



(51) Int. Cl.⁵: C 12 N 9/28 C 12 P 19/14
 C 12 N 15/56 C 12 S 3/12
 C 12 N 15/75 II(C 12 N 9/28; C 12 R 1:07)
 D 06 M 16/00 (C 12 N 9/28; C 12 R 1:10)
 C 12 S 11/00

DEUTSCHES PATENTAMT

(21) Aktenzeichen:	(22) Anmeldetag:	(41) Aufgebot zur Akteneinsicht:	(43) Veröff.-tag der Offenlegungsschrift:
DDC 12 N / 342 352 0	29.06.90	07.05.92	29.04.93

(30) Unionspriorität:	(32) 29.06.89	(33) EP
(31) 89201735.1		

(71) Anmelder: GIST-BROCADES N.V., 2600 MA Delft, NL; PLANT GENETIC SYSTEMS N.V., 1040 Brüssel, BE
 (72) Erfinder: Quax, Wilhelmus J., 2253 VB Voorschoten, NL; Laroche, Yves, 1150 Brüssel, BE;
 Vollebregt, Adrianus W. H., 2671 WZ Naaldwijk, NL; Stanssens, Patrik, St. Denijs Westrem, BE;
 Lauwereys, Marc, 2950 Haaltert, BE
 (74) Vertreter: Leinung, Günter, Dipl.-Jur. Pat.-Anw., Olvenstedter Str. 30, O - 3080 Magdeburg

(54) Mutierte mikrobielle α -Amylasen mit erhöhter Wärme-, Säure- und/oder Alkalibeständigkeit

(57) Wärmebeständige und säurebeständige α -Amylasen werden als genetisch manipulierte α -Amylase-Gene, die von Mikroorganismen, die vorzugsweise zur Klasse der Bacilli gehören, isoliert wurden, zur Verfügung gestellt. Sowohl chemische als auch enzymatische Mutagenesemethoden sind z. B. die Hydrogensulfitmethode und die enzymatische Fehleinfügung in gespaltene Heteroduplex DNA. Die mutierten α -Amylasen haben hervorragende Eigenschaften, z. B. verbesserte Wärmebeständigkeit über einen weiten pH-Bereich, für industrielle Anwendungszwecke bei der Stärkeverarbeitung und der Textilentschlichtung.

Patentansprüche:

1. Mutierte α -Amylase, wobei es sich um das Expressionsprodukt einer mutierten, eine α -Amylase kodierenden DNA-Sequenz handelt, **dadurch gekennzeichnet**, daß die mutierte α -Amylase eine Aminosäuresequenz besitzt, die sich in mindestens einer Aminosäure von dem Wildtyp-Enzym unterscheidet, und daß die mutierte α -Amylase verbesserte Eigenschaften bei der Anwendung zum Abbau von Stärke und/oder der Textilentschlichtung zeigt, wobei die verbesserten Eigenschaften auf den Austausch von Aminosäuren zurückzuführen sind.
2. α -Amylase nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie verbesserte Wärmebeständigkeit aufweist.
3. α -Amylase nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie verbesserte Beständigkeit bei einem pH-Wert unter 6,5 und/oder über 7,5 aufweist.
4. α -Amylase nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie verbesserte Wärmebeständigkeit und Säurebeständigkeit aufweist.
5. α -Amylase nach einem der Ansprüche 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Originalgen, von dem das mutierte Enzym abgeleitet ist, von einem Mikroorganismus, vorzugsweise einem **Bacillus**-Stamm, gewonnen wird.
6. α -Amylase nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Gen von einem Wildtyp-Gen aus der **B. stearothermophilus**, **B. licheniformis** und **B. amyloliquefaciens** umfassenden Gruppe ausgewählten Stammes abgeleitet ist.
7. α -Amylase nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß sich dieses Enzym von der von **Bacillus licheniformis** gewinnbaren Wildtyp- α -Amylase durch einen Aminosäureaustausch an einer oder an mehreren Position(en) 111, 113 und 149 oder an entsprechenden Positionen in jeder beliebigen homologen α -Amylase unterscheidet.
8. α -Amylase nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine oder mehrere der folgenden Aminosäureaustauschmöglichkeit(en): Ala-111-Tr, His-133-Tyr, Thr-149-Ile enthält.
9. Mutiertes Gen, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine α -Amylase nach der Definition in einem der Ansprüche 1 bis 8 kodiert.
10. Expressionsvector, **dadurch gekennzeichnet**, daß er ein mutiertes Gen nach Anspruch 9 aufweist.
11. Wirtszelle, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie einen Expressionsvector nach Anspruch 10 beherbergt.
12. Wirtszelle, die im wesentlichen nicht in der Lage ist, vor der Transformation extrazelluläre amylolytische Enzyme zu erzeugen, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie mit einem Expressionsvector nach Anspruch 10 transformiert ist.
13. Wirtszelle nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß es sich um **B. licheniformis** T9 handelt.
14. **Bacillus/E. coli**-Shuttle-Vector, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Expression des klonierten Gens in **E. coli** durch die physikalische Trennung der regulierenden Sequenzen von dem Strukturgen unmöglich gemacht worden ist, und daß die Expression des klonierten Gens in **Bacillus** durch die Digestion mit einem einzigen Restriktionsenzym und anschließende Rezirkularisierung wieder hergestellt werden kann.
15. Methode zur Herstellung eines amylolytischen Enzyms mit verbesserten Eigenschaften für die Anwendung beim Stärkeabbau oder der Textilentschlichtung, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie folgende Schritte umfaßt:
 - Mutagenisierung eines klonierten Gens, das ein in Frage kommendes amylolytisches Enzym oder ein Fragment davon kodiert;
 - Isolierung des gewonnenen mutierten Amylase-Gens oder solcher Gene;
 - Einfügung des gewonnenen mutierten Amylase-Gens oder solcher Gene in einen geeigneten Wirtstamm zur Expression und Produktion;
 - Gewinnung der erzeugten mutierten Amylase und
 - Identifizierung derjenigen mutierten Amylasen mit verbesserten Eigenschaften zur Anwendung für den Stärkeabbau oder die Textilentschlichtung.
16. Verfahren zur Erzeugung einer mutierten α -Amylase, **dadurch gekennzeichnet**, daß
 - eine Wirtszelle nach einem der Ansprüche 11 bis 13 in einem geeigneten Medium kultiviert wird;
 - die erzeugte α -Amylase gewonnen wird.
17. Anwendung der α -Amylase nach einem der Ansprüche 1 bis 8 für den Stärkeabbau und die Textilentschlichtung.

18. Verfahren für den Abbau von Stärke, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine mutierte α -Amylase nach einem der Ansprüche 1 bis 8 eingesetzt wird.
19. Verfahren zur Entschlichtung von Textilmaterial, **dadurch gekennzeichnet**, daß eine mutierte α -Amylase nach einem der Ansprüche 1 bis 8 eingesetzt wird.
20. Stärkeabbauzusammensetzung, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine mutierte α -Amylase nach einem der Ansprüche 1 bis 8 aufweist.
21. Textilentschlichtungszusammensetzung, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie eine mutierte α -Amylase nach einem der Ansprüche 1 bis 8 aufweist.

Hierzu 25 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft das Gebiet der Gentechnik und stellt neue DNA-Moleküle zur Verfügung, die für Enzyme mit α -Amylase-Aktivität kodierende DNA-Sequenzen aufweisen. Es werden speziell mutierte mikrobielle α -Amylasen mit verbesserten Charakteristika zur Anwendung beim Abbau von Stärke, für die Entschlichtung von Textilien und für andere industrielle Prozesse offenbart. Die vorgestellten α -Amylasen zeigen erhöhte Wärme-, Säure- und Alkalibeständigkeit, wodurch sie ideal für die Ausübung ihrer Aktivität unter bisher nicht anwendbaren Prozeßbedingungen geeignet sind.

Hintergrund der Erfindung

Stärke besteht aus einem Gemisch von Amylose (15 bis 30 Ma.-%/Masse) und Amylopectin (70 bis 85 Ma.-%/Masse). Amylose besteht aus linearen Ketten von α -1,4-verknüpften Glucoseeinheiten mit einer relativen Molekülmasse (MW) von etwa 60 000 bis etwa 800 000. Amylopectin ist ein verzweigtes Polymer, das α -1,6-Verzweigungspunkte je 24 bis 30 Glucoseeinheiten enthält, seine MW kann bis 100 Millionen betragen.

Zucker von Säure, in Form konzentrierter Dextrosesirupe, sind kürzlich hergestellt worden, und zwar mit Hilfe eines durch Enzym katalysierten Verfahrens, das umfaßt: (1) Verflüssigung (oder Verdünnen) von fester Stärke mit einer α -Amylase zu Dextrinen mit einem durchschnittlichen Polymerisationsgrad von etwa 7 bis 10, und (2) Saccharifikation der resultierenden verflüssigten Stärke (d. h. des Stärkehydrolysats) mit Amyloglucosidase (auch Glucoamylase oder AG genannt). Der resultierende Sirup hat einen hohen Glucosegehalt. Ein großer Teil des kommerziell erzeugten Glucosesirups wird anschließend enzymatisch zu einem als Isosirup bekannten Dextrose/Fructose-Gemisch isomerisiert.

α -Amylase (EC 3.2.1.1) hydrolysiert Stärke, Glycogen und verwandte Polysaccharide durch die willkürliche Spaltung interner α -1,4-glucosidischer Bindungen. Dieses Enzym wird für eine Reihe wichtiger kommerzieller Zwecke eingesetzt, zum Beispiel in der Zucker-, Brauerei-, Alkohol- und Textilindustrie. α -Amylasen werden aus den verschiedensten Bakterien-, Fungi-, Pflanzen- und Tierquellen isoliert. Die industriell bedeutendsten α -Amylasen sind die von Bazillen isolierten.

In der ersten Stufe des Stärkeabbauprozesses wird eine Stärkeaufschlammung durch Erwärmen auf eine verhältnismäßig hohe Temperatur (bis zu 110°C) gelatinisiert. Die gelatinisierte Stärke wird in einem kontinuierlichen 2-Stufen-Verfahren durch eine wärmebeständige α -Amylase verflüssigt und zu Dextrin abgebaut. Die wichtigsten Prozeßvariablen sind Stärkekonzentration, α -Amylasedosis, Temperatur und pH-Wert. Während der Verflüssigungs-Dextrinbildungs-Reaktion müssen die Prozeßvariablen zur Erzielung guter Umwandlungsverhältnisse innerhalb enger Grenzen gehalten werden, da sonst ernsthafte Filtrationsprobleme auftreten können. Siehe beispielsweise L. E. Coker und K. Venkatasubramanian, in: *Biotechnology*, S. 165 bis 171, Herausg. P. N. Cheremisinoff, P. B. Quelette, Technicom Publ. Corp. Lancaster Penn. 1985. Eines der häufig auftretenden Probleme ist die einwandfreie Temperaturregelung im Anfangsstadium des Abbauprozesses: Überhitzung führt oftmals zur Denaturierung der α -Amylase, so daß das endgültige Verdünnen nicht ausreichend ist. Eine Möglichkeit, um das zu vermeiden, besteht in der Anwendung wärmebeständigerer α -Amylasen.

Zu diesem Zweck wurde die Zugabe von Calciumionen oder eines Amphiphils vorgeschlagen (siehe z. B. EP-A 0189838), aber diese Lösung hat sich als nicht zufriedenstellend erwiesen.

Es besteht daher immer noch ein erhebliches Interesse an der Bereitstellung von α -Amylasen mit erhöhter Wärmebeständigkeit.

Relevante Literatur

In EP-A 057976 wird die Isolierung eines wärmebeständigen α -Amylase kodierenden Gens von *B. stearothermophilus* beschrieben, wobei das Gen in ein entweder einen *Bacillus* oder einen *E. coli*-Ursprung für die Replikation enthaltendes Plasmid kloniert wird. Das auf diese Weise gewonnene schimärische Plasmid wird für die Erzeugung von α -Amylase verwendet. Das α -Amylase-Gen wurde ohne irgendwelche weitere Modifikation isoliert und verwendet.

EP-A 0134048 beschreibt ein Verfahren für die erhöhte kommerzielle Produktion von unter anderem α -Amylase, indem ein oder mehrere α -Amylase-Gen(e) in industrielle *Bacillus*-Stämme kloniert oder exprimiert werden.

EP-A 252666 betrifft eine schimärische α -Amylase mit der allgemeinen Formel Q-R-L, worin Q ein N-terminales Polypeptid von 55 bis 60 Aminosäureresten ist, das zu mindestens 75% den 37 N-terminalen Resten der *B. amyloliquefaciens* α -Amylase homolog ist, R ein bestimmtes Polypeptid ist und L ein C-terminales Polypeptid von 390 bis 400 Aminosäureresten ist, das zu mindestens 75% den 395 C-terminalen Resten von *B. licheniformis* α -Amylase homolog ist.

Gray u. a. (J. Bacteriol., 1986, 166, 635) beschrieben schimärische α -Amylasen, die von dem NH_2 -terminalen Teil von *B. stearothermophilus*- α -Amylase und dem COOH -terminalen Teil von *B. licheniformis*- α -Amylase gebildet wurden. Von den

meisten der Hybridenzymmoleküle wurde nachgewiesen, daß sie weniger beständig als die Ausgangs-Wildtyp-Enzyme waren. Außerdem konnte von keinem der Hybridmoleküle gezeigt werden, daß es verbesserte Beständigkeitseigenschaften besaß. In keiner der oben zitierten Literaturangaben wird die Anwendung von einzelnen Aminosäureaustauschmöglichkeiten zur Gewinnung neuartiger α -Amylasen beschrieben.

EP-A 0285123 betrifft eine Methode für die vollständige Mutagenese von Nucleinsäuresequenzen. Als Beispiel wird die Mutagenese der *B. stearothermophilus*- α -Amylase beschrieben. Obwohl vermutlich die Möglichkeit besteht, daß diese Methode zur Gewinnung von *B. stearothermophilus*- α -Amylase-Mutanten mit besserer Beständigkeit angewandt werden kann, werden keine Beispiele angeführt.

Zusammenfassung der Erfindung

Die Erfindung betrifft mutierte α -Amylasen und Möglichkeiten zur Gewinnung derartiger Mutanten. Diese mutierten α -Amylasen sind dadurch gekennzeichnet, daß sie sich in mindestens einer Aminosäure von dem Wildtyp-Enzym unterscheiden. Des weiteren werden diese Mutanten kodierende DNAs, diese DNAs in exprimierbarer Form enthaltende Vektoren und diese Vektoren enthaltende Wirtszellen zur Verfügung gestellt.

In einem Aspekt der Erfindung wird willkürliche Mutagenese an klonierten α -Amylase-Genen offenbart. Diese mutierten Gene werden in einem geeigneten Wirtsorganismus unter Anwendung eines geeigneten Vectorsystems exprimiert.

Nach einem weiteren Aspekt der Erfindung werden Screening-Methoden für mutierte α -Amylasen beschrieben und angewandt. Solche Methoden ergeben wärmebeständigere und säurebeständigere α -Amylasen. Außerdem wird diese Methode mit einer leichten Modifikation zur Gewinnung alkalibeständigerer α -Amylasen eingesetzt. Die Expressionsprodukte der auf diese Weise nachgewiesenen Klone werden isoliert und gereinigt.

Ein noch weiterer erfindungsgemäßer Aspekt betrifft α -Amylasen mit erhöhter Wärmebeständigkeit, wobei durch diese mutierten α -Amylasen die Filtrationsprobleme unter den Einsatzbedingungen des Stärkeabbaus reduziert werden.

Nach einem weiteren Aspekt der Erfindung werden α -Amylasen mit erhöhter Säurebeständigkeit zur Verfügung gestellt, die die Bildung ungünstiger Nebenprodukte wie Maltulose verringern und dabei gleichzeitig die Säuremenge vermindern, die vor der Umsetzung mit Amyloglucosidase zugesetzt werden muß. Die neuen α -Amylasen besitzen vorzugsweise verbesserte Eigenschaften sowohl in bezug auf die Wärmebeständigkeit als auch die Säurebeständigkeit oder in bezug auf Wärmebeständigkeit und Alkalienbeständigkeit.

Nach einem anderen erfindungsgemäßen Aspekt wird nachgewiesen, daß die mutierten Proteine ein besseres Verhalten unter den Anwendungsbedingungen bei der Stärkeverflüssigung aufweisen. Die Alkalienbeständigkeit ist besonders für die Anwendung zur Textilienentschlichtung von Nutzen.

Diese Aspekte werden in der folgenden ausführlichen Beschreibung und den folgenden Beispielen weiter dargelegt.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

In den Zeichnungen stellen dar

Fig. 1: Nucleotidsequenz von pMa5-8

Stanssens u. a., 1987, EMBO Laboratory Course Martinsried, Juli 1987. Hinsichtlich der Beschreibung der verschiedenen Elemente siehe Text.

Fig. 2: Nucleotidsequenz von Plasmid pPROM SPO2-Insert

Die Konstruktion dieses Vectors wurde in EP-A 0224294 beschrieben. Die α -Amylase-Aminosäuresequenz wird unter den Triplets gekennzeichnet. Die Numerierung beginnt an der ersten Aminosäure des vollentwickelten Proteins (Kuhn u. a., 1982, J. Bacteriol., 149, 372). Das SPO2-Promotor-Insert reicht von Position 61 bis 344.

Fig. 3: Nucleotidsequenz von pMaTLia6

Dieser Vector wurde von pMa5-8, dem Insert von pPROM SPO2 und einem den TAC-Promotor kodierenden DNA-Fragment konstruiert. Das TAC-Promotor-DNA-Fragment reicht von Position 3757 bis Position 3859. Die α -Amylase-Aminosäuresequenz ist unter den Triplets gekennzeichnet.

Fig. 4: Restriktionskarte von pMaTLia6

Die folgenden einzigartigen Restriktionsenzymstellen stehen für die Spaltkonstruktion in dem α -Amylase-Gen zur Verfügung: BamHI, SpeI, SacII, KpnI, ClaI, NarI, SalI, HinfI, XmaII und BstEI. Sequenzierungsprimer für alle möglichen Spalten sind synthetisiert worden, um eine leichte Bestimmung der Mutationen zu ermöglichen. Plasmid pMaTLia6 ist mit pMaTLia6 identisch, bis auf die Anwesenheit eines Amber-Codons, dem Ampicillin-Gen (entfernt Scal-Stelle), und das Fehlen eines Amber-Codons in dem Chloramphenicol-Gen (einhergehend mit dem Vorhandensein einer PvuII-Stelle).

Fig. 5: Umriss von Bacillus E. coli Shuttlevector pBMa/c

Der (linke) pMa/c-Abschnitt ermöglicht entsprechende Mutagenese in E. coli. Die (rechte) Bacillus subtilis-Kassette enthält das α -Amylase-Gen (oder irgendein anderes Bacillus-Gen) plus ein minimales Replikon für die Vermehrung in B. subtilis. Nach erfolgreicher Mutagenese in E. coli kann die B. subtilis-Kassette zirkularisiert werden, so daß sich der SPO2-Promotor nach der Transformation in Bacillus vor dem α -Amylase-Gen bewegen kann.

