



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 286 012**

51 Int. Cl.:
C12N 9/28 (2006.01)
C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00912415 .7**
86 Fecha de presentación : **28.03.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1165762**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2002**

54 Título: **Variantes de alfa-amilasa.**

30 Prioridad: **30.03.1999 DK 1999 00437**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2007

73 Titular/es: **Novozymes A/S**
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es: **Andersen, Carsten;**
Joergensen, Christel, Thea;
Bisgard-Frantzen, Henrik;
Svendsen, Allan y
Kjaerulff, Soeren

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 286 012 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Variantes de alfa-amilasa.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere, entre otras cosas, a variantes nuevas de alfa-amilasas progenitoras tipo Termamyl, sobre todo a variantes que presentan propiedades alteradas, en particular un modelo de seccionamiento alterado (con respecto al progenitor) que es ventajoso con respecto a las aplicaciones de las variantes, en particular, en el tratamiento del almidón industrial (p. ej., licuefacción o sacarificación del almidón).

Antecedentes de la invención

Las alfa-amilasas (alfa-1,4-glucan4-hidrolasas, EC 3.2.1.1) constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del almidón y otros oligo y polisacáridos 1,4-glucosídicos lineales y ramificados.

Hay un cuerpo muy extenso de patentes y bibliografía científica relacionadas con esta clase de enzimas industrialmente muy importantes. Varias alfa-amilasas tales como las variantes de las alfa-amilasas tipo Termamyl son conocidas a partir de, p. ej., WO 90/11352, WO 95/10603, WO 95/26397, WO 96/23873, WO 96/23874 y WO 97/41213.

La reciente descripción relacionada con las alfa-amilasas comprende el documento WO 96/23874 el cual proporciona datos estructurales de cristales tridimensionales por rayos X para una alfa-amilasa tipo Termamyl, a la que se hace referencia como BA2, que consiste en 300 residuos de aminoácidos N-terminales de alfa-amilasa de *B. amyloliquefaciens* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 6 en la presente y los aminoácidos 301-483 del extremo C-terminal de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4 en la presente (estando disponible comercialmente con el nombre comercial Termamyl™), y que está por tanto muy relacionada con las alfa-amilasas de *Bacillus* industrialmente importantes (que en este contexto se incluyen dentro del significado de los términos “alfa-amilasas de tipo Termamyl”, y que incluyen, entre otros, las alfa-amilasas de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. stearothermophilus*). El documento WO 96/23874 también describe la metodología para diseñar, basándose en un análisis de la estructura de una alfa-amilasa progenitora tipo Termamyl, variantes de la alfa-amilasa progenitora tipo Termamyl que presentan propiedades alteradas relativas al progenitor.

WO 96/23874 y WO 97/41213 (Novo Nordisk) exponen variantes de la alfa-amilasa tipo Termamyl con un modelo de seccionamiento alterado que contiene mutaciones en los residuos de aminoácidos V54; D53; Y56; Q333; G57 y A52 de la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 4 en la presente.

Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere a alfa-amilasas tal y como se define en la reivindicación 1, que son ventajosas con respecto al tratamiento industrial del almidón (licuefacción del almidón, sacarificación y similares).

Los inventores ha encontrado de forma sorprendente variantes con propiedades alteradas, en particular un modelo de seccionamiento alterado que tiene una capacidad reducida mejorada para seccionar un sustrato cerca del punto de ramificación, y que además tienen una especificidad de sustrato mejorada y/o una actividad específica mejorada, en comparación con el WO 96/23874 y WO 97/41213 (Novo Nordisk) descrita como variantes de alfa-amilasa de tipo Termamyl con un modelo de seccionamiento alterado que contiene mutaciones en los residuos de aminoácidos V54;D53;Y56;Q333;G57 y A52 de la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 4 en la presente.

La invención además se refiere a constructos de ADN que codifican las alfa-amilasas de la invención, a vectores de expresión recombinantes que transportan los constructos de ADN, a las células transformadas con los constructos de ADN a composiciones que comprenden alfa-amilasas de la invención, y al uso de variantes y composiciones de la invención, solas o en combinación con otras enzimas alfa-amilolíticas, en varios procesos industriales, p. ej., en la licuefacción del almidón, y en composiciones de detergentes, tales como composiciones de limpieza para la ropa, para lavavajillas y para superficies duras; para la producción de etanol, como la producción de etanol para combustible, para bebidas e industrial; para el desencolado de telas, tejidos o prendas etc.

Nomenclatura

En la presente descripción y reivindicaciones, se usan los códigos convencionales de una sola letra y de tres letras para residuos de aminoácidos.

Para mayor facilidad de referencia, las variantes de alfa-amilasa de la invención se describen usando la nomenclatura siguiente:

Aminoácido(s) original(es):posición(es):aminoácido(s) sustituido(s)

ES 2 286 012 T3

Según esta nomenclatura, por ejemplo la sustitución de alanina por asparraguina en la posición 30 se indica como:

Ala30Asn o A30N

5 una delección de alanina en la misma posición está mostrada como:

Ala30* o A30*

y la inserción de un residuo de aminoácido adicional, tal como la lisina, se indica como:

10

* 30aLys o *30aK

Una delección de un segmento consecutivo de residuos de aminoácidos, tal como los residuos de aminoácidos 30-33, se indica como (30-33)* o Δ (A30- N33) o delta(A30-N33).

