых аминокислотных остатков альфа-амилазы *B. amyloliquefaciens*, показанных в SEQ ID NO: 6.

11. Вариант по любому из пп.1-10, где исходная гибридная Термамил-подобная

альфа-амилаза дополнительно содержит следующие мутации:

H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S (с использованием нумерации SEQ ID NO: 4), или LE174.

5 12. Вариант по любому из пп.1-11, где исходная гибридная Термамил-подобная альфа-амилаза дополнительно содержит следующие мутации:

10 H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+I201F (с использованием нумерации SEQ ID NO: 4), или LE429.

15 13. Вариант по любому из пп.1-12, предназначенный для разжижения крахмала, применения в моющей композиции, такой как композиция для стирки белья, мытья посуды и чистки твердых поверхностей, для производства этанола, такого как производство топливного, питьевого и промышленного этанола, для расклихтовки текстильных изделий, тканей или одежды.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Novo Nordisk A/S

<120>

<130>

<160> 40

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1443

<212> ДНК

<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 cgc 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	

RU 2 2 3 1 5 4 7 C 2

RU 2 2 3 1 5 4 7 C 2

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	576
180 185 190	
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	624
195 200 205	
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	672
210 215 220	
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	720
225 230 235 240	
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	768
245 250 255	
gta gct gag tac tgg tgc 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	816
260 265 270	
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	864
275 280 285	
cag ttc cat gct gca tgc aca cag gga ggc ggc tat gat atg agg aaa Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys	912
290 295 300	
ttg ctg aac ggt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa tcg gtt aca Leu Leu Asn Gly Thr Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser Val Thr	960
305 310 315 320	
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	1008
325 330 335	
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	1056
340 345 350	
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	1104
355 360 365	
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	1152
370 375 380	
atc tta aaa gcg aga 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	1200
385 390 395 400	
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	1248
405 410 415	
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	1296
420 425 430	
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	1344
435 440 445	

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> Бeлoк
 <213> Bacillus amyloliquefaciens

<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

RU 2231547 C2

RU 2231547 C2

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 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> ДНК
 <213> *Bacillus licheniformis*

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

<400> 3
 cggaagattg gaagtacaaa aataagcaaa agattgtcaa tcatgtcatg agccatgcgg 60
 gagacggaaa aatcgtctta atgcacgata tttatgcaac gttcgcagat gctgctgaag 120
 agattattaa aaagctgaaa gcaaaaggct atcaattggg aactgtatct cagcttgaag 180
 aagtgaagaa gcagagaggc tattgaataa atgagtagaa ggcgcataatc ggcgcttttc 240
 ttttggaaga aaatataggg aaaatgggtac ttgttaaaaa ttcggaatat ttatacaaca 300

tcatatgttt cacattgaaa ggggaggaga atcatgaaac aacaaaaacg gctttacgcc 360
cgattgctga cgctgttatt tgcgtcctac ttcttgctgc ctccattctgc 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 Trp 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 aaa 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	1236
Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn	
260 265 270	
tat ttg aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt	1284
Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu	
275 280 285	
cat tat cag ttc cat gct gca tgc aca cag gga ggc ggc tat gat atg	1332
His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met	
290 295 300	
agg aaa ttg ctg aac ggt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa tgc	1380
Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser	
305 310 315 320	
gtt aca ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tgc ctt gag	1428
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu	
325 330 335	
tgc act gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct ttt att ctc	1476
Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu	
340 345 350	
aca agg gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg	1524
Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly	
355 360 365	
acg aaa gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att	1572
Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile	
370 375 380	
gaa ccg atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat	1620
Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His	
385 390 395 400	
gat tat ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac	1668
Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp	
405 410 415	
agc tgc gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc	1716
Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro	
420 425 430	
ggt ggg gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca	1764
Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr	
435 440 445	
tgg cat gac att acc gga aac cgt tgc gag ccg gtt gtc atc aat tgc	1812
Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser	
450 455 460	
gaa ggc tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tgc gtt tca att tat	1860
Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr	
465 470 475 480	
gtt caa aga tag aagagcagag aggacggatt tcctgaagga aatccgtttt	1912
Val Gln Arg	
tttatattt	1920
<210> 4	
<211> 483	
<212> Белок	
<213> Bacillus licheniformis	

RU 2231547 C2

```

<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

```

RU 2231547 C2

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> ДНК
 <213> *Bacillus amyloliquefaciens*

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

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

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

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

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

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

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

<400> 5
 aagcttcaag cgggtcaatcg gaatgtgcat ctcgcttcat acttaggttt tcacccgcat 60
 attaagcagg cggtttttgaa ccgtgtgaca gaagctgttc gaaaccccg cggttcggttt 120