Fig. 6: Restriktionskarte von pBMa/c1

Dieser Vector ist ein spezifisches Beispiel des in Figur 5 dargestellten Mutagenese-Expressionsvectors.

(1) und (2): Multiple Klonierungsstellen. Das Target-Gen ist in (2) eingefügt. Durch Variieren der Stellen an (1) und (2) können entsprechende Restriktionsstellen für die unterbrochene Duplexschaffung konstruiert werden:

FDT:	Transkriptionsterminator
F1.ORI:	Replikationsursprung, ausgehend von Phage F1
E. coli ORI:	Replikationsursprung von pBR322
BLA:	Ampicillinresistenz-Gen

CAT: Chloramphenicolresistenz-Gen
 BAC ORI: Replikationsursprung von pUB110
 KANAMYCIN: Kanamycin (Neomycin-)resistenz-Gen von pUB 110
 SPO2: Promotor von Phage SPO2.

Fig. 7: Restriktionskarte von pBMa/C6Lia6

Das α -Amylase-Gen von *Bacillus licheniformis* wurde an der multiplen Clonierungsstelle (2) von Figur 6 in pBMa/cl eingebaut. In dieser Figur ist der SPO2-Promotor durch (2) gekennzeichnet und der *E. coli* ORI durch (4) dargestellt.

Fig. 8: Sequenz von *phoA* Signalsequenzfragment in pMa/c' TPLia6

Dargestellt ist die Sequenz von der EcoRI-Stelle oberhalb des TAC-Promotors bis zu den ersten Aminosäuren von vollentwickelter α -Amylase. Die *phoA*-Aminosäuresequenz ist unter der DNA-Sequenz dargestellt.

Fig. 9: Michaelis-Menten-Diagramm für WT und 2D5 α -Amylase

Dieses Diagramm zeigt die anfängliche Geschwindigkeit von Enzymaktivitäten im Verhältnis zur Substratkonzentration für WT und 2D5 α -Amylase. Die Analysebedingungen werden in Beispiel 8 beschrieben.

Fig. 10: Wärmeinaktivierung von WT und D7 α -Amylase

Dieses Diagramm zeigt die Halbwertszeit von WT und D7 α -Amylase in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration bei einem pH-Wert von 5,5 und 90,5°C.

Fig. 11: Wärmeinaktivierung von WT und D7 α -Amylase

Wie in Figur 10, mit Ausnahme des pH-Wertes, der 7,0 beträgt.

Fig. 12: Wärmeinaktivierung von WT und 2D5 α -Amylase

Dieses Diagramm zeigt die Halbwertszeit von WT und 2D5 α -Amylase in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration bei pH-Wert 7,0 und 95°C.

Fig. 13: Wärmeinaktivierung von WT und D7 α -Amylase in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Fig. 14: Wärmeinaktivierung von WT und 2D5 α -Amylase in Abhängigkeit vom pH-Wert.

Fig. 15: DE gegen endgültigen pH-Wert, gemessen nach der Verflüssigung bei 110°C.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Unter dem in Verbindung mit „mutierter α -Amylase“ in der vorliegenden Beschreibung angewandten Begriff „zeigt verbesserte Eigenschaften“ sind α -Amylasen zu verstehen, die eine höhere enzymatische Aktivität oder eine längere Halbwertszeit unter den Anwendungsbedingungen bei der Stärkeverflüssigung, Textilentschlichtung und anderen industriellen Prozessen aufweisen. Mit „verbesselter Wärmebeständigkeit“ ist gemeint, daß das mutierte Enzym seine Aktivität bei einer höheren Prozeßtemperatur beibehält oder daß es bei der gleichen Temperatur länger wirksam ist als das Wildtyp-Enzym, von dem es stammt.

Unter „verbesserte Säure (oder Alkali-)beständigkeit“ ist zu verstehen, daß das mutierte Enzym bei niedrigeren (oder höheren) pH-Werten besser wirkt als das Wildtyp-Enzym, von dem es stammt.

Es ist vorgesehen, daß die verbesserten Eigenschaften durch den Ersatz von einer oder mehreren Aminosäure(n) erzielt werden. Chromosomen DNA kann von einem Mikroorganismen enthaltenden α -Amylase isoliert werden. Vorzugsweise wird ein zur Gattung *Bacillus*, besser *B. licheniformis* und am besten *B. licheniformis* T5 gehörender Mikroorganismus verwendet (EP-A 134048). Die Chromosomen-DNA wird mit einem geeigneten Restriktionsenzym digeriert und in einen Vector kloniert. Es kann eine Reihe möglicher Selektionswege gewählt werden, z. B. Hybridisierung, immunologischer Nachweis und Nachweis enzymatischer Aktivität. Die Wahl des für die Klonierung der digerierten Chromosomen-DNA verwendeten Vectors wird von der Wahl der zur Verfügung stehenden Methode abhängen. Wird Hybridisierung angewandt, sind keine besonderen

Vorsichtsmaßnahmen erforderlich. Wenn der Nachweis jedoch immunologisch erfolgt oder auf enzymatischer Aktivität basiert, dann muß der Vector die richtigen Expressionssignale enthalten. Der tatsächliche Nachweis von α -Amylase enthaltenden Klonen wurde auf stärkehaltigen Agarplatten vorgenommen. Nach der Züchtung und Inkubation mit I_2 wurden Dampfinge um positive Klone herum nachgewiesen. Als nächster Schritt wird die Sequenz des Gens bestimmt. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wird zum Vergleich mit anderen bekannten α -Amylasesequenzen herangezogen, um einen ersten Eindruck von wichtigen Aminosäuren zu gewinnen (z. B. Aktiv-Stelle, Ca^{2+} -Bindung, mögliche S-S-Brücken). Ein besserer Hinweis wird gewonnen, wenn die räumliche Struktur ermittelt wird. Da dies sehr arbeitsaufwendig ist, wird oftmals ein anderer Weg gewählt. Beim Fehlen einer räumlichen Struktur werden Voraussageprogramme für die Bestimmung der sekundären Strukturelemente (z. B. α -Helix, β -Sheet) mit Erfolg angewandt, möglicherweise werden die tertiären Strukturelemente, z. B. β -Zylinder, bestimmt. Hinsichtlich einer Besprechung siehe Janin, J., und Wodack, S. J., *Prog. Biophys. Molec. Biol.*, 1983, **42**, 21–78.

Wertvolle Aminosäureaustauschmöglichkeiten sind vorstellbar. Die Stabilität einer Proteinstruktur wird durch die Nettodifferenz in der freien Energie zwischen gefalteten und ungefalteten Konformationen des Proteins bestimmt. Da der Prolinrest auf weniger Konformationen beschränkt ist als die anderen Aminosäuren, wird die strukturelle Entropie der Auffaltung eines Proteins verringert (und die Stabilität dadurch erhöht), wenn eine Aminosäure durch Prolin ersetzt wird. Eine andere nützliche Substitution ist der Austausch von Glycin gegen Alanin. Reste wie Threonin, Valin und Isoleucin mit verzweigten β -Kohlenstoffen schränken die Rückgrat-Konformation stärker als nicht-verzweigte Reste ein.

Da ein Teil der Wärmebeständigkeit bestimmter Proteine auf Salzbrücken zurückzuführen ist, kann die Einfügung von Lysin- und Argininresten vorteilhaft sein (Tomozic, S. J., und Klibanov, A. M., *J. Biol. Chem.* 1988, **263**, 3092–3096). Darüber hinaus kann durch den Austausch von Lysinresten gegen Argininreste die Stabilität von Salzbrücken verbessert werden, weil Arginin in der Lage ist, eine zusätzliche H-Bindung zu bilden. Hinsichtlich eines Überblickes siehe Wigby, D. B., u.a., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1987, **149**, 927–929. Erwähnt wird, daß die Deamidierung von Asparagin und Glutamin zu einer deutlichen Unterbrechung der Enzymstruktur führt, der Ersatz durch Nicht-Amidreste könnte diese Unterbrechung verhindern.

Aminosäureaustausche erfolgen am besten durch Mutagenese auf dem DNA-Niveau.

Im Prinzip lassen sich Mutageneseexperimente sofort an isolierten Klonen vornehmen. Das Insert wird jedoch vorzugsweise in einen Mutagenese/Expressions-Vector kloniert. Willkürliche Mutagenese ist möglich, ebenfalls ortsgerichtete Mutagenese.

Angesichts der riesigen Menge mutierter Klone bei der früheren Methode und da keine 3D-Struktur von α -Amylase bekannt ist,

um eine bessere Annahme für ortsgerichtete Mutagenese zu ermöglichen, haben wir uns entschieden, „willkürliche“ Mutagenese in spezifischen Regionen vorzunehmen.

Das folgende Vorgehen ist ein möglicher Weg zur Praktizierung der Erfindung.

Zunächst wird das Gen durch die Einführung von „ruhigen“ Restriktionsstellen modifiziert. Die Einführung von nichtruhigen Restriktionsstellen ist ebenfalls möglich. Dadurch wird die Deletion spezifischer Regionen des Gens möglich. Zweitens wird das Gen in ein Plasmid kloniert. Durch diese Kombinationen von einem Phagen und einem Plasmid wird die Produktion einsträngiger DNA erleichtert. Andere Wege zur Gewinnung einsträngiger DNA sind ebenfalls möglich. Durch die Hybridisierung von geschmolzener doppelsträngiger Vector (plus Insert)-DNA mit einer Vector/Insert-Kombination, die einen Spalt im Insert enthält, wurde gesplante Heteroduplex-DNA gewonnen (ausführliche Beschreibung siehe Morinaga, Y., u. a., 1984, *Biotechnology*, 2, 636).

Der Spalt wird für chemische und enzymatische Mutagenese herangezogen. Vorzugsweise wandten wir die Hydrosulfidmethode an (Folk und Hofstetter, *Cell*, 1983, 23, 585), und es wird eine enzymatische Fehlkorrekturmethode angewandt (modifizierte Version von Lehtovaara u. a., *Prot. Eng.*, 1988, 2, 63). Diese Methoden können in einer solchen Weise angewandt werden, daß jedes einzelne Nucleotid in dem Spalt durch alle drei anderen Nucleotide ersetzt wird (Sättigungsmutagenese). Die letztere Methode kann in mehreren Formen angewandt werden. Bei einer davon wird ein synthetischer Primer an den Spalt hybridisiert. Anschließend wird eine Verlängerungsreaktion vorgenommen, bei der das zu dem ersten Desoxynucleotid 3' von dem Primer komplementäre Desoxynucleotid fehlt. Im Prinzip können alle drei der anderen Desoxynucleotide auf diese Weise eingeführt werden. Das kann entweder durch die Anwendung eines Gemisches von drei Desoxynucleotiden oder durch die Anwendung von drei getrennten Reaktionen, von denen jede nur ein Desoxynucleotid enthält, erreicht werden. Eine andere Anwendungsmöglichkeit dieser Methode ergibt willkürliche Klone. Hier werden vier einzelne Reaktionen vorgenommen, von denen jede ein begrenzendes Desoxynucleotid enthält. Dadurch ergeben sich zweite Stränge, die vor jedem einzelnen Nucleotid aufhören. Die anschließenden Schritte können wie oben beschrieben vorgenommen werden. Es wurde sowohl die Hydrosulfid- als auch die enzymatische Mutagenesemethode zur Gewinnung von Mutanten angewendet.

Zur Prüfung der enzymatischen Eigenschaften empfiehlt es sich, die klonierten Gene in dem gleichen Wirt zu exprimieren, der im Laufe der Mutageneseexperimente eingesetzt wurde. Das kann im Prinzip jede Wirtszelle sein, vorausgesetzt, daß geeignete Mutagenese/Expressions-Vectorsysteme für diese Zellen zur Verfügung stehen. Meistens eignet sich *E. coli* besonders dafür, zum Beispiel *E. coli* WK6. Nach der Züchtung der Kolonien in Mikrotiterplatten wurden Proben aus den Vertiefungen dieser Platten auf Agarplatten getüpfelt, die einen Stärkezusatz enthielten und auf verschiedene pH-Werte gepuffert waren. Positive Klone können durch Ringbildung nachgewiesen werden. Screening mit entsprechenden Puffern kann angewandt werden, um eine Selektion in bezug auf Wärmebeständigkeit, Säurebeständigkeit, Alkalibeständigkeit, Salzlösungsbeständigkeit und jede andere Beständigkeit, die ermittelt werden kann, vorzunehmen.

Geeignete Wirtsstämme für die Produktion von mutierten α -Amylasen umfassen transformierbare Mikroorganismen, in denen die Expression von α -Amylase erzielt werden kann. Speziell sind Wirtsstämme der gleichen Spezies oder der gleichen Gattung, von denen die α -Amylase abgeleitet ist, geeignet, wie beispielsweise ein *Bacillus*-Stamm, vorzugsweise wird ein α -Amylase-negativer *Bacillus*-Stamm herangezogen, noch besser ein α -Amylase- und Protease-negativer *Bacillus*-Stamm.

Zum Beispiel wurde *B. licheniformis* T9 zur Herstellung großer Mengen mutierter α -Amylasen verwendet.

Vorzugsweise werden die zu erzeugenden α -Amylasen in das Kulturmedium (während der Fermentierung) ausgeschieden, was ihre Rückgewinnung erleichtert. Es kann jede geeignete Signalsequenz zur Erzielung von Sekretion eingesetzt werden.

Die exprimierte α -Amylase wird aus den Zellen ausgeschieden und kann anschließend mit Hilfe jeder geeigneten Methode gereinigt werden. Gelfiltration und Mono-Q-Chromatographie sind Beispiele für derartige Methoden. Die isolierte α -Amylase wurde hinsichtlich der Wärmeinaktivierung bei verschiedenen Ca^{2+} -Konzentrationen (0,5–15 mM) und über einen breiten pH-Bereich (5,5–8,0) getestet. Es wurden auch Tests unter Anwendungsbedingungen vorgenommen. Vor allem wurde mutierte α -Amylase unter den Bedingungen der Stärkeverflüssigung bei einem pH-Wert von 5,5 und 5,25 getestet. Außerdem wurden Anwendungsmöglichkeiten für die Textilschlichtung untersucht.

Die Eigenschaften einiger der Mutanten, die ausgesondert wurden, werden unter den verlangten Leistungsbedingungen besser geeignet sein.

Durch die Erfindung werden α -Amylasen mit erhöhter Wärmebeständigkeit, besserer Säurebeständigkeit und verbesserter Alkalibeständigkeit zur Verfügung gestellt. Im allgemeinen spielt die Anzahl der Aminosäureaustausche keine große Rolle, solange die Aktivität des mutierten Proteins der des Wildtyp-Enzyms gleich oder besser als diese ist. Mutierte α -Amylase unterscheidet sich in mindestens einer Aminosäure vom Wildtyp-Enzym, vorzugsweise weichen die Mutanten in 1 bis 10 Aminosäuren davon ab. Spezifische Mutanten mit verbesserten Eigenschaften sind mutierte α -Amylasen, die an den folgenden Positionen 111, 133 und 149 einen oder mehrere Aminosäureaustausche aufweisen (die Numerierung erfolgte in Übereinstimmung mit der *B. licheniformis* α -Amylase). Zu den bevorzugten Aminosäureaustauschmöglichkeiten gehören Ala-111-Thr, His-133-Tyr und Thr-149-Ile.

Derartige mutierte Enzyme zeigen eine verbesserte Leistungsfähigkeit bei pH-Werten unter 6,5 und/oder über 7,5. Die Leistungsfähigkeit wird auch bei hohen Temperaturen verbessert, die zu einer erhöhten Halbwertszeit bei beispielsweise Temperaturen bis zu 110°C führen.

Viele der zur Verfügung stehenden α -Amylaseprodukte werden von bakteriellen Quellen gewonnen, vor allem *Bacilli*, z. B. *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. coagulans* und *B. amyloliquefaciens*. Diese Enzyme zeigen einen hohen Grad an Homologie und Ähnlichkeit (Yuuki u. a., *J. Biochem.*, 1985, 98, 1147; Nakajima u. a., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1986, 23, 355). Daher können die Kenntnisse über günstige Mutationen, die von einer dieser α -Amylasen gewonnen wurden, zur Verbesserung anderer Amylasen angewandt werden. Die Erfindung bietet einen Weg zur Erlangung derartiger Kenntnisse. Es folgen eine Beschreibung der angewandten Versuchsmethoden und Beispiele zur Veranschaulichung der Erfindung. Die Beispiele dienen nur illustrativen Zwecken und sollen daher den Geltungsbereich der Erfindung in keiner Weise einschränken.

Versuchsdurchführung

Materialien und Methoden

1. Allgemeine Klonierungstechniken

Es werden die Klonierungstechniken angewandt, wie sie in den Handbüchern von T. Maniatis u. a., 1982, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory; F. M. Ausubel, u. a., 1987, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc., New York; B. Perbal, 1988, *A practical Guide to Molecular Cloning*, 2. Ausg., John Wiley & Sons Inc., New York beschrieben werden. Diese Handbücher befassen sich ausführlich mit den Protokollen für die Konstruktion und Vermehrung von Rekombinant-DNA-Molekülen, den Verfahrensweisen zur Aufstellung von Genbibliotheken, den Verfahrensweisen zur Sequenzierung und Mutierung von DNA und den Protokollen für die enzymatische Handhabung von DNA-Molekülen.

2. Chemische Mutagenese

Klonierte DNA kann in vitro mit Chemikalien behandelt werden, um Mutationen in die DNA einzubauen. Wenn diese Mutationen auf Aminosäure kodierende Triplet-Codons gerichtet sind, kann durch die mutierte klonierte DNA ein mutiertes Protein erzeugt werden. Eine Methode für die chemische Mutagenese mit Hilfe von Natriumhydrogensulfit wird von Shortle und Botstein beschrieben (*Methods Enzymol.*, 1983, **100**, 457). Eine zu bevorzugende Methode wird von Folk und Hofstetter beschrieben (*Cell*, 1983, **33**, 585). Andere Mutagenesemethoden werden von Smith, *Ann. Rev. Genet.*, 1985, **19**, 423 beschrieben. Ein besonders nützliches Protokoll wird von Ausubel u. a., ebenda, beschrieben.