RU 2 2 3 1 5 4 7 C 2

RU 2 2 3 1 5 4 7 C 2

gattttaagg ggggacagta tgctgcctct tcacattaat ctcagcggaa aaagaatcat 180
cattgctggc gggggcaatg ttgcattaag aaggctgaaa cggtgtttcc ggaaggcgct 240
gatattaccg tgatcagtct gagcctgcct gaaattaaaa agctggcgga tgaaggacgc 300
atccgctgga ttccccggag aattgaaatg aaagatctca agcccgtttt ttccattatt 360
gccgcgacaa atgaccgagg cgtgaatcag gagatagccg caaacgcttc tgaaacgcag 420
ctggtcaact gtgtaagcaa ggctgaacaa ggcagcgtat atatgccgaa gatcatccgc 480
aaagggcgca ttcaagtatc agtatcaaca agcggggcaa gccccgcaca tacgaaaaga 540
ctggctgaaa acattgagcc tttgatgact gatgatttgg ctgaagaagt ggatcgattg 600
tttgagaaaa gaagaagacc ataaaaatac cttgtctgtc atcagacagg gtatttttta 660
tgctgtccag actgtccgct gtgtaaaaaa taggaataaa ggggggttgt tattatttta 720
ctgatatgta aaatataatt-tgtataagaa aatgagaggg agaggaaaca tgattcaaaa 780
acgaaagcgg acagtctcgt tcagacttgt gcttatgtgc acgctgttat ttgtcagttt 840
gccgattaca aaaacatcag cc gta aat ggc acg ctg atg cag tat ttt gaa 892
Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu
1 5 10

tgg tat acg ccg aac gac ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat 940
Trp Tyr Thr Pro Asn Asp Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp
15 20 25

gcg gaa cat tta tcg gat atc gga atc act gcc gtc tgg att cct ccc 988
Ala Glu His Leu Ser Asp Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro
30 35 40

gca tac aaa gga ttg agc caa tcc gat aac gga tac gga cct tat gat 1036
Ala Tyr Lys Gly Leu Ser Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp
45 50 55

ttg tat gat tta gga gaa ttc cag caa aaa ggg acg gtc aga acg aaa 1084
Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys
60 65 70

tac ggc aca aaa tca gag ctt caa gat gcg atc ggc tca ctg cat tcc 1132
Tyr Gly Thr Lys Ser Glu Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser
75 80 85 90

cgg aac gtc caa gta tac gga gat gtg gtt ttg aat cat aag gct ggt 1180
Arg Asn Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly
95 100 105

gct gat gca aca gaa gat gta act gcc gtc gaa gtc aat ccg gcc aat 1228
Ala Asp Ala Thr Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn
110 115 120

aga aat cag gaa act tcg gag gaa tat caa atc aaa gcg tgg acg gat 1276
Arg Asn Gln Glu Thr Ser Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp
125 130 135

ttt cgt ttt ccg ggc cgt gga aac acg tac agt gat ttt aaa tgg cat 1324
Phe Arg Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His
140 145 150

tgg tat cat ttc gac gga gcg gac tgg gat gaa tcc ccg aag atc agc 1372
Trp Tyr His Phe Asp Gly Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser
155 160 165 170

RU 2231547 C2

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 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 gcc 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 Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu 430 435 440	2188

RU 2231547 C2

RU 2231547 C2

RU 2231547 C2

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 ggtaataaaa aaacacctcc			2334
Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln Lys			
475	480		
aagctgagtg cgggtatcag cttggagggtg cgtttatttt ttcagccgta tgacaaggtc			2394
ggcatcaggt gtgacaaata cggatatgctg gctgtcatag gtgacaaatc cgggttttgc			2454
ggcgtttggc tttttcacat gtctgatttt tgtataatca acaggcacgg agccggaatc			2514
tttcgccttg gaaaaataag cggcgatcgt agctgcttcc aatatggatt gttcatcggg			2574
atcgtgctt ttaatcaciaa cgtgggatcc			2604
<210> 6			
<211> 483			
<212> Genex			
<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 Thr 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> DHK
 <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 48
Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

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 275 280 285			864
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 290 295 300			912
ttt gat atg cgc 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 305 310 315 320			960
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 325 330 335			1008
gcg ctg cag tca tgg gtc gac cca tgg ttc aaa ccg ttg gct tac gcc Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala 340 345 350			1056
ttt att cta act cgg cag gaa gga tac ccg tgc gtc ttt tat ggt gac Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp 355 360 365			1104
tat tat ggc att cca caa tat aac att cct tcc ctg aaa agc aaa atc Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile 370 375 380			1152
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 385 390 400			1200
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 405 410 415			1248
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 420 425 430			1296
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 435 440 445			1344
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 450 455 460			1392
gat gga tgg ggg gaa ttc aaa gtc aat ggc ggt tcc gtt tcc gtt tgg Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp 465 470 475 480			1440
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 485 490 495			1488
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 500 505 510			1536
gca tgg cct tga Ala Trp Pro 515			1548