3. Mutagenese an DNA mit gespaltenem Duplex

Es wurde eine auf dem Vorgehen mit gespaltenem Duplex (Kramer u. a., 1984, *Nucl. Acids Res.*, **12**, 9441) und einem Phasmid (Plasmid/Phage-Hybride) basierende Methode angewandt. Im wesentlichen beruht die Methode auf einem Spalt-Duplex-DNA-Zwischenprodukt, das aus einem gespaltenen Strang ([−]-Strang), der einen Wildtyp-Markierer für antibiotische Resistenz enthält, und einem Matrizen-Strang ([+]-Strang), der eine Amber-Mutation in dem Antibiotika-Resistenz verleihenden Gen trägt, besteht. Nach der Hybridisierung wird das mutagene Oligonucleotid während der In-vitro-Spaltfüllungs- und Abdichtungsreaktion in den gespaltenen Strang eingefügt. Die resultierenden Moleküle werden verwendet, um einen Wirt mit mangelhafter Fehlanpassungsreparatur (Mut S), in dem die Verknüpfung zwischen der vorgesehenen Mutation und dem Antibiotika-Resistenz-Markierer erhalten geblieben ist, zu transformieren. Die von diesem Stamm isolierte gemischte Phasmid-Population kann sich dann in einen negativen Suppressor-Wirtsstamm abscheiden. Die Transformanten werden auf antibiotikumhaltiges Medium aufgestrichen, wodurch eine Selektion hinsichtlich der von dem gespaltenen Strang stammenden Nachkommen in Gang gesetzt wird.

Das von P. Stanssens u. a. (*Nucl. Acids Res.*, 1989, **17**, 4441) beschriebene Zwillings-Vector-System pMa/c5-8 ist aus den folgenden Elementen zusammengesetzt:

- Pos. 11–105: Bakteriophage fd, Terminator
- Pos. 121–215: Bakteriophage fd, Terminator
- Pos. 221–307: Plasmid pBR322 (Pos. 2069–2153)
- Pos. 313–768: Bakteriophage fd, Replikationsursprung (Pos. 5482–5943)
- Pos. 772–2571: Plasmid pBR322, Replikationsursprung und β -Lactamase-Gen
- Pos. 2572–2685: Transposon Tn903
- Pos. 2519–2772: Tryptophan-Terminator (Double)
- Pos. 2773–3729: Transposon Tn9, Chloramphenicolacetyltransferase-Gen
- Pos. 3730–3803: Multiple Klonierungsstellen

Die Sequenz ist in Figur 1 dargestellt.

In dem Vector vom pMa-Typ wird Nucleotid 3409 von G in A umgewechselt, während im Vector vom pMc-Typ Nucleotid 2238 von G in C umgewechselt wird, wodurch Amber-Stopcodons in dem Acetyltransferase-Gen bzw. β -Lactamase-Gen geschaffen werden, die diese Gene inaktiv machen.

Alle genannten Sequenzen wurden von Genbank (TM) (Abgabe 54), National Nucleic Acid Sequence Data Bank, NIH, USA, bezogen. Plasmid pMc5-8 ist unter DSM 4566 hinterlegt. Zur Durchführung von Mutagenese wird das Target-DNA-Fragment in die multiple Klonierungsstelle von pMa5-8 kloniert. Anschließend wird ein gespaltenes Duplex zwischen pMa5-8, der die Target-DNA enthält, und pMc5-8 konstruiert.

Der aus der Target-DNA bestehende einsträngige Spalt kann der Mutagenese mit einem mutagenen Oligonucleotid unterworfen werden, wobei mit langen synthetischen Oligonucleotiden, mit einer geringen Menge falsch eingefügter Nucleotide, mit Chemikalien oder enzymatischer Fehleinfügung von Nucleotiden ebenfalls willkürliche Mutagenese PCR angewandt werden kann. Eine ausführliche Beschreibung ist bei Ausubel u. a., ebenda, Perbal, ebenda, zu finden. Als Alternative zur In-vitro-Mutagenese kann In-vivo-Mutagenese entweder mit Hilfe von UV-Licht oder von Chemikalien oder durch den Einsatz eines Mutator-Stammes von *E. coli* vorgenommen werden (Fowler u. a., *J. Bacteriol.*, 1986, **167**, 130). Mutagene Nucleotide können mit Hilfe von Apparaturen synthetisiert werden, die von Applied Bio Systems zu beziehen sind.

4. Willkürliche Mutagenese durch enzymatische Fehleinfügung von Nucleotiden

Ein gespaltenes pMa/pMc-Duplex kann der Primer-Verlängerungs- und Fehleinfügungsmutagenese unterzogen werden, wie ursprünglich von Shortle u. a. (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, **79**, 1588) und von B. C. Cunningham und J. A. Wells (*Prot. Eng.*, 1987, **1**, 319) beschrieben wurde; eine Modifikation dieser Verfahrensweise beschreiben Lehtovaara u. a. (*Prot. Eng.*, 1982, **2**, 63). Diese Methode basiert auf der kontrollierten Anwendung von Polymerasen. Vier Populationen von DNA-Molekülen werden zuerst durch Primer-Verlängerung eines gespaltenen Duplex von pMa/pMc erzeugt, so daß sie willkürlich in dem Spalt enden, aber immer unmittelbar von einem bekannten Basentyp (vor A, C, G bzw. T). Jede der vier Populationen wird anschließend in einer getrennten Fehleinfügungsreaktion mutagenisiert, wobei auf die richtige Base jetzt verzichtet werden kann. Auf diese Weise können alle Typen von Basensubstitutionsmutationen in jeder Position des Spaltes erzeugt werden. Der Anwendung von Sequenase (TM) (U. S. Biochemical Corporation) wurde gegenüber dem Einsatz von Klenow-Polymerase der Vorzug gegeben.

Darüber hinaus wurde MoMuLV-Umkehrtranskriptase anstelle von A. M. V.-Umkehrtranskriptase, die von Lehtovaara u. a. (ebenda) eingesetzt wurde, verwendet.

Um Substitutionen an einem Ort zu garantieren, haben wir die folgende Modifikation in das von Lehtovaara, u. a., ebenda, beschriebene Protokoll eingefügt. In dem Umkehrtranskriptasepuffer sind nicht drei Fehleinfügungsnucleotide vorhanden, sondern nur eines. Zum Beispiel wird das A-spezifische, begrenzte Base aufweisende Basenverlängerungsgemisch in drei einzelnen Reaktionen mit 250 µM dCTP, 250 µM dGTP bzw. 250 µM dTTP inkubiert. Für eine vollständige Reihe von 4 basen-spezifischen begrenzten Verlängerungsgemischen wird insgesamt eine Reihe von 12 einzelnen Fehleinfügungsreaktionen ausgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 1,5 Stunden bei 42°C wird eine Masse (Chase) aller vier Desoxynucleotide in einer Konzentration von 0,5 mM zugesetzt, und die Reaktionen werden mindestens weitere 20 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Proben werden dann weiter nach Lehtovaara u. a. (ebenda) bearbeitet, allerdings wird keine Gegenselektion in bezug auf einen uracilhaltigen Strang, sondern eine Gegenselektion, die auf dem pMa/c-Vector basiert, vorgenommen.

5. Produktion von mutierten α -Amylasen

Transformanten von *E. coli* Stamm WK6 (Zell, R., und Fritz, H.J., EMBO J., 1987, 6, 1809), die einen Expressionsvector enthalten und jedes der α -Amylase-Gebilde beherbergen, wurden in TB-Medium (10 ml) bei 30°C geimpft. TB-Medium bestand aus 0,017 M KH_2PO_4 , 0,072 M K_2HPO_4 , 12 g/l Bactotryptone, 24 g/l Bacto-Hefeextrakt, 0,4% Glycerin und einem Antibiotikum (Ampicillin mit pMa- oder Chloramphenicol mit pMc-Gebilden). Proben der Kultur wurden zum Impfen von 250 ml TB in 2-Liter-Kolben verwendet. Bei einem OD_{600} von 10 bis 12 wurden 0,1 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) zugesetzt und die Inkubation weitere 12 bis 16 Stunden fortgesetzt.

6. Reinigung von mutierten α -Amylasen

Die Zellen wurden durch Zentrifugieren geerntet und bei 0°C in 20% Saccharose enthaltendem Puffer resuspendiert. Nach einer zweiten Zentrifugation wurden die Zellen in kaltem Wasser resuspendiert. Zellbruchstücke wurden durch eine dritte Zentrifugierung entfernt, und das Überstehende wurde mit 20 mM TRIS-Puffer auf einen pH-Wert von 8,0 gebracht. CaCl_2 wurde bis zu einer Endkonzentration von 50 mM zugesetzt. Das Material wurde 15 min lang bei 70°C wärmebehandelt, und das unlösliche Material wurde durch Zentrifugieren entfernt. Das Überstehende wurde durch 0,22- μ -Millipore-Filter filtriert und auf ein Zehntel des Ausgangsvolumens eingeeengt.

Weitere Reinigung wurde mit Hilfe von Gelfiltration (aus TSK HW-55-Merck) und Mono-Q-Chromatographie erreicht. Vor der Chromatographie auf Mono S wurde der pH-Wert der enzymatische Aktivität enthaltenden Fraktionen unter Verwendung von Natriumacetat auf 4,8 eingestellt. α -Amylase wurde mit 250 mM NaCl eluiert. Um Inaktivierung zu verhindern, wurde der pH-Wert sofort auf 8,0 eingestellt.

Beispiele

Beispiel 1

Moleklarklonierung von *Bacillus licheniformis* α -Amylase-Gen

Von *Bacillus licheniformis* T5 (EP-A 134048; CBS 470.83) isolierte Chromosomen-DNA wurde mit Restriktionsenzym *EcoRI* digeriert und in die *EcoRI*-Stelle von pUB110 ligiert (Gryczan, T. J., u. a., J. Bacteriol., 1978, 134, S. 318). Das Ligationsgemisch wurde in *Bacillus subtilis* 1A40 (*Bacillus* Genetic Stock Center) transformiert. Neomycinresistente Kolonien wurden in bezug auf die α -Amylase-Produktion auf HI-Agarplatten (DIFCO) mit 0,4 g/l Stärkezusatz (Zulkowsky-Stärke, Merck) getestet. Nach der Züchtung und der Inkubation mit I_2 -Dampf wurde eine positive Kolonie, die einen großen deutlichen Ring erzeugte, zur weiteren Charakterisierung ausgewählt. Es zeigte sich, daß das von dieser positiven Kolonie isolierte Plasmid 3,4 kb *EcoRI*-*EcoRI*-Fragmente, die von dem *Bacillus licheniformis* T5 stammen, enthielt. Dieses Plasmid wurde als pGB33 bezeichnet (EP-A 134048; CBS 466.83). Das α -Amylase codierende Insert wurde an eine synthetische Shine-Dalgarno-Sequenz und den Bakteriophage-SPO2-Promotor ligiert, wodurch Plasmid pProm SPO₂ resultierte (siehe EP-A 0224294; CBS 496.85). Die nach der Methode von Sanger (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 6463) bestimmte Nucleotidsequenz des Inserts von pProm SPO₂ wird in Figur 2 gezeigt. Die Sequenz zeigt ein einziges großes offenes, eine α -Amylase codierendes Leseraster, das tatsächlich mit der von Yuuki u. a. (ebenda) bestimmten α -Amylase Sequenz von *Bacillus licheniformis* identisch ist. Die ersten 29 Aminosäuren sind eine Signalsequenz, die während der Sekretion der α -Amylase abgespalten wird. Die Numerierung der Aminosäure in dieser Anmeldung bezieht sich auf die Numerierung gemäß dem vollentwickelten Protein. Die Yuuki-Sequenz unterscheidet sich in den folgenden Positionen: An Position 134 ist ein Arg anstelle eines Leu vorhanden; an Position 310 ist ein Ser anstelle eines Gly vorhanden; an Position 320 ist ein Ala anstelle von Ser vorhanden.

Beispiel 2

Konstruktion von Mutagenese/Expressions-Vectoren pMaTLia6

Plasmid pROM SPO₂ wurde mit *EcoRI* und *BclI* digeriert, und das 1,8 kb *EcoRI*-*BclI*-Insert wurde gereinigt und in *EcoRI*-*BamHI* digerierten pMa5-8 kloniert. Dieser pMa5-8-Vector war zuvor mit einer modifizierten multiplen Klonierungsstelle versehen worden. Das in Figur 1 von Position 3767 bis zu Position 3786 reichende *BamHI*-*HindIII*-Fragment wurde gegen eine synthetische DNA-Sequenz ausgetauscht, wie sie in Figur 3 von Position 5647 bis 5660 dargestellt ist. Diese Maßnahme diente dazu, einige Restriktionsstellen innerhalb des α -Amylase-Gens einmalig zu machen. Das resultierende α -Amylase enthaltende pMa5-8-Derivat wurde mit *EcoRI* und *BamHI* digeriert und an ein, eine Kopie des TAC-Promotor tragendes synthetisches DNA-Fragment ligiert (De Boer u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80, 21). Die Sequenz dieses synthetischen DNA-Fragmentes ist zusammen mit dem endgültigen α -Amylase Mutagenese/Expressions-Vector pMaTLia6 in Figur 3 von Position 3757 bis Position 3859 dargestellt. Dieser endgültige α -Amylase Mutagenese/Expressions-Vector wurde durch die Einfügung verschiedener ruhiger Restriktionsstellen vervollständigt, deren Aufgabe in der Erzeugung von Spalten in dem α -Amylase-Gen während der Mutagenese-Experimente bestand (Figur 4). Zu diesem Zweck wurden die folgenden Mutationen unter Anwendung von ortsgerechter Oligonucleotid-Mutagenese vorgenommen:

- eine Spel-Stelle wurde durch eine ruhige Mutation eingefügt
T49T und S50S
ACT → ACT AGC → AGT
- eine NarI-Stelle wurde durch die ruhige Mutation eingefügt
A269A
GCG → GCC
- eine BstEII-Stelle wurde unmittelbar hinter dem TAG-Stop-Codon eingefügt
TAGAAGAGC → TAGGTGACC.

Dieser α -Amylase-Mutagenese-Vector pMaTLia6 ist für die Mutagenese mit Hilfe der Spalt-Duplexmethode geeignet. Durch Digestion geeigneter Restriktionsenzyme hergestellte doppelsträngige pMaTLia6-DNA wurde zu einsträngiger pMcTLia6-DNA hybridisiert.

Die resultierenden einsträngigen Spalten wurden ortsgerichteter Mutagenese, chemischer Mutagenese und willkürlicher enzymatischer Mutagenese nach der Beschreibung im experimentellen Teil unterzogen.

Durch die Verfügbarkeit des TAC-Promotors vor dem α -Amylase-Gen ist die induzierbare Expression von α -Amylase in *E. coli* durch die Zugabe von IPTC möglich.

Plasmid pMaTLia6 in *E. coli* WKG wurde am 2. Juni 1989 als CBS 255.89 hinterlegt.

Beispiel 5

Konstruktion eines Bacillus/E. coli Shuttle-Vectors für die Mutagenese und Expression

Dieser Vector ermöglicht die Mutagenese eines eingefügten Gens in *E. coli* und die sofortige Expression in *Bacillus*. Die für die Konstruktion des Vectors gewählte Verfahrensweise bestand in der Kombination eines pUB110 Derivats (Gryczan, ebenda) mit dem pMa/c-Zwillings-Vectorsystem in einer solchen Form, daß:

1. die *B. subtilis*-Kassette durch ein einziges Restriktion/Relegation-Experiment entfernt werden kann;
2. verschiedene α -Amylase-Gene und verschiedene Promotoren leicht in diesen Vector kloniert werden können;
3. das klonierte Gen nach der Rezirkularisation unter der Kontrolle eines geeigneten *Bacillus*-Promotors stehen wird;
4. der *Bacillus*-Promotor und das strukturelle α -Amylase-Gen während der Mutagenese in *E. coli* physikalisch getrennt sind, wodurch eine mögliche lethale Ansammlung von α -Amylase in *E. coli* verhindert wird.

Eine schematische Darstellung des Shuttle-Vectors wird in Figur 5 gezeigt. Die Struktur der endgültigen Version des Vectors pBma/cI wird in Figur 6 dargestellt. Vector pBma1 wurde am 2. Juni 1989 unter der Nummer CBS 252.89 hinterlegt. Der Vector wurde wie folgt konstruiert:

- Das das REP-Gen und das Neo^R-Gen tragende EcoRI-SmaI-Fragment wurde gereinigt und in EcoRI-SmaI digeriertes pUC8 kloniert.
- Das EcoRI-HindIII-Fragment dieses pUC8-Derivats wurde in EcoRI-HindIII digeriertes pMa5-8 kloniert und ergab Plasmid pMa5-80.
- Das BamHI-XbaI Polylinker-Fragment wurde durch ein synthetisches Fragment von DNA, das den SPO₂-Promotor von Bakteriophage SPO₂ (Williams u. a., J. Bacteriol., ... [unleserlich]) plus Restriktion/Erkennungsstellen für SacI, ApaI, XhoI, SacI, BglI, MluI und XbaI kodiert, substituiert.
- Die einmalige EcoRI-Stelle von pMa5-80 wurde für die Einfügung eines Polylinkerfragmentes verwendet, wodurch die folgenden Erkennungsstellen EcoRI, SmaI, SacI, EcoRV, SphI, KpnI, XbaI und HindIII gebildet wurden.

Für spezifische Zwecke wurden die Derivate pBma/c2 und pBma/c6 aus pBma/c1 entwickelt.

- In pBma/c2 wurde der EcoRI-HindIII-Polylinker von pBma/c1 durch den entsprechenden Polylinker von pUC19 ersetzt.

- In pBma/c6 wurde außerdem die SacI-Stelle in dem rechten Polylinker von pBma/c1 durch eine Klenow-Reaktion entfernt.

Nach der Konstruktion von pBma/c6 wurde ortsgerichtete Mutagenese am *B. licheniformis* α -Amylase-Gen vorgenommen.

Dieser Vector wurde durch die Ligation des von pMaTLia6 isolierten BamHI-HindIII-Fragmentes in das oben genannte pBma/c6, das durch BamHI und HindIII gespalten war, konstruiert. Das resultierende Plasmid (Figur 7) kann zur Konstruktion gespalteener Duplexe zur Mutagenese in *E. coli* verwendet werden.

Die resultierenden Mutanten sind nach der Restriktion mit SacI, Religation und Transformation nach Chang und Cohen (Mol. Gen. Genet., 1979, 168, 111) in *Bacillus subtilis* 1 A40 (BGSC 1 A10) exprimiert worden.

Beispiel 4

Expression von einwandfrei vollentwickelter Bacillus licheniformis α -Amylase in E. coli

Die Charakterisierung der durch pMaTLia6 erzeugten α -Amylase (Beispiel 2) zeigte, daß ein Teil der α -Amylase während der Sekretion ungenau verarbeitet worden war. NH₂-terminale Sequenzierung ergab einen zusätzlichen Alaninrest für in *E. coli* WK6 erzeugte α -Amylase.