<210> 8
 <211> 515
 <212> Genok
 <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

RU 2231547 C2

RU 2231547 C2

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 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> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 9
 ggtagcgttaggc accgtagccc caatccgctt g

31

<210> 10
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 10
 ggtagcgttaggc accgtagccc caatcccatt ggtagc

36

<210> 11
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>	
<223> Описание синтетической последовательности: Праймер	
<400> 11	
ctgtgactgg tgagtactca accaagtc	28
<210> 12	
<211> 31	
<212> ДНК	
<213> Синтетическая последовательность	
<220>	
<223> Описание синтетической последовательности: Праймер	
<400> 12	
ggtcgtaggc accgtagccc tcatccgctt g	31
<210> 13	
<211> 31	
<212> ДНК	
<213> Синтетическая последовательность	
<220>	
<223> Описание синтетической последовательности: Праймер	
<400> 13	
ggtcgtaggc accgtagccc atatccgctt g	31
<210> 14	
<211> 31	
<212> ДНК	
<213> Синтетическая последовательность	
<220>	
<223> Описание синтетической последовательности: Праймер	
<400> 14	
ggtcgtaggc accgtagcca atatccgctt g	31
<210> 15	
<211> 36	
<212> ДНК	
<213> Синтетическая последовательность	
<220>	
<223> Описание синтетической последовательности: Праймер	
<400> 15	
gcagcatgga actgctyatg aagaggcacg tcaaac	36
<210> 16	
<211> 30	
<212> ДНК	
<213> Синтетическая последовательность	
<220>	
<223> Описание синтетической последовательности: Праймер	
<400> 16	

catagttgcc gaattcattg gaaacttccc

30

<210> 17

<211> 34

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 17

catagttgcc gaattcaggg gaaacttccc aatc

34

<210> 18

<211> 41

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 18

ccgcgccccg ggaaatcaaa tttgtccag gctttaatta g

41

<210> 19

<211> 32

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 19

caaaatggta ccaataccac ttaaaatcgc tg

32

<210> 20

<211> 29

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 20

cttcccaatc ccaagtcttc ccttgaaac

29

<210> 21

<211> 36

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 21

cttaatttct gctacgacgt caggatggtc ataatc

36

<210> 22
 <211> 38
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 22
 cgcccaagtc attcgaccag tactcagcta ccgtaaac 38

<210> 23
 <211> 29
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 23
 gccgttttca ttgtcgactt cccaatccc 29

<210> 24
 <211> 35
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 24
 ggaatttcgc gctgactagt cccgtacata tcccc 35

<210> 25
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 25
 ggcaggaatt tcgcgacctt tcgtcccgta catatc 36

<210> 26
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 26
 cctcattctg cagcagcagc cgtaaatggc acgctg 36

<210> 27
 <211> 38
 <212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 27

ccagacggca gtaataccga tatccgataa atgttccg

38

<210> 28

<211> 30

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 28

cggatatcgg tattactgcc gtctggattc

30

<210> 29

<211> 21

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 29

ctcgtcccaa tcggttccgt c

21

<210> 30

<211> 26

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 30

gatgtatgcc gacttcgatt atgacc

26

<210> 31

<211> 30

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 31

catagttgcc gaattcattg gaaacttccc

30

<210> 32

<211> 24

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 32
ccgattgctg acgctgttat ttgc

24

<210> 33

<211> 25

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 33
gccaagcgga taacggctac ggtgc

25

<210> 34

<211> 28

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 34
gaacgagcca atcggacgtg ggctacgg

28

<210> 35

<211> 32

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 35
ggaacgagcc aatcggataa cggctacggt gc

32

<210> 36

<211> 25

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 36
gcataataagg gactgagcca agcgg

25

<210> 37

<211> 25

<212> ДНК

<213> Синтетическая последовательность

<220>

<223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 37
caaccasaaa gccggcgctg atgcs

25

<210> 38
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 38
 gcatataagg gactgagcca atcggataac ggctacggtg c 41

<210> 39
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 39
 gaacgagccg atcggacgtg ggctacgg 28

<210> 40
 <211> 28
 <212> ДНК
 <213> Синтетическая последовательность

<220>
 <223> Описание синтетической последовательности: Праймер

<400> 40
 gaacgagcca aaacgacgtg ggctacgg 28

RU 2 2 3 1 5 4 7 C 2

RU 2 2 3 1 5 4 7 C 2