Obwohl es keinen Hinweis gibt, daß dieser zu unterschiedlichen Eigenschaften bei der Amylase führt, haben wir die α -Amylase-Signalsequenz durch die Signalsequenz der alkalischen Phosphatase phoA ersetzt. Zu diesem Zweck wurde ein Mutagenese-Experiment vorgenommen, um eine FspI-Restriktionsstelle in pMaTLia6 an der Verbindungsstelle von dem Signalpeptid und der ausgereiften α -Amylase einzufügen. Nach der FspI- und BamHI-Digestion wurde ein die phoA-Signalsequenz kodierendes synthetisches DNA-Fragment (Michelis u. a., J. Bacteriol., 1983, 154, 366) eingefügt. Die Sequenz dieser Konstruktion wird in Figur 8 gezeigt. Es wurde nachgewiesen, daß durch pMa)cTPLia6 erzeugte α -Amylase die richtige NH₂-terminale Sequenz besitzt.

Beispiel 5

Screening in bezug auf beständige α -Amylase

A. Screening in bezug auf säurebeständige α -Amylase-Mutanten

α -Amylase-Mutanten, die sich bei niedrigem pH-Wert besser oder schlechter verhalten als Wildtyp- α -Amylase, können durch einen Vergleich von Ringen auf Stärkeplatten ausgewählt werden, die nach dem Färben der Stärke mit einer Jodlösung auf verschiedene pH-Werte gepuffert worden sind.

Methode:

1. Züchtung

Mögliche Mutanten werden in Mikrotiterplatten gezüchtet. Als Züchtungssubstrat dienen 250 µl Brain-Heart- Infusion-Brühe (DIFCO). Folgende Zugaben werden vorgenommen:

Chloramphenicol 50 µg/ml
I. P. T. G. (Sigma) 0,2 mM
CaCl₂ 2 mM

Kolonien werden mit Hilfe steriler Pinzetten von den Agarplatten entnommen und in getrennten Vertiefungen (96) einer Mikrotiterplatte geimpft. In jeder Platte befinden sich 4 Wildtyp-Kolonien als Kontrolle.

Diese Mikrotiterplatten werden 40 Stunden lang ohne Schütteln bei 37°C gehalten.

2. Plattentest

Nach diesem Zeitraum, in dem die α-Amylase erzeugt wird, werden 5-µl-Proben aus jeder Vertiefung entnommen und auf zwei verschiedene Arten von Agarplatten (114 × 140 mm) aufgetropft. Die erste Art ist eine an Heart-Infusion (DIFCO) reiche Agarplatte + 0,4% Stärke (Zulkowsky Stärke – Merck) + 50 µg/ml Chloramphenicol. Nach einer Inkubationszeit von 16 Stunden bei 37°C dient diese Platte als Speicher für Mutanten.

Die zweite Art von Platten ist die echte Screeningplatte, die enthält:

Bacto Agar (DIFCO) 1,5 %
Zulkowsky Stärke 0,2 %.

Agar und Stärke werden in synthetischem Leitungswasser (STW) gelöst. Bei diesem handelt es sich um entmineralisiertes Wasser plus

CaCl₂ 2 mM
MgCl₂ 1 mM
NaHCO₃ 2,5 mM
BSA 10 µg/ml.

Die Screeningplatten werden durch eine 100fache Verdünnung einer 5 M Vorratslösung von Kaliumacetatpuffer in diesem Medium gepuffert. Die pH-Werte der Vorratslösung betragen 4,80, 5,0 und 5,2 bei Raumtemperatur. Die in den Agarplatten gemessenen endgültigen pH-Werte sind etwas niedriger als diejenigen der Vorratslösungen. Aus jeder Vertiefung werden 5 µl Kultur auf 3 Screeningplatten mit unterschiedlichen pH-Werten aufgetropft.

Der pH-Bereich wird in einer solchen Weise gewählt, daß bei der Wildtyp-α-Amylase auf der Platte mit dem niedrigsten pH-Wert nur geringe oder keine Aktivität zurückbleibt.

3. Färbung

Die Screeningplatten werden 2 Stunden lang bei 55°C inkubiert. Nach diesem Zeitraum wird eine I₂-Lösung über die Platten gegossen. 10 × I₂-Lösung enthält 30 g I₂ und 70 g KI je Liter.

Das Ausmaß der Fleckenbeseitigung wird mit der zurückbleibenden α-Amylase-Aktivität bei diesem pH-Wert korreliert.

Diejenigen Mutanten, die sich als besser als die Wildtypkontrolle erwiesen, werden für eine zweite Screeningrunde gewählt.

Wildtyp-Ringe sind bei diesem Experiment sehr gut reproduzierbar.

4. Zweites Screening

Positive Mutanten werden von der ergiebigen Platte entnommen und auf frischen HI-Platten + Chloramphenicol gereinigt.

4 einzelne Kolonien werden von jedem Mutanten entnommen und wieder in ähnlicher Form wie bei dem ersten Screening getestet. Außerdem werden Serienverdünnungen dieser Kulturen mit STW vorgenommen, und diese Verdünnungen werden auf Screeningplatten mit neutralem pH (pH = 7,0) aufgetropft. Durch einen Vergleich mit Wildtyp-Kulturen kann entschieden werden, ob das bessere Verhalten bei niedrigem pH-Wert auf eine insgesamt bessere α-Amylaseproduktion oder auf die wirklich beständigere α-Amylase zurückzuführen ist.

Die das zweite Screening „überlebenden“ Mutanten werden durch Bestimmen der Nucleotidsequenz von demjenigen Teil des Gens, der der Mutagenese unterzogen wurde, charakterisiert.

B. Screening in bezug auf alkalibeständige α-Amylase

Das Screening in bezug auf alkalibeständige α-Amylasen wird in einer ähnlichen Weise vorgenommen, wie es für säurebeständige α-Amylase angewandt wurde. Nach der Züchtung in Mikrotiterplatten werden 5-µl-Proben aus jeder Vertiefung entnommen und auf Speicherplatten und auf die eigentliche Screeningplatte aufgetropft. Letztere ist zusammengesetzt aus:

Bacto Agar (DIFCO) 1,5 %
Zulkowsky Stärke 0,2 %
und ergänzt durch entmineralisiertes Wasser plus
CaCl₂ 2 mM
MgCl₂ 1 mM
NaHCO₃ 2,5 mM
BSA 10 µg/ml.

Die Screeningplatten werden mit 50 mM Carbonat/Hydrogencarbonat-Puffer auf pH-Werte von 9,0, 9,5 und 10,0 gepuffert. Der pH-Bereich wird so gewählt, daß bei dem höchsten pH-Wert geringe oder keine Aktivität der Wildtyp-α-Amylase zu verzeichnen ist. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden bei 55°C wird eine I₂-Lösung über die Platten gegossen. Für eine zweite Screeningrunde werden diejenigen Mutanten, die einen besseren Ring als das Wildtyp-Enzym aufweisen, ausgewählt. Diese zweite Screeningrunde wird in einer ähnlichen Weise wie das Screening in bezug auf Säurebeständigkeit vorgenommen.

C. Screening in bezug auf wärmebeständige α-Amylase-Mutanten

α-Amylase-Mutanten, die bei einer hohen Temperatur ein besseres oder schlechteres Verhalten als die Wildtyp α-Amylase zeigen, können gleichfalls durch einen Vergleich der Ringe auf den Stärkeplatten, die durch die zurückbleibende Amylaseaktivität in dem Kultursubstrat nach der Erwärmung entstehen, ausgewählt werden.

Methode:

1. Mutanten werden in der gleichen Weise wie für das pH-Screening gezüchtet.
 2. Die Mutanten werden auf HI-Agarplatten wie für das pH-Screening repliziert.
 3. Die einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatten werden mit Einwegkappen (Flow Laboratories) verschlossen, um das Verdampfen von Kultursubstrat während des Erwärmungsvorganges zu verhindern.
 4. Mikrotiterplatten werden 1 Stunde lang in einem Wasserbad auf 95°C gehalten. Nach dem Erwärmen werden die Mikrotiterplatten in eine Zentrifuge gestellt, um die gesamte Probe am Boden der Mikrotiterplatte zu sammeln.
 5. Das Screening in bezug auf wärmebeständige Mutanten wurde folgendermaßen ausgeführt:
Aus jeder Vertiefung wurden 5 µl Kultur auf neutrale Screeningplatten aufgetropft (siehe pH-Screening). Diese Platten wurden 1 Stunde lang bei 55°C inkubiert. Nach dem Färben der Stärke mit der Jodlösung können Mutanten und Kontrollen in bezug auf zurückgebliebene α-Amylase-Aktivität durch Vergleich der Helligkeit der Flecken (Ringe) gescreent werden. Falls die Restaktivität der Kontrollen zu hoch ist, müssen Serienverdünnungen angefertigt und auf die Screeningplatte aufgetropft werden, um Mutanten ermitteln zu können, die wärmebeständiger als das Wildtyp-Enzym sind.
 6. Mögliche interessierende Mutanten werden weiter wie bei der pH-Screeningmethode getestet.
- Eine Kombination von Screeningart A oder B mit Art C kann angewandt werden, wenn eine Kombination von Eigenschaften verlangt wird. Nach der ersten Screeningrunde in bezug auf alkalibeständige α-Amylase kann zum Beispiel eine zweite Screeningrunde hinsichtlich der Wärmebeständigkeit vorgenommen werden. Diejenigen Mutanten, die sich bei beiden Tests als positiv erweisen, können als Kandidaten ausgewählt werden, die eine Kombination von verlangten Eigenschaften aufweisen.

Beispiel 6

Hydrogensulfit-Mutagenese von pMaTLia6

Einsträngige DNA von pMaTLia6 wurde mit SacII-ClaI digeriertem pMcTLia6 hybridisiert, um einen Heteroduplex mit einem von Position 4315 bis 4569 reichenden Spalt zu gewinnen (Figur 2). Dieser Heteroduplex wurde der Hydrogensulfit-Mutagenese unterzogen (siehe experimenteller Teil).

Nach der Transformation in *E. coli* WK6 Mut 6 (Zell, R., und Fritz, H. J., ebenda) und der Selektion auf Chloramphenicol enthaltenden Agarplatten (50 µg/ml) wurden Plasmidpools isoliert und in *E. coli* WK6 transformiert. *E. coli* WK6 Mut S wurde als CBS 472.88, *E. coli* WK6 als CBS 473.88 hinterlegt. Resultierende Transformanten wurden in BHI-Medium (DIFCO), das 2,0 mM CaCl₂, 50 µg/ml Chloramphenicol und 0,20 mM IPTG (SIGMA) enthielt, 40 Stunden lang bei 37°C in Mikrotitervertiefungen ohne Schütteln gezüchtet. Das Screening in bezug auf pH-beständige Mutanten wurde wie in Beispiel 5 beschrieben vorgenommen. Etwa 300 Cm^R Transformanten wurden gescreent. Die durch DNA-Sequenzierung bestimmte Mutationshäufigkeit betrug durchschnittlich 0,4 Mutation/Molekül über dem Spalt. Ein säurebeständiger Mutant, D7, wurde nach dem pH-Screening identifiziert. Die Sequenzierung dieses Mutanten ergab Mutation H133Y, die ihren Ursprung in einer Mutation des kodierenden Triplets von CAC bis TAC hatte.

Mutant D7 erwies sich auch bei der Screeninganalyse hinsichtlich der Wärmebeständigkeit als positiv (Beispiel 5).

Die DNA-Sequenzierung erfolgte bei einsträngiger DNA mit einem spezifischen Oligonucleotid, das für die Exprimierung unmittelbar vor dem SacII-ClaI-Fragment ausgelegt war. In einem getrennten Mutagenese-Experiment wurden 1000 Cm^R Transformanten gescreent. Nach dem pH-Screening wurde ein weiterer säurebeständiger Mutant, D25, identifiziert. Dieser Mutant hat die folgenden Mutationen:

H133Y CAC → TAC

T149I ACA → ATA.

Hydrogensulfit-Mutagenese ist in einer ähnlichen Form, wie sie eben beschrieben wurde, am ClaI-Sall-Spalt, der von Position 4569 bis Position 4976 von Figur 3 reicht, angewandt worden. Etwa 300 Cm^R Transformanten wurden gescreent (Mutationshäufigkeit 0,6 Mutationen/Molekül). Es wurden keine säurebeständigen Transformanten gefunden. Eine Anzahl säurelabiler Mutanten wurde ermittelt. Von diesen säurelabilen Mutanten können einige ein verschobenes pH-Spektrum haben, was zu einem alkalibeständigeren Phänotyp führt.

Beispiel 7

Enzymatische Mutagenese von pMaTLia6

Einsträngige pMaTLia6 (Figur 4) wurde mit ClaI-Sall digerierter pMcTLia6 zur Gewinnung eines von Position 4569 bis 4976 (Figur 3) reichenden Heteroduplex hybridisiert. Der gespaltene Duplex wurde einer enzymatischen Fehleinfügungs-Mutagenese nach der Beschreibung im experimentellen Teil unterzogen.

Eine nach dATP-begrenzter Primerverlängerung gewonnene Probe wurde in drei Teile aufgespalten und in Gegenwart von Umkehrtranskriptase mit dCTP, dGTP bzw. dTTP inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 37°C wurde eine Menge (chase) mit allen vier dNTP's und Klenow-Polymerase gegeben, T4-DNA-Ligase wurde zugesetzt, um die Verlängerung bis zu vollkommen doppelsträngigen Molekülen zu beenden.

Diese Moleküle wurden in *E. coli* WK6 Mut S transformiert, und Plasmidpools wurden gewonnen. Diese Plasmidpools wurden anschließend in *E. coli* WK6 transformiert, und die Kolonien wurden auf Chloramphenicol (50 µg/ml) enthaltende Agarplatten selektiert. Resultierende Mutanten wurden in bezug auf die Beständigkeit von α-Amylase nach der Beschreibung in Beispiel 5 gescreent.

Bei einem anderen Experiment wurde der SpeI-SacII-Spalt begrenzter Primerverlängerung mit dATP, dCTP, dGTP bzw. dTTP unterzogen. Diese Primerpools wurden durch Fehleinfügung mutagenisiert (siehe experimenteller Teil). 100 Cm^R Transformanten wurden auf pH-Platten getestet (Beispiel 5), und von Mutant M29 wurde ermittelt, daß er bei niedrigem pH beständiger ist. Die Sequenz der Mutation wurde bestimmt:

A111T GCG → TCG.

Beispiel 8**Eigenschaften beständiger Mutanten**

Zwei aus den Hydrogensulfit-Mutagenese-Experimenten gewonnene Mutanten wurden weiter charakterisiert. Wie oben beschrieben führte DNA-Sequenzierung zu den folgenden Aminosäureaustauschmöglichkeiten:

- D7 enthielt ein Tyrosin an Position 133 anstelle eines Histidins (D7 = H133Y),
- 2D5 enthielt die D-7-Mutation, und außerdem war Threonin 149 durch Isoleucin ersetzt worden (2D5 = H133Y, T149I).

a) Messung der enzymatischen Aktivität

Die enzymatische Aktivität von *B. licheniformis* α -Amylase WT und von Mutanten wurde unter Anwendung von 4 Nitrophenyl-maltopentaosid (4NP-DP5) als Substrat gemessen, 4 Nitrophenol und Maltopentaose werden gebildet, diese Reaktion kann durch Messen der Veränderung in OD405 verfolgt werden. Die Analyse wurde bei 35°C in 50 mM MOPS, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ (pH 7,15) und 0–1 mM 4NP-DP5 vorgenommen.

Anfangsraten wurden gemessen, und E-Nitrophenol wurde als 17000 l/M/cm angenommen. Figur 9 zeigt die Ergebnisse für WT und 2D5- α -Amylasen. V_{max} und K_m wurden berechnet und sind in Tabelle I aufgeführt.

Tabelle I

	V _{max} (μMol/min/mg)	K _m (mM)
WT	66,7 ± 0,9	0,112 ± 0,005
2D5	66,3 ± 0,7	0,119 ± 0,004

Tabelle I zeigt ganz deutlich, daß die Mutationen von α -Amylase 2D5 die enzymatische Aktivität nicht in erheblicher Weise beeinflussen.

b) Einfluß von Ca²⁺ auf die Wärmeinaktivierung

Versuche zur Wärmeinaktivierung wurden für WT, D7 und 2D5 bei unterschiedlichen Calciumkonzentrationen vorgenommen. Die Verfahrensweise war folgendermaßen:

1) Demetallisierung

Enzym (2–3 mg/ml) 25 h lang dialysiert in

3 × 1 l 20 mM MOPS

5 mM EDTA

5 mM EGTA, pH 7,0

3 × 1 l 20 mM MOPS, pH 7,0.

2) Remetallisierung

– 500 μl Puffer 100 mM (z. B. MES, MOPS, EPPS)

– 145 μl demetallisiertes Enzym (z. B. 2,15 mg/ml)

– 100 μl CaCl₂ (100, 50, 30, 20, 10, 5 oder 2,5 mM)

– x μl K₂SO₄ (100 mM)

– (255 – x) μl H₂O

[CaCl ₂] endgültig (mM)	[K ₂ SO ₄] endgültig (mM)
0,25	14,75
0,5	14,5
1	14
2	13
3	12
5	10
10	0

+ – pH MES, z. B. 6,77 bei Raumtemperatur wird 6,0 bei 90°C ergeben (pK_a 6,15 pK_a/°C = –0,011).

– pK_a stammte von Merck-Tabelle (Zwitterionische Puffersubstanzen).

3) Wärmeinaktivierung

1 ml bei Raumtemperatur vorinkubierte Enzymlösung wurde in geschlossenen Pierce-Fläschchen (teflonbeschichtete Dichtungen) in einer Konzentration von etwa 0,2 mg/ml auf 90,5°C oder 95°C erwärmt. In regelmäßigen Abständen von 0 und 6 h wurden 50-μl-Proben mit einer Spritze entnommen und auf Eis gekühlt. Restaktivitäten sind mit 4NP-DP5 (0,5 mM) bestimmt worden.

Die Halbwertszeiten wurden mit Hilfe eines einfachen exponentiellen Verzögerungs-Anpassungsprogramms (GRAPHAD) bestimmt.

Die Figuren 10 und 11 zeigen Halbwertszeiten von WT- und D7- α -Amylasen bei pH-Werten von 5,5 bzw. 7,0 in Abhängigkeit von der Ca²⁺-Konzentration bei 90,5°C. Die Ca²⁺-Abhängigkeit von 2D5 wurde nur bei pH 7,0 bei 95°C bestimmt (Figur 12). Es ist auch zu erkennen, daß sich die Ca²⁺-Abhängigkeit der Mutanten nicht von der von WT unterscheidet.

c) Wärmebeständigkeit von mutierten α -Amylasen bei verschiedenen pH-Werten

Die pH-Abhängigkeit der Wärmeinaktivierung wurde für D7 und 2D5 bei 90,5°C bzw. 95°C unter Anwendung des Puffers nach obiger Beschreibung bei einer 1 mM Ca²⁺-Konzentration bestimmt. Es kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß die Wärmebeständigkeit von D7 und 2D5 über den gesamten pH-Bereich erheblich zugenommen hat (bis zum Doppelten bei 2D5) (Figuren 13 und 14).

Beispiel 9

Produktion von mutierten Enzymen in *Bacillus*

Mutationen in der *B. licheniformis* α -Amylase, die durch Expression in *E. coli* WK6 identifiziert wurden, wurden auf zwei unterschiedlichen Wegen auf einen *Bacillus*-Expressionsvector übertragen.

a. Mit Hilfe der einmaligen Restriktionsstellen innerhalb des α -Amylase-Gens (Figur 4) wurden Mutationen tragende Fragmente von pMaTLia6-Mutanten isoliert und in die homologe Position von pBMa6.Lia6 subkloniert. Das letztere Plasmid, das entweder in *E. coli* oder *Bacillus* repliziert werden kann, wurde anschließend mit *SacI* digeriert und mit T4-DNA-Ligase zirkularisiert. Nach der Transformation in *Bacillus subtilis* 1A10 wurde ein hoher Grad von α -Amylase-Produktion unter der Kontrolle des SPO_2 -Promotors erzielt. Rezirkularisierte pBMa6.Lia6 wird pB6.Lia6 genannt, um die Entfernung des *E. coli*-Anteils des Vectors zu kennzeichnen.

b) Einsträngige pBMa6.Lia6-DNA wurde von *E. coli* gewonnen und mit Restriktionsenzym digerierter doppelsträngiger pBMc.6Lia6 digeriert, um einen gespaltenen Duplex mit dem beabsichtigten Spalt in dem α -Amylase-Gen zu erhalten. Dieser Spalt wurde anschließend ortsgerichteter Mutagenese mit einem Oligonucleotid (wie im experimentellen Teil beschrieben) unterzogen, das die verlangte Mutation kodiert. pBMc.6Lia6-Vector wird dann nach obiger Beschreibung in einen Vector des pB6.Lia6-Typs transformiert. Eine Kombination von verschiedener Mutation an einem Ort kann durch Methode a) vorgenommen werden, wenn die Mutationen in verschiedenen Spalten vorhanden sind, vorzugsweise wird aber Methode b) angewandt. Die Mutationen der Mutanten D7 und 2D5 wurden mit Hilfe von Methode a) in pBMa6.Lia6 übertragen, indem die *SacI*-Sall-Fragmente ausgetauscht wurden, und α -Amylase wurde aus dem Medium von transformiertem *Bacillus subtilis* 1A10 zurückgewonnen. Überstehendes beider Mutanten wurde den Screeningverfahren der Beispiele unterzogen, und es wurde bestätigt, daß beide Mutanten α -Amylase produzieren, die säurebeständiger und wärmebeständiger als α -Amylase ist, die von Wildtyp-pB6.Lia6 erzeugt wird.

Der Phänotyp der α -Amylase-Mutationen in *Bacillus* unterscheidet sich somit nicht vom Phänotyp in *E. coli*. Schließlich wurden pB6.Lia6-Mutanten in *Bacillus licheniformis* T9 transformiert, bei dem es sich um ein proteasenegatives, α -Amylase-negatives, α -Amylase-negatives Derivat von *Bacillus licheniformis* T5 handelt (Ep-0253455, CBS 470.83). Wirts T9 wurde zur Erzeugung großer Mengen von α -Amylase-Mutanten in einem homologen System eingesetzt. Durch die Entfernung des Chromosomen- α -Amylase-Gens ist dieser Stamm für die Produktion von mutierter α -Amylase sehr geeignet, weil keinerlei verunreinigende Wildtyp- α -Amylase erzeugt wird. Von diesem Stamm gewonnenes Enzym ist für die industrielle Anwendungserprobung verwendet worden. Es wurde die industrielle Verwendung der Mutanten pB6.Lia6.2D5 und pB6.Lia6.D7 demonstriert.

Beispiel 10

Anwendungstest von mutierter α -Amylase unter den Bedingungen der Stärkeverflüssigung

Zur Erprobung von mutierter α -Amylase 2D5 unter realistischeren Bedingungen wurden die Fermentationsbrühe (von Beispiel 9) durch Ultrafiltration gereinigt und das Enzym mit 50% Propylenglycol formuliert.

Es wurden drei Proben getestet:

893701: WT *B. licheniformis* T5 α -Amylase 1530TAU/g

893703: 2D5 Mutant, hergestellt als WT 2820TAU/g

Maxamyl 0819 Kommerzielle Probe 7090TAU/g.

Ein TAU (wärmebeständige α -Amylase-Einheit) wird als die Menge Enzym definiert, die unter standardisierten Bedingungen 1 mg Stärke pro Minute in ein Produkt umwandelt, daß nach der Reaktion mit Jod die gleiche Absorption für eine Bezugsfarbe bei 620nm aufweist. Standardbedingungen sind pH 6,6; 30°C; Reaktionszeit: 20 min. Als Bezugsfarbe dienen 25 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 3,84 g $K_2Cr_2O_7$ und 1 ml HCL (1M) in 100 ml destillierten H_2O .

1. Verflüssigungstest bei niedrigem pH (5,5 und 5,25)

Die Temperatur der Stärkeaufschlammung wird so schnell wie möglich auf $110^\circ C \pm 0,5^\circ C$ erhöht und 6 Minuten lang auf diesem Wert gehalten.

Die Verflüssigung wird bei kontinuierlichem Fließen (5,4l/h) realisiert. 3 Proben von 135 ml (1,5 Minuten Verflüssigung) werden nach 45, 60 und 75 Minuten Verflüssigung entnommen und zwei Stunden lang auf $95^\circ C$ gehalten. Danach werden 50 ml der Probe mit 0,4 ml H_2SO_4 N angesäuert, um einen pH-Wert von 3,5 zu erzielen, und 10 Minuten lang in ein siedendes Bad gesetzt, um die enzymatische Aktivität vor der D.E.-Bestimmung zu stoppen.

Der übrige Teil der Probe wird gekühlt, um die enzymatische Restaktivität zu bestimmen.

Aufschlammungszusammensetzung:

3,3 kg Maisstärke D.S. 88% (2,904 kg Trockenstärke)

5,45 l Brunnenwasser (40 T.H.)

Trockensubstanz der Aufschlammung beträgt 33%.

Der pH wird mit 1 N Schwefelsäure oder 1 N NaOH auf 5,5 korrigiert.

Enzymkonzentration: 4,4 TAU/g Trockenstärke.

Die Fließgeschwindigkeit wird zwei- oder dreimal während des Versuchs überprüft.

2. Bestimmung von D.E.

Die Trockensubstanz verflüssigter Stärke wird mit einem Refraktometer überprüft (etwa 34%). D.E. wird mit Hilfe der allgemein bekannten Lane Eynon Methode bestimmt. Die Ergebnisse sind in Figur 15 wiedergegeben.

3. Enzymatische Restaktivität

Amylaserestaktivität in verflüssigter Stärke wird mit Hilfe eines Brabender-Amylographen bestimmt.

40 g Kartoffelstärke

330 ml destilliertes Wasser mit $50^\circ C$

50 ml Tris-Puffer 0,05 M, pH 6,50

5 ml $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ von 30 g/l

Die Temperatur wird auf 80 °C erhöht (1,5 °/min), nach Stabilisierung der Viskosität (10 min) werden 5 ml verdünnte verflüssigte Stärke (7 g bis 50 ml mit destilliertem Wasser) zugegeben, die Abnahme der Viskosität nach 20 Minuten wird gemessen, diese Abnahme ist eine Funktion der enzymatischen Aktivität. Mit Hilfe einer Standardkurve mit bekannter enzymatischer Konzentration kann die Restaktivität in T.A.U. ermittelt werden. Mutierte 2 D5 verhält sich erheblich besser bei pH < 5,5 und 110 °C als WT-Enzyme. Eine Verbesserung von 2–3 DE-Einheiten bei pH 5,25 kann mit mutierter 2 D5 erzielt werden.

Beispiel 11

Anwendungstest von mutierter α -Amylase unter den Bedingungen der Textilentschlichtung

Zur Prüfung der industriellen Anwendungsmöglichkeit von alkalischer α -Amylase-Mutanten wird ein Test in bezug auf die Beständigkeit bei 20 °C in der folgenden Lösung durchgeführt:

1,4% H₂O (35%)

1,0–1,5% Natriumhydroxid (100%)

15–20 ml/l Natriumsilicat (38 Be)

0,3–0,5% Alkylbenzensulfonat (Lanaryl N.A. ICI)

0,5–1,0% Organisches Stabilisierungsmittel (Tinoclarite G).

Nach einer Inkubationszeit von 2,5 Stunden sollten die hinsichtlich ihrer beabsichtigten Eigenschaften ausgewählten α -Amylase-Mutanten irgendwelche zurückbleibende Enzymaktivität besitzen.

```

      10      20      30      40      50      60
AATTCACCTCGAAAGCAAGCTGATAAACCGATACAATFAAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTT

      70      80      90     100     110     120
TTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCGAAGCTAATTCACCTC

      130     140     150     160     170     180
GAAAGCAAGCTGATAAACCGATACAATFAAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTTTTTTTGGAG

      190     200     210     220     230     240
ATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCGAAGCTCTGCCTCGCCCGTTTCGGTG

      250     260     270     280     290     300
ATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAG

      310     320     330     340     350     360
CGGATGCAGATCACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGC

      370     380     390     400     410     420
GCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTT

      430     440     450     460     470     480
CCTTTCTCGCCACGTTTCGCGGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAG

      490     500     510     520     530     540
GGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTCATTAGGGTGATGGTT

      550     560     570     580     590     600
CACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGT

      610     620     630     640     650     660
TCTTTAATAGTGGACTCTTGITCCAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATT

      670     680     690     700     710     720
CTTTTGATTTATAAGGGATTTTCCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTT

      730     740     750     760     770     780
AACAAAAATTTAACCGGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTGATCTCGCTCG

      790     800     810     820     830     840
GTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA

      850     860     870     880     890     900
GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAAC

      910     920     930     940     950     960
CGTAAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCGCCCCCTGACGACATCAC

      970     980     990    1000    1010    1020
AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCG

      1030    1040    1050    1060    1070    1080
TTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC

      1090    1100    1110    1120    1130    1140
CTGTCCGCCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTAT

```

Figure 1

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 CTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAG
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 CCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGAC
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 TTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGTTAACAGGATTAGCAGAGCCAGGTATGTAGGCGGT
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 GCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGT
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 ATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGC
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 AAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGA
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTOATCTTTTCTACGGGCTCTGACGCTCAGTGGAAC
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 GAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATC
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 CTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCT
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 GACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCA
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 TCCATAGTTGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCT
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 GGGCCAGTGCTGCAATGATACCOCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCA
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 ATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCC
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 ATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTG
 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 CGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGCCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCT
 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 TCATTACAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGCGGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAA
 2110 2120 2130 2140 2150 2160
 AAAGCGCTTAGCTCCITCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGCGCCGAGTGTTA
 2170 2180 2190 2200 2210 2220
 TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGC
 2230 2240 2250 2260 2270 2280

Fig. 1 (continued)

TTTTCTGTGACTGGTGAAGTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCG
 2290 2300 2310 2320 2330 2340
 AGTTGCTCTTGGCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAA
 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 GTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTG
 2410 2420 2430 2440 2450 2460
 AGATCCAGTTCCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTC
 2470 2480 2490 2500 2510 2520
 ACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGG
 2530 2540 2550 2560 2570 2580
 GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCAGACAG
 2590 2600 2610 2620 2630 2640
 TTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAAGATTTTGAGA
 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 CACAACGTGGCTTTTGTGAATAAATCGAACTTTTGCTGAGTTGACTCCCCGCGCGGATG
 2710 2720 2730 2740 2750 2760
 GGTGCAATTTGCTTTTCAAAAAAAGCCCGCTCATTAGCGGGGCTAAAAAAGCCCGCT
 2770 2780 2790 2800 2810 2820
 CATTAGCGGGCTCGAAATTTCTGCGATTTCATCGGCTTATTATGAGTTATTGAGGCTAAG
 2830 2840 2850 2860 2870 2880
 AACCAGGCGTTTAAGGGCACCAATAACTGCCCTTAAAAAATTACGCCCCGCCCTGCCACT
 2890 2900 2910 2920 2930 2940
 CATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAGACGG
 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 CATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCCTTGGGTATAATATTTC
 3010 3020 3030 3040 3050 3060
 CCATACTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTGTCCATATTGCCACGTTTAAATCAAACTGG
 3070 3080 3090 3100 3110 3120
 TGAAACTCACCCAGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAATAAACCTTTAGGGA
 3130 3140 3150 3160 3170 3180
 AATAGCCCAGGTTTTCACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCC
 3190 3200 3210 3220 3230 3240
 GGAATCGTCGTGGTATTCACTCCAGAGCGATGAAAACGTTTCAGTTTGCTCATGAAAA
 3250 3260 3270 3280 3290 3300
 CGGTGTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCCTTTTCATTGCCATAG
 3310 3320 3330 3340 3350 3360
 GAAATTCGGCATGAGCATTTCATCAGGCGGGCAAGAATGTGAATAAAGCCCGGATAAACT

Fig. 1 (continued)

3370	3380	3390	3400	3410	3420
TGIGCTTATTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTAAACGGTCTGGT					
3430	3440	3450	3460	3470	3480
TATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACCATGCCATTGGG					
3490	3500	3510	3520	3530	3540
ATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTG					
3550	3560	3570	3580	3590	3600
AAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTTCATTATGGTQAAAGT					
3610	3620	3630	3640	3650	3660
TGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTGGCCCAGGGCTTCC					
3670	3680	3690	3700	3710	3720
CGGTATCAACAGGGACACCAAGGATTTATTTATTTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCACAAGTA					
3730	3740	3750	3760	3770	3780
TTTATTCGAAGACAAAAGGGCATCGCGCGCGGGAATTCCCGGGGATCCGTCGACCTGCA					
3790	3800				
GCCAAGCTTGGTCTAGAGGTCGA					

Fig. 1 (continued)

10 20 30 40 50 60
 GTCTACAAACCCCTTAAAAACGTTTTTAAAGGCTTTTAAGCCGTCTGTACGTTCCCTAAG
 70 80 90 100 110 120
 GAATTCACACTGGCCTTGGTTAAGGTTAAGATGTGGACGGAATGGGTAAAGTGTAGTAAA
 130 140 150 160 170 180
 GTACAATTAATCGGGAGCTTAGATGTCCCTTCAACATCTTATATAGAAGGGAAGGTTGCC
 190 200 210 220 230 240
 AAATGGAAATTGAAAGAAITTAACGAGCATACAGTAAAATTTTATATGTCCTTACGGAGATA
 250 260 270 280 290 300
 TTGAAGATCGCGGTTTTTGACAGAGAAGAAATTTGGTATAACCGTGAGCGCAGTGAAGAAC
 310 320 330 340 350 360
 TTTTCTGGAAAGTCATGGATGAAGTTCATGAAGAAGAGGAATTCGAGCTCGCCCGGGGAT
 370 380 390 400 410 420
 CCAAGGAGGTGATCTAGAGTCATGAALCAACAAAAACGGCTTTACGCCCGATTGCTGACG
 M K Q Q K R L Y A R L L T
 430 440 450 460 470 480
 CTGTTATTTGCGCTCATCTTCTTGCTGCCTCATTTCTGCAACAGCGCGCGGCAAATCTTAAT
 L L F A L I F L L P H S A A A A A N L N
 490 500 510 520 530 540
 GGGACCGTGATGCAGTATTTTGAATGGTACATGCCCAATGACGGCCAACATTGGAAGCGT
 G T L M Q Y F E W Y M P N D G Q H W K R
 5
 550 560 570 580 590 600
 TTGCAAAACGACTCGGCATATTTGGCTGAACACGGTATTACTGCCGTCTGGATTCCCCCG
 L Q N D S A Y L A E H G I T A V W I P P
 25
 610 620 630 640 650 660
 GCATATAAGGGAACGAGCCAAGCGGATGTGGGCTACGGTGCTTACGACCTTTATGATTTA
 A Y K G T S Q A D V Q Y G A Y D L Y D L
 45
 670 680 690 700 710 720
 GGGGAGTTTCATCAAAAAGGACGGTTCCGACAAAAGTACGGCAGAAAAGGAGAGCTGCAA
 G E F H Q K G T V R T K Y G T K Q E L Q
 65
 730 740 750 760 770 780
 TCTGCGATCAAAAGTCTTCATTTCCCGCGACATTAACGTTTACGGGGATGTGGTCATCAAC
 S A I K S L H S R D I N V Y G D V V I N
 85
 790 800 810 820 830 840
 CACAAAAGGCGCGCTGATCGGACCGAAGATGTAACCGCGGTTGAAGTCGATCCCGCTGAC
 H K G G A D A T E D V T A V E V D P A D
 105
 850 860 870 880 890 900
 CGCAACCGCGTAATTTTCAAGGAGAACACCTAATTAAAGCCTGGACACATTTTCATTTTCCG
 R N R V I S G E H L I K A W T H F H F P
 125
 910 920 930 940 950 960
 GGGCGCGCGCAGCACATACAGCGATTTTAAATGCGCATTTGGTACCATTTTGACGGAACCGAT
 G R Q S T Y S D F K W H W Y H F D G T D
 145

Figure 2

```

      970      980      990      1000      1010      1020
TGGGACGAGTCCCGAAGCTGAACCCGATCTATAAGTTTCAAGGAAAGCCTTGGGATTGG
W D E S R K L N R I Y K F Q G K A W D W
165

      1030      1040      1050      1060      1070      1080
GAAGTTTCCAATGAAAACGGCAACTATGATTATTTGATGTATGCCGACATCGATTATGAC
E V S N E N Q N Y D Y L M Y A D I D Y D
185

      1090      1100      1110      1120      1130      1140
CATCCTGATGTGCGCAGCAGAAATTAAGAAATGGGGCACTTGGTATGCCAATGAACTGCAA
H P D V A A E I K R W G T W Y A N E L Q
205

      1150      1160      1170      1180      1190      1200
TTGGACGGTTTCCGCTTGTATGCTGTCAAACACATTAAATTTTCTTTTTTGGCGGATTGG
L D G F R L D A V K H I K F S F L R D W
225

      1210      1220      1230      1240      1250      1260
GTTAATCATGTGTCAGGGAAAAACGGGGAAAGGAAATGTTTACGGTAGCTGAATATTGGCAG
V N H V R E K T G K E M F T V A E Y W Q
245

      1270      1280      1290      1300      1310      1320
AATGACTTGGCGCGCTGGAAAACTATTTGAACAAAACAAATTTTAATCATTCAAGTGTIT
N D L G A L E N Y L N K T N F N H S V F
265

      1330      1340      1350      1360      1370      1380
GACGTGCCGCTTCATTATCAGTTCCATGCTGCATCGACACAGGGAGGCGGCTATGATATG
D V P L H Y Q F H A A S T Q G G G Y D M
285

      1390      1400      1410      1420      1430      1440
AGGAAATTGCTGAACGGTACGGTCTGTTTCCAAGCATCCGTTGAAATCCGTTACATTTGTC
R K L L N G T V V S K H P L K S V T F V
305

      1450      1460      1470      1480      1490      1500
GATAACCATGATACACAGCCGGGGCAATCGCTTGAGTCGACTGTCCAAACATGGTTTAAQ
D N H D T Q P Q Q S L E S T V Q T W F K
325

      1510      1520      1530      1540      1550      1560
CCGCTTGCTTACGCTTTTATTCTCACAAGGGAATCTGGATACCCTCAGGTTTTCTACGGG
P L A Y A F I L T R E S G Y P Q V F Y Q
345

      1570      1580      1590      1600      1610      1620
GATATGTACGGGACGAAAGGAGACTCCCAGCCGAAATTCCTTGCCTTGAAACACAAAATT
D M Y G T K Q D S Q R E I P A L K H K I
365

      1630      1640      1650      1660      1670      1680
GAACCGATCTTAAAAAGCGAGAAAACAGTATGCGTACGGAGCACAGCATGATTATTTGAC
E P I L K A R K Q Y A Y G A Q H D Y F D
385

      1690      1700      1710      1720      1730      1740
CACCATGACATTGTGCGCTGGACAAGGGAAGGCGACAGCTCGGTTGCAAATTCAGGTTTG
H H D I V G W T R E G D S S V A N S G L
405

      1750      1760      1770      1780      1790      1800
GCGGCATTAAATAACAGACCGACCCGGTGCGGCAAAGCGAATGTATGTCCGCCCGCAAAC
A A L I T D G P G G A K R M Y V G R Q N
425

```

Fig. 2 (continued)

```

      1810      1820      1830      1840      1850      1860
GCCGGTGAGACATGGGCATGACATTACCGGAAACCGTTCCGGAGCCGGTTGTCATCAATTCCG
A G E T W H D I T G N R S E P V V I N S
445
      1870      1880      1890      1900      1910      1920
QAAGGCTGGGGAGAGTTTCACGTAAACGGCGGTCGGTTTCAATTTATGTTCAAAGATAG
E G W G E F H V N G G S V S I Y V Q R
465
      1930      1940      1950      1960      1970      1980
AAGAGCAGAGAGGACGGATTTCCTGAAGGAAATCCGTTTTTTTATTTTGTCCCGTCTTATA
483
      1990      2000      2010      2020      2030      2040
AATTTCTTTGATTACATTTTATAATTAATTTTAACAAAGTGTTCATCAGCCCTCAGGAAGG
2050      2060      2070      2080      2090      2100
ACTTGCTGACAGTTTGAATCGCATAGGTAAGGCGGGGATGAAATGGCAACGTTATCTGAT
2110      2120      2130      2140
GTAGCAAAGAAAGCAAATGTGTGCGAAAATCACCGTATCGCGGGTGATCA

```

Fig. 2 (continued)

```

      10      20      30      40      50      60
AATTCACCTCGAAAGCAAGCTGATAAACCGATACAATTAAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTT

      70      80      90     100     110     120
TTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCCGAATTCGAAGCTAATTCACCTC

      130     140     150     160     170     180
GAAAGCAAGCTGATAAACCGATACAATTAAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTTTTTTGGAG

      190     200     210     220     230     240
ATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCCGAATTCGAAGCTCTGCCTCGCGGTTTCGGTG

      250     260     270     280     290     300
ATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTCTAAG

      310     320     330     340     350     360
CGGATGCAGATCACGCCCTGTAGCGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGOTTACGC

      370     380     390     400     410     420
GCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTT

      430     440     450     460     470     480
CCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTAG

      490     500     510     520     530     540
GGTTCGGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGGTT

      550     560     570     580     590     600
CACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGCAGTCCACGT

      610     620     630     640     650     660
TCTTTAATAGTGGACTCTGTTCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATT

      670     680     690     700     710     720
CTTTTGATTTATAAGGATTTTGCCOATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTT

      730     740     750     760     770     780
AACAAAAATTTAACCGAATTTTAACAAAAATTAACGTTTACAAATTTGATCTGCGCTCG

      790     800     810     820     830     840
GTCGTTTCGGCTGCGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAATACGGTTATCCACA

      850     860     870     880     890     900
GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAAC

      910     920     930     940     950     960
CGTAAAAAGGCCGCGTTTGTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTCAGGAGCATCAC

      970     980     990    1000    1010    1020
AAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCG

     1030    1040    1050    1060    1070    1080
TTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATAC

     1090    1100    1110    1120    1130    1140
CTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCAATGCTCAGCTGTAGGTAT

```

Figure 3

```

1150      1160      1170      1180      1190      1200
CTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTTCAG

1210      1220      1230      1240      1250      1260
CCCGACCGCTGCGCCTTATCCCGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGAC

1270      1280      1290      1300      1310      1320
TTATCCCCACTGGCAGCAGCCACTGTTAACAGGATTAGCAGAGCCAGGTATGTAGGCGGT

1330      1340      1350      1360      1370      1380
GCTACAGAGTTCTTGAAGTGCTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAAGACAGTATTGGT

1390      1400      1410      1420      1430      1440
ATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGC

1450      1460      1470      1480      1490      1500
AAACAAACCACCGCTGGTAOCGGTGGTTTTTTTGTITGCAAGCAGCAQATTACGGCAGA

1510      1520      1530      1540      1550      1560
AAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTJGAAC

1570      1580      1590      1600      1610      1620
GAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGCATCTTCACCTAGATC

1630      1640      1650      1660      1670      1680
CTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCT

1690      1700      1710      1720      1730      1740
GACAGTTACCAATGCTTAATCACTOAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGCTTCA

1750      1760      1770      1780      1790      1800
TCCATACTTGCCCTGACTCCCCGTCOTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCT

1810      1820      1830      1840      1850      1860
GGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCA

1870      1880      1890      1900      1910      1920
ATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCCGAGAAGTGGTCCCTGCAACTTTATCCGCCTCC

1930      1940      1950      1960      1970      1980
ATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTG

1990      2000      2010      2020      2030      2040
CGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGGCTCGTTCGTTTGGTATGGCT

2050      2060      2070      2080      2090      2100
TCATTACGCTCCCGTTCCCAACGATCAAGCCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAA

2110      2120      2130      2140      2150      2160
AAAGCCGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCACAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTA

2170      2180      2190      2200      2210      2220
TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGC

2230      2240      2250      2260      2270      2280

```

Fig. 3 (continued)

TTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCCGCGACCG

2290 2300 2310 2320 2330 2340
AGTTGCTCTTGCCCGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAA

2350 2360 2370 2380 2390 2400
GTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGCATCTTACCGCTGTTG

2410 2420 2430 2440 2450 2460
AGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTC

2470 2480 2490 2500 2510 2520
ACCAGCGTTTCTGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGQAAATAAGG

2530 2540 2550 2560 2570 2580
GCGACACGQAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCAGACAG

2590 2600 2610 2620 2630 2640
TTTTATTGTTTCATGATGATATATTTTATCTTGTGCAATGTAACATCAGAGATTTTGAGA

2650 2660 2670 2680 2690 2700
CACAACTGGCTTTGTTGAATAAATCGAACTTTTGCTGAGTTGACTCCCCGCGCGCATG

2710 2720 2730 2740 2750 2760
GGTCGAATTTGCTTTCGAAAAAAAAGCCCGCTCATTAGGCGGGCTAAAAAAAAGCCCGCT

2770 2780 2790 2800 2810 2820
CATTAGCGGGCTCGAATTTCTGCCATTCATCCGCTTATTATCACTTATTCAGGCGTAGC

2830 2840 2850 2860 2870 2880
AACCAGCGGTTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAAATTACGCCCCGCCCTGCCACT

2890 2900 2910 2920 2930 2940
CATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCAGACGCG

2950 2960 2970 2980 2990 3000
CATGATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTCTCGCCTTGCGTATAATATTTGC

3010 3020 3030 3040 3050 3060
CCATAGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTTGTCCATATTCGCCACGTTTAAATCAAACTGG

3070 3080 3090 3100 3110 3120
TGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGACACGAAAAACATATTCTCAATAAACCCCTTTAGGGA

3130 3140 3150 3160 3170 3180
AATAGCCCAGGTTTTCACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCC

3190 3200 3210 3220 3230 3240
CGAAATCGTCGTGCTATTCACTCCAGACGATGAAAACGTTTTCAGTTTGCTCATGAAAA

3250 3260 3270 3280 3290 3300
CGGTCTAACAAGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCCTTTTCATTGCCATAC

3310 3320 3330 3340 3350 3360
GAAATTCGGGATGAGCATTATCAGCGGGGCAAGAATGTGAATAAAGCCCGGATAAACT

Fig. 3 (continued)

3370 3380 3390 3400 3410 3420
 TGTGCTTATTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCCAGCTAAACGGTCTGGT
 3430 3440 3450 3460 3470 3480
 TATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGG
 3490 3500 3510 3520 3530 3540
 ATATATCAACGGTGGTATATCCAGTGAATTTTCTCCATTTTAGCTTCCTTAGCTCCTG
 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 AAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTCAATTATGGTGAAAGT
 3610 3620 3630 3640 3650 3660
 TGGAACTCTTACGTGCCGATCAACOTCTCATTTTCCGCAAAAGTTGGCCAGGGCTTCC
 3670 3680 3690 3700 3710 3720
 CCGTATCAACAGGGACACCAGGATTTATTTATTCTGCQAAGTGATCTTCCGTCACAGGTA
 3730 3740 3750 3760 3770 3780
 TTTATTGGAAGACGAAAGGCCATCGCGCGGGGAATTCGAGCTCGAGCTTACTCCCCAT
 3790 3800 3810 3820 3830 3840
 CCCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAA
 3850 3860 3870 3880 3890 3900
 TTTCACACAGGAAACAGGATCCAAGGAGCTGATCTAGAGTCATGAAACAACAAAACGGC
 M K Q Q K R
 3910 3920 3930 3940 3950 3960
 TTTACGCCCCGATTGCTGACGCTGTTATTTGCGCTCATCTTCTTCTGCTGCCTCATTTCTGCAG
 L Y A R L L T L L F A L I F L L P H S A
 3970 3980 3990 4000 4010 4020
 CAGCGCGCGCAAATCTTAATGGGACGCTGATGCAATATTTGAATGGTACATGCCCAATG
 A A A A N L N G T L M Q Y F E W Y M P N
 •1
 4030 4040 4050 4060 4070 4080
 ACCGCCAACATTGGAAGCOTTTGCAAAACGACTCGGCATATTTGGCTGAACACGGTATTA
 D G Q H W K R L Q N D S A Y L A E H G I
 18
 4090 4100 4110 4120 4130 4140
 CTGCGCTCTGGATTCCCCCGGCATATAAGGGAAGTAGTCAAGCGGATGTGGGTACGGTG
 T A V W I P P A Y K G T S Q A D V G Y Q
 38
 4150 4160 4170 4180 4190 4200
 CTTACGACCTTTATGATTTAGGGGAGTTTCATCAAAAAGGCACGGTTCGGACAAAAGTACG
 A Y D L Y D L G E F H Q K G T V R T K Y
 58
 4210 4220 4230 4240 4250 4260
 GCACAAAAGGAGAGCTGCAATCTCGGATCAAAAAGTCTTCATTCCCGCGACATTAACGTTT
 G T K G E L Q S A I K S L H S R D I N V
 78
 4270 4280 4290 4300 4310 4320
 ACGGGGATGTGGTCATCAACCACAAAGCGCGCGCTGATCGGACCGAAGATGTAACCGCGG
 Y G D V V I N H K G G A D A T E D V T A
 98

Fig. 3 (continued)

4330 4340 4350 4360 4370 4380
 TTGAAGTCGATCCCGCTGACCGCAACCGCGTAATTTTCAGGAGAACACCTAATTAAGCCT
 V E V D P A D R N R V I S G E H L I K A
 118

4390 4400 4410 4420 4430 4440
 GGACACATTTTCATTTTCCGGGGCCCGGCAGCACATACAGCGATTTTAAATGGCATTGGT
 W T H F H F P G R G S T Y S D F K W H W
 138

4450 4460 4470 4480 4490 4500
 ACCATTTTGACGGAACCGATTGGGACGAGTCCCGAAAGCTGAACCGCATCTATAAGTTTC
 Y H F D G T D W D E S R K I N R I Y K F
 158

4510 4520 4530 4540 4550 4560
 AAGGAAAGCCTTGGGATTGGGAAGTTTCCAATGAAAACGGCAACTATGATTATTGATGT
 Q G K A W D W E V S N E N G N Y D Y L M
 178

4570 4580 4590 4600 4610 4620
 ATGCCGACATCGATTATGACCATCCTGATGTCGAGCAGAAATTAAGAGATGGGGCACTT
 Y A D I D Y D H P D V A A E I K R W G T
 198

4630 4640 4650 4660 4670 4680
 GGTATGCCAATGAACTGCAATTGGACGGTTTCCGTCTTGATGCTGTCAAACACATTAAAT
 W Y A N E L Q L D G F R L D A V K H I K
 218

4690 4700 4710 4720 4730 4740
 TTTCTTTTTTTCGGGATTGGGTTAATCATGTCAGGGAAAAAACGGGAAGGAAATGTTTA
 F S F L R D W V N H V R E K T G K E M F
 238

4750 4760 4770 4780 4790 4800
 CGGTAGCTGAATAITGGCAGAAATGACTTGGGCGCCCTGAAAACTATTTGAACAAAAACA
 T V A E Y W Q N D L G A L E N Y L N K T
 258

4810 4820 4830 4840 4850 4860
 ATTTAATCATTCAGTGTTTGACGTGCCGCTTCATTATCAGTTCCATGCTGCATCGACAC
 N F N H S V F D V P L H Y Q F H A A S T
 278

4870 4880 4890 4900 4910 4920
 ACGGAGGCGGCTATGATATGAGGAAATTCGCTGAACGGTACGGTCGTTTCCAAGCATCCGT
 Q G G G Y D M R K L L N G T V V S K H P
 298

4930 4940 4950 4960 4970 4980
 TGAAATCGGTTACATTTGTCGATAACCAATGATACACAGCCGGGCAATCGCTTGAGTCTGA
 L K S V T F V D N H D T Q P G Q S L E S
 318

4990 5000 5010 5020 5030 5040
 CTGTCCAAACATGGTTTAAGCCGCTTGCTTACGCTTTTATTCTCACAAGGGAATCTGGAT
 T V Q T W F K P L A Y A F I L T R E S G
 338

5050 5060 5070 5080 5090 5100
 ACCCTCAGGTTTTCTACGGGCATATGTACGGGACGAAAGGAGACTCCCAGCGCGAAATTC
 Y P Q V F Y G D M Y G T K G D S Q R E I
 358

5110 5120 5130 5140 5150 5160
 CTGCCTTGAAACACAAAATTGAACCGATCTTAAAAGCGAGAAAACAGTATGCGTACCGAG
 P A L K H K I E P I L K A R K Q Y A Y G
 378

Fig. 3 (continued)

5170 5180 5190 5200 5210 5220
 CACAGCATGATTATTTTCGACCACCATGACATTGTCCGGCTGGACAAGGGAAGGGGACAGCT
 A Q H D Y F D H H D I V Q W T R E G D S
 398
 5230 5240 5250 5260 5270 5280
 CGGTTGCAAATTCAGGTTTGGCGGCATTAATAACAGACGGACCCGGTGGGGCAAAGCGAA
 S V A N S G L A A L I T D G P G G A K R
 418
 5290 5300 5310 5320 5330 5340
 TGTATGTCCGGCCGGCAAACGCCCGGTGAGACATGGCATGACATTACCGGAAACCGTTCCG
 M Y V G R Q N A G E T W H D I T G N R S
 438
 5350 5360 5370 5380 5390 5400
 AGCCGGTTGTCATCAATTCGGAAGGCTGGGGAGAGTTTCACGTAAACGGCGGGTCCGTTT
 E P V V I N S E G W G E F H V N G Q S V
 458
 5410 5420 5430 5440 5450 5460
 CAATTTATGTTCAAAGATAGGTGACCAGAGAGGACGGATTTCCTGAAGGAAATCCGTTT
 S I Y V Q R
 478
 5470 5480 5490 5500 5510 5520
 TTTATTTTGGCCGCTCTATAAATTTCTTTGATTACATTTTATAATTAATTTTAACAAAGT
 5530 5540 5550 5560 5570 5580
 GTCATCAGCCCTCAGGAAGGACTTGCTGACAGTTTGAATCGCATAGGTAAGGCGGGGATG
 5590 5600 5610 5620 5630 5640
 AAATGGCAACGTTATCTGATGTAGCAAAGAAAGCAAATGTGTGAAAATGACGGTATCGC
 5650 5660 5670
 GGGTGATCCTCTAGAAGAAGCTTGGTCTAGAGGTCCA

Fig. 3 (continued)

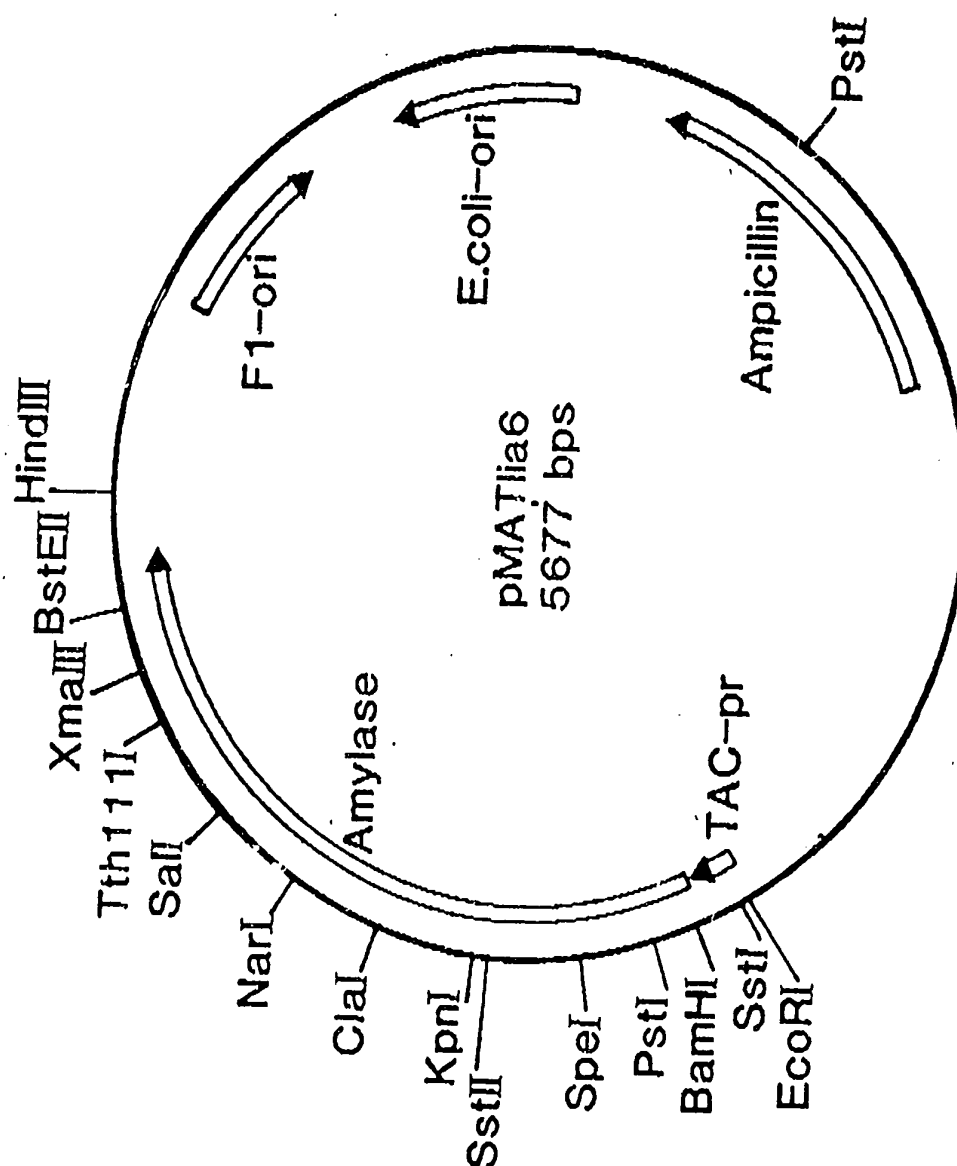


Figure 4

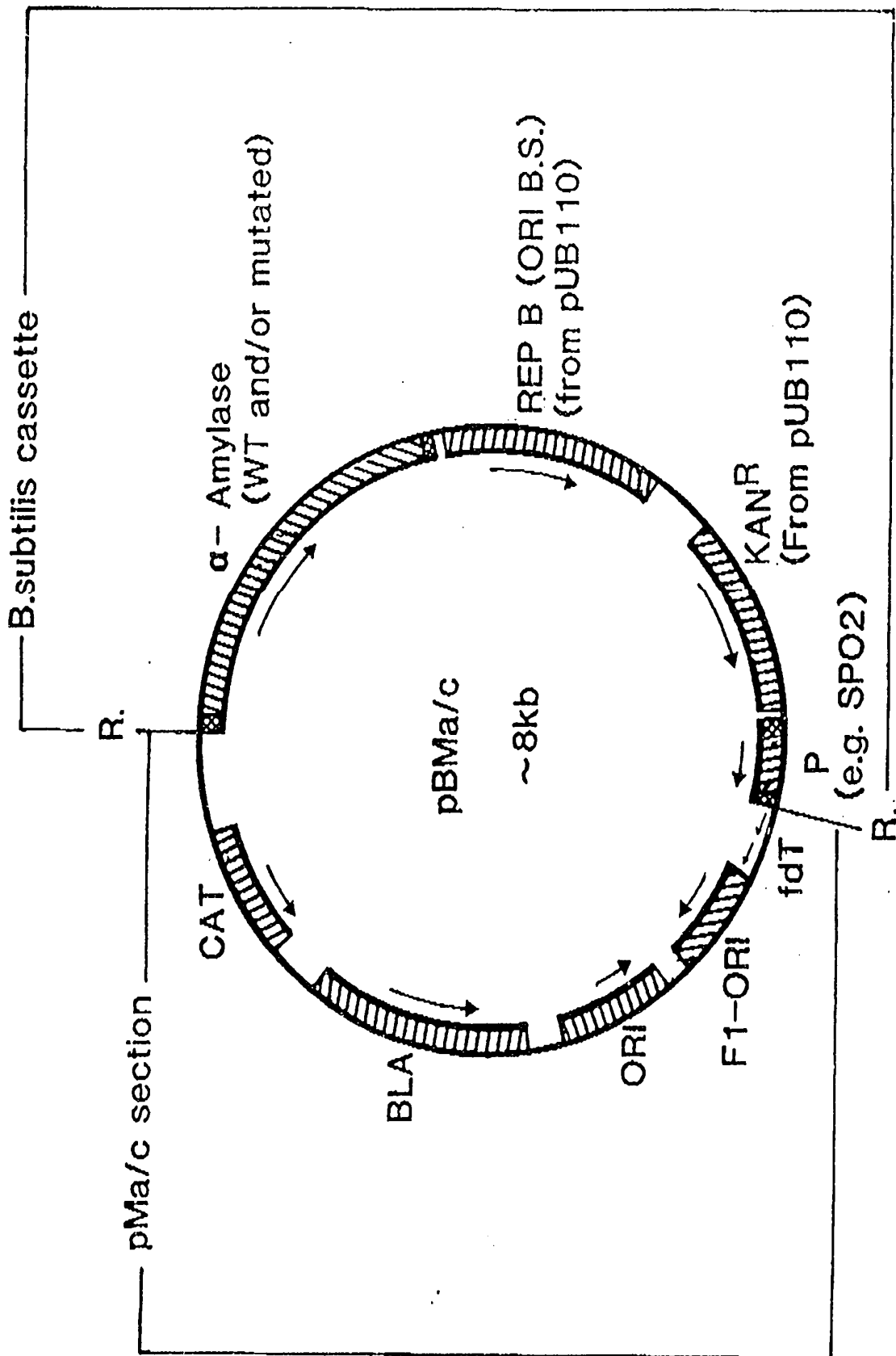


Figure 5

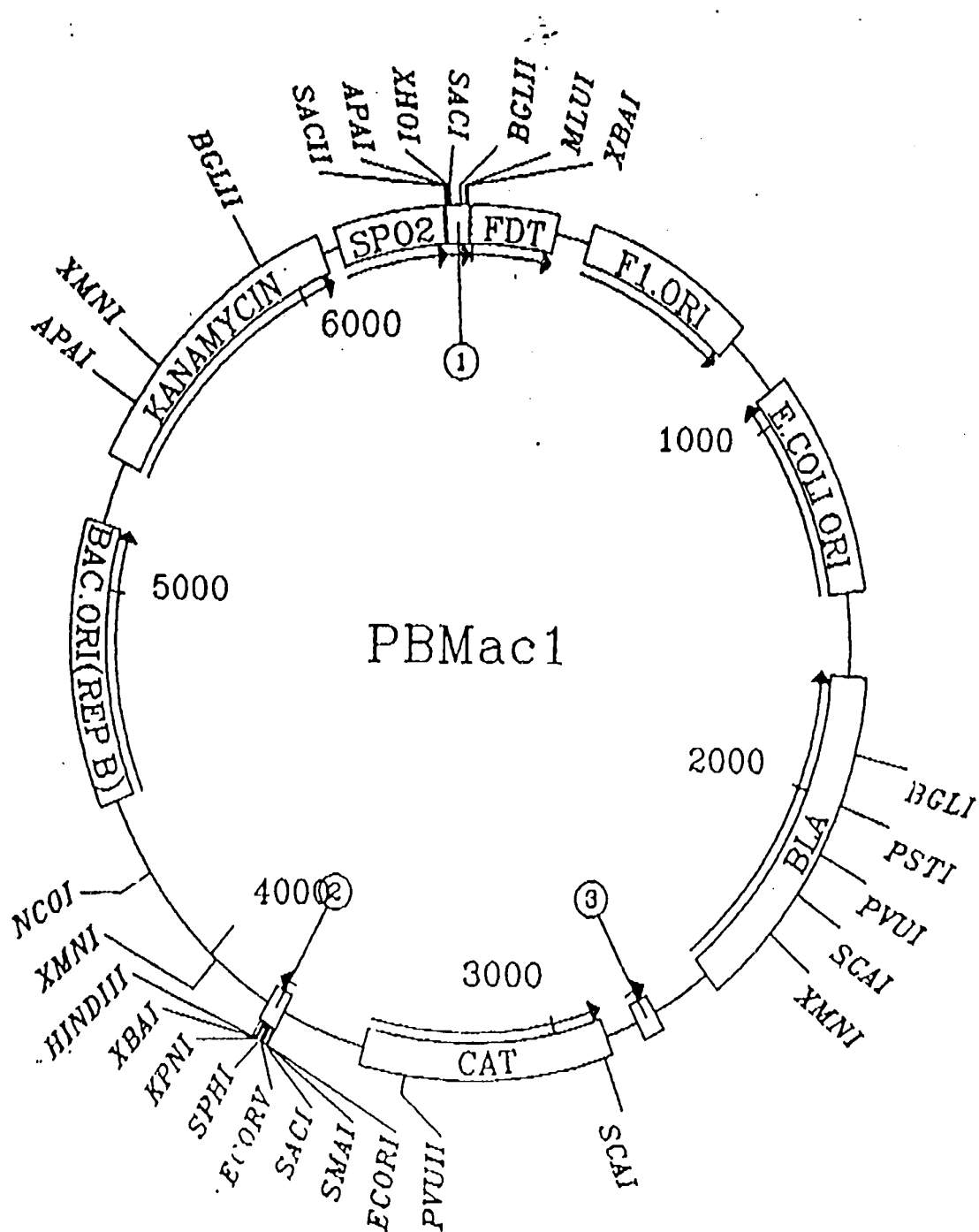


Figure 6

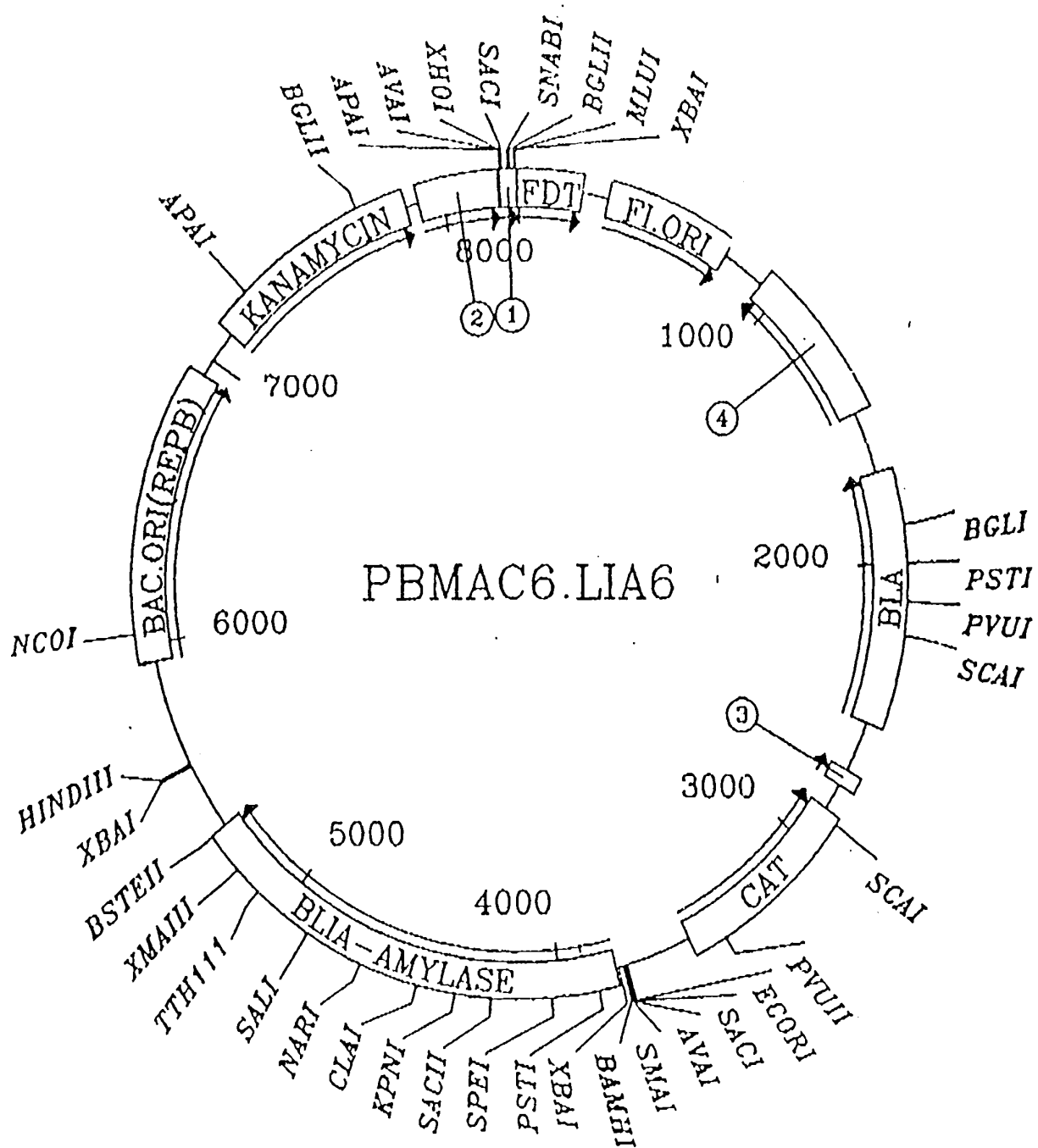


Figure 7

EcoRI

GAATTCGAGCTCGAGCTTACTCCCCATCCCCCTGTTGACAATTAATCATCGGCTCGTATA
BamHI

ATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGGATCCGCGGATCCGTG

----->phoA

GAGAAAATAAA GTGAAACAAAGCACTATTGCACTGGCACTCTTACCGTTACTGTTTACC
M K Q S T I A L A L L P L L F T

CCTGTGACAAAAGCG GCAAAT
P V T K A A N

----->amylase

Figure 8

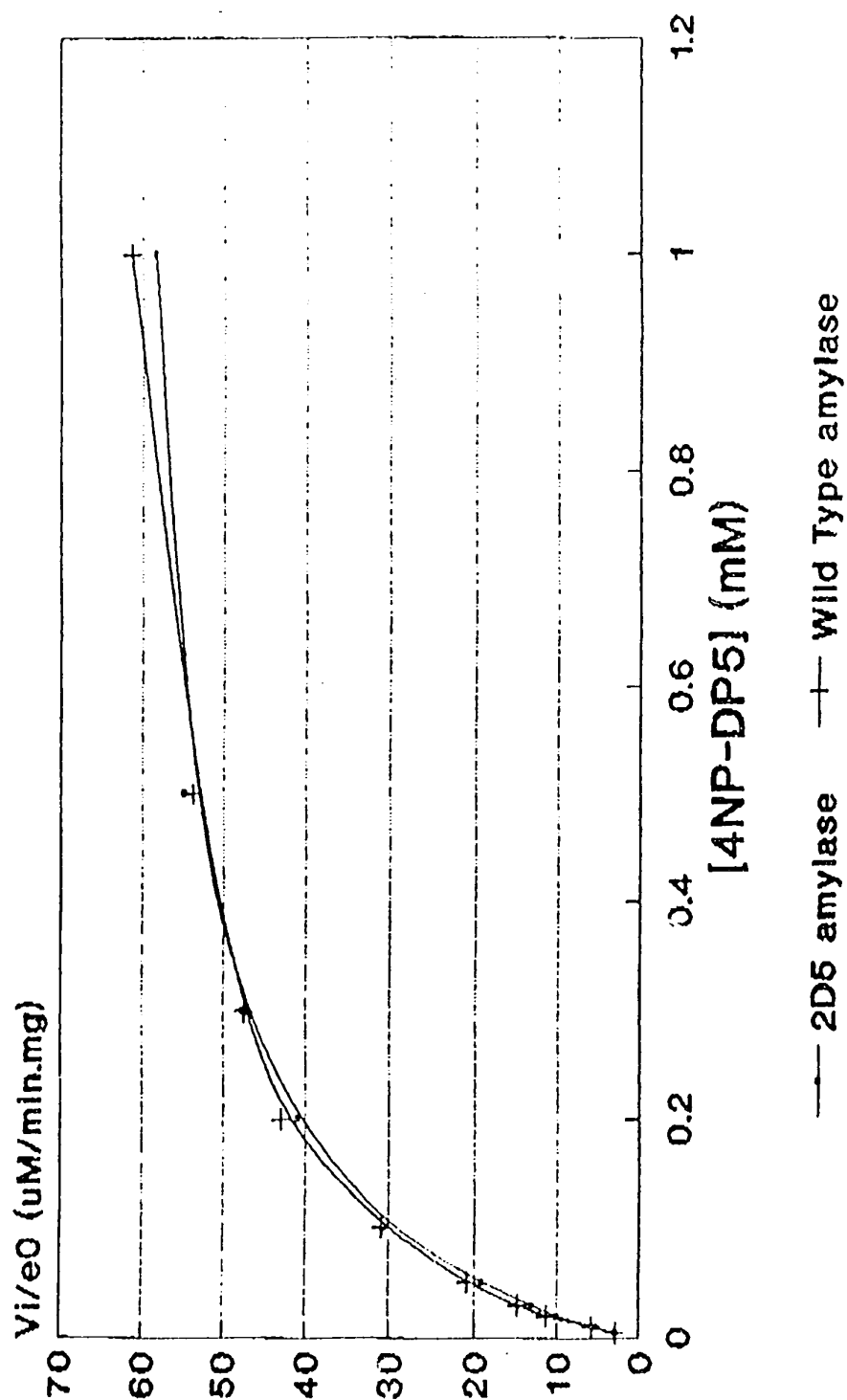


Figure 8

Thermoinactivation at pH 5.5

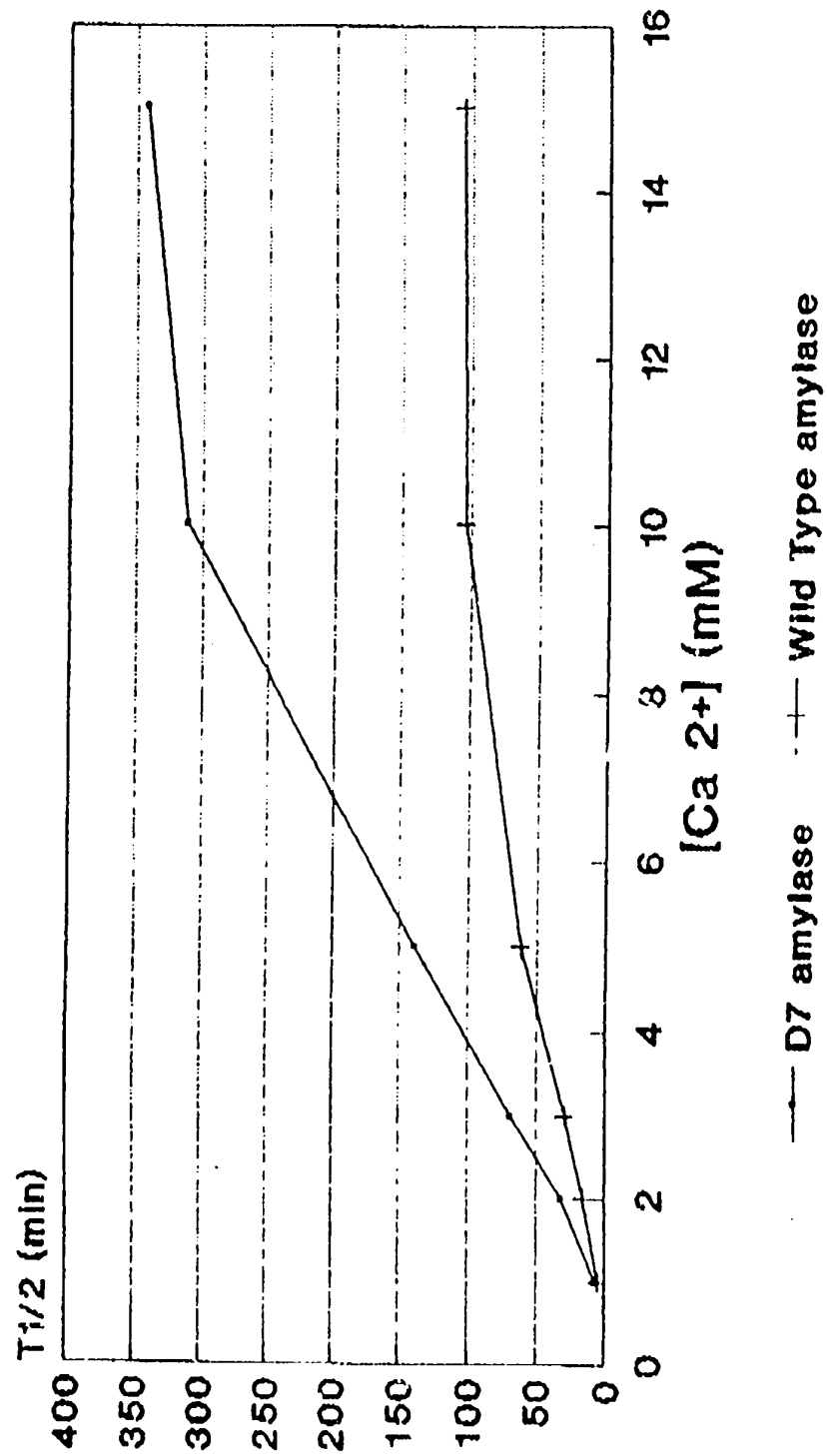


Figure 10

Thermostoinactivation at pH 7.0

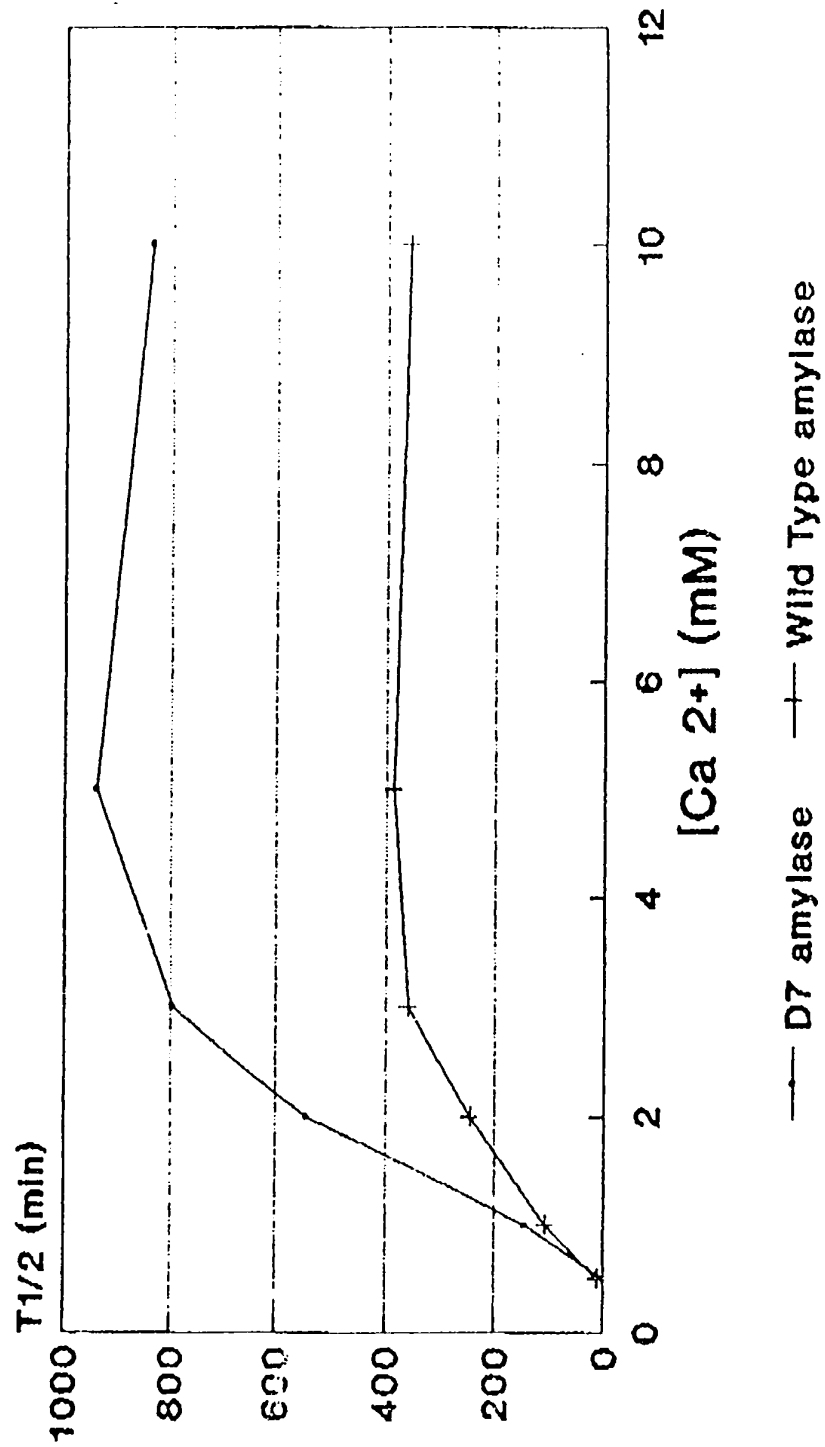


Figure 11

Thermoinactivation of 2D5 amylase

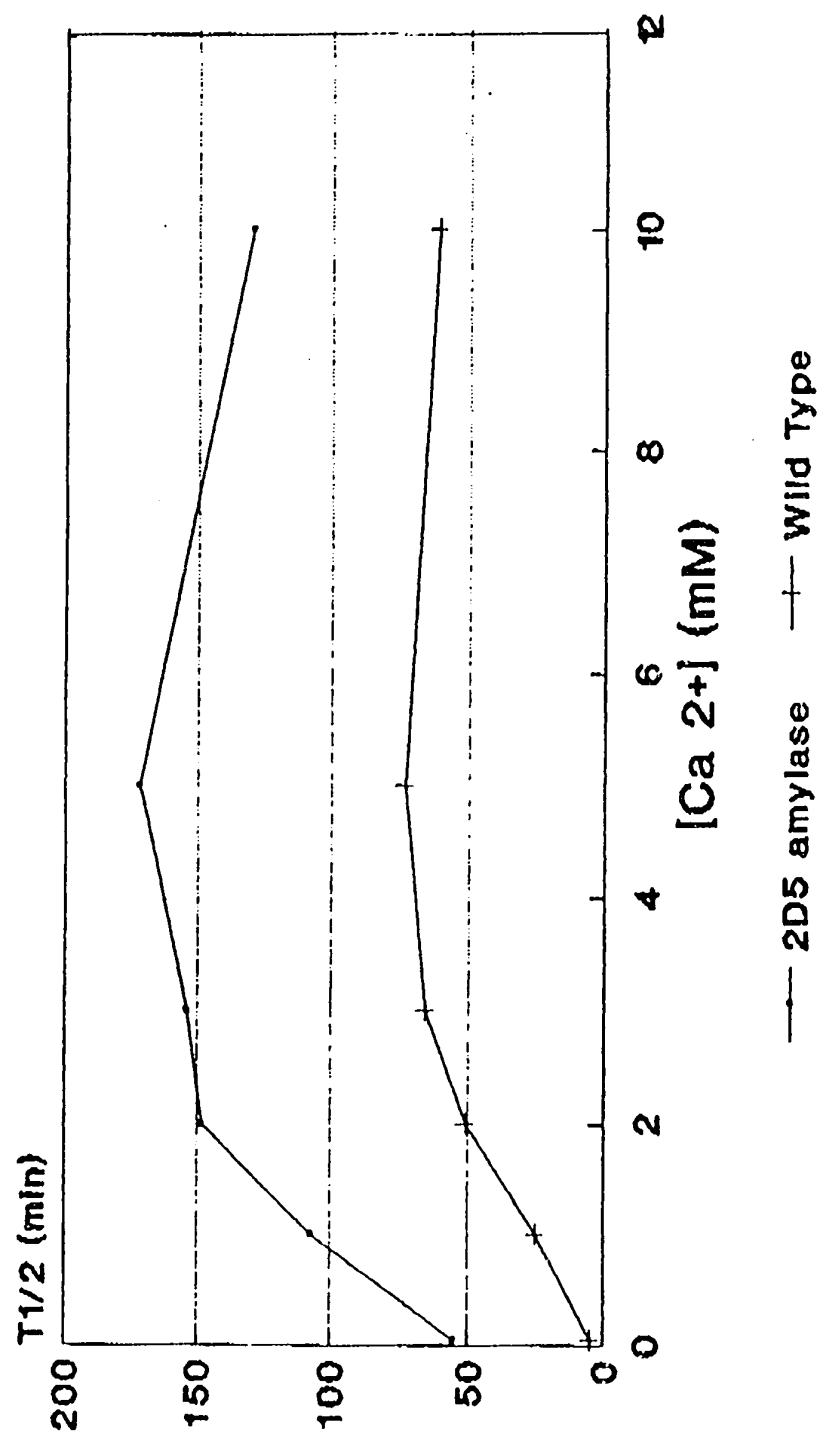


Figure 12

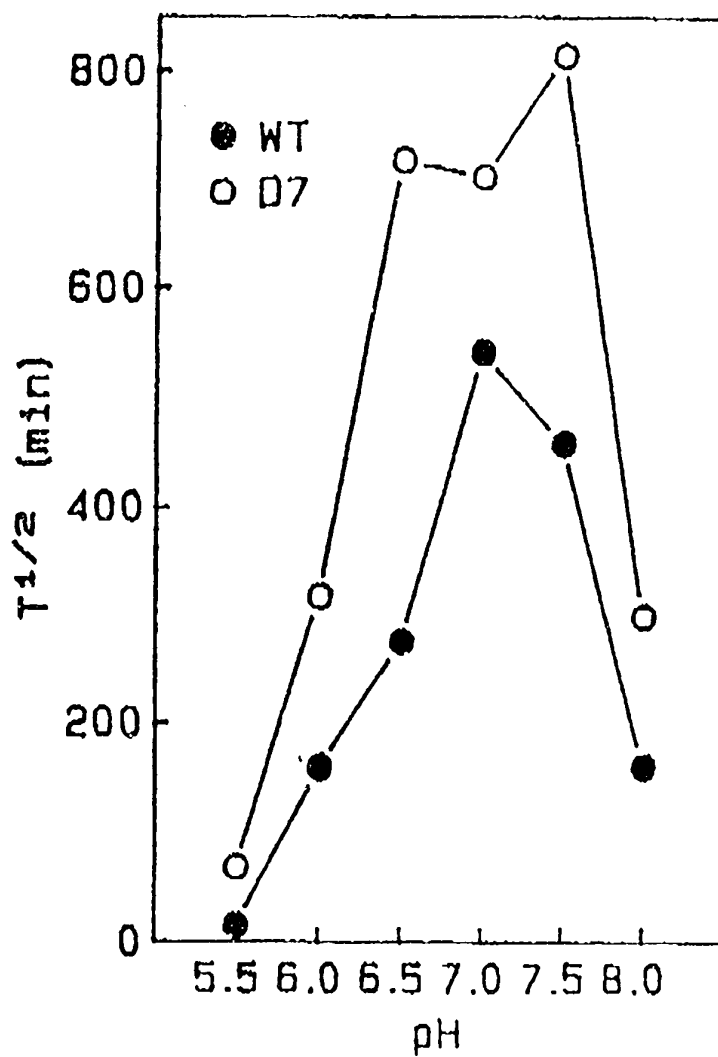


Figure 13

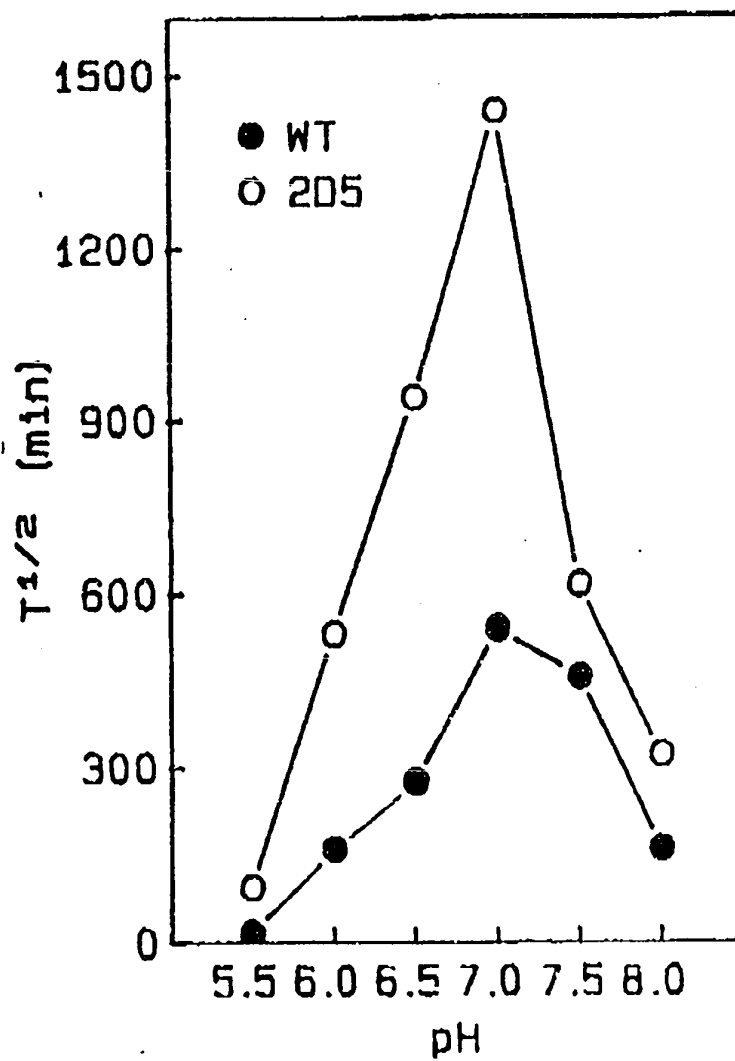


Figure 14

Liquefaction at 110 C

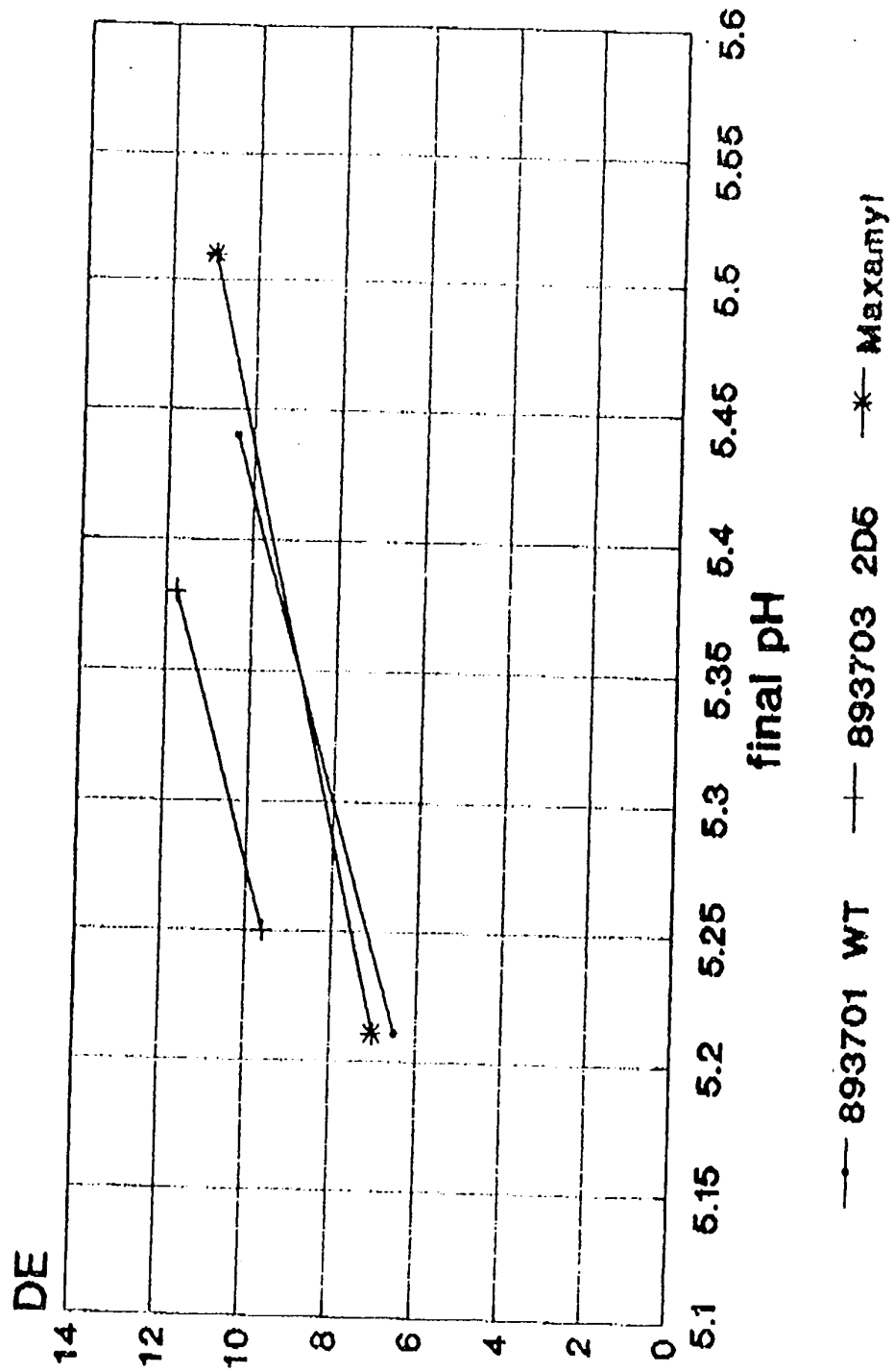


Figure 15