15

Cuando una alfa-amilasa específica contiene una “delección” en comparación con otras alfa-amilasas y se hace una inserción en esa posición esto se indica como:

* 36aAsp o *36aD

20

para la inserción de un ácido aspártico en la posición 36

Las mutaciones múltiples están separadas por signos de suma, por ejemplo:

25

Ala30Asp + Glu34Ser o A30N+E34S

representando mutaciones en las posiciones 30 y 34 sustituyendo la alanina y el ácido glutámico por asparraguina y serina, respectivamente. Las mutaciones múltiples pueden también ser separadas como sigue, es decir, significando lo mismo que la suma:

30

Ala30Asp/Glu34Ser o A30N/E34S

Cuando uno o más residuos de aminoácidos alternativos pueden ser insertados en una posición esto se indica como

35

A30N,E o

A30N o A30E

Además, cuando una posición adecuada para la modificación está identificada en la presente sin que se haya sugerido una modificación específica, o A30X, se entenderá que cualquier residuo de aminoácido puede ser sustituido por el residuo de aminoácido presente en la posición. Así, por ejemplo, cuando se menciona una modificación de una alanina en la posición 30, pero no se especifica, o se especifica como “X”, se entenderá que la alanina puede ser delecionada o sustituida por cualquier otro aminoácido, es decir, cualquier: R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V.

45

Descripción detallada de la invención

Figura 1 muestra SEC ID NO:1 de WO95/26397.

50

Figura 2 muestra SEC ID NO:2 de WO95/26397.

Figura 3 muestra la secuencia de *Bacillus sp.* #707 alfa-amilasa de Tsukamoto *et al*, Biochemical and Biophysical Research Communications, FSI (1988), págs. 25-31.

55

Alfa-amilasa tipo Termamyl

Es bien sabido que varias alfa-amilasas producidas por *Bacillus spp.* son muy homólogas a nivel aminoácido. Por ejemplo, se ha encontrado que la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4 (comercialmente disponible como TermamylTM) tiene un 89% de homología con la alfa-amilasa de *B. amiloliquefaciens* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 6 y aproximadamente un 79% de homología con la alfa-amilasa de *B. stearotheophilus* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 8. Además las alfa-amilasas homólogas incluyen una alfa-amilasa derivada de una cepa de *Bacillus sp.* NCIB 12289; NCIB 12512; NCIB 12513 o DSM 9375; todas ellas están descritas de forma detallada en WO 95/26397; y la alfa-amilasa #707 descrita por Tsukamoto *et al*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 151 (1988), págs. 25-31.

65

Además las alfa-amilasas homólogas incluyen la alfa-amilasa producida por la cepa de *B. licheniformis* descrita en EP 0252666 (ATCC 27811), y las alfa-amilasas identificadas en WO 91/00353 y WO 94/18314. Otras alfa-

ES 2 286 012 T3

amilasas comerciales tipo Termamyl de *B. licheniformis* son Optitherm™ y Takatherm™ (disponibles por Solvay), Maxamyl™ (disponible por Gist-Brocades/Genencor), Spezym AA™ y Spezyme Delta AA™ (disponible por Genencor), y Keistase™ (disponible por Daiwa).

5 Debido a la homología sustancial encontrada entre estas alfa-amilasas, se considera que éstas pertenecen a la misma clase de alfa-amilasas, es decir a la clase de “alfa-amilasas de tipo Termamyl”.

10 Por consiguiente, en el presente contexto, el término “alfa-amilasa tipo Termamyl” se destina a indicar una alfa-amilasa, que a nivel aminoácido muestra una homología sustancial al Termamyl™, es decir, la alfa amilasa de *B. licheniformis* con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4 en la presente. En otras palabras, una alfa-amilasa tipo Termamyl es una alfa-amilasa, que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4 u 8 en la presente, y la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 1 o 2 de WO 95/26397 (ver figuras 1 y 2; respectivamente) o en Tsukamoto *et al.*; 1988 (ver figura 3), o i) que muestra al menos el 90%, incluso especialmente más preferido al menos el 95% de homología, más preferiblemente al menos el 97%, más preferiblemente al menos el 99% de homología con al menos una de dichas secuencias de aminoácidos.

20 En relación con la propiedad i), la “homología” se determina usando el programa GAP del paquete GCG versión 7.3 (Junio 1993) usando valores por defecto para penalizaciones de GAP, es decir una penalización por la creación de GAP de 3.0 y una penalización por la extensión de GAP de 0.1; (Genetic Computer Group (1991) Programme Manual for the GCG Package, version 7, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711).

25 Un alineamiento estructural entre Termamyl y una alfa-amilasa tipo Termamyl puede ser usado para identificar posiciones equivalentes/correspondientes en otras alfa-amilasas tipo Termamyl. Un método para obtener dicho alineamiento estructural es el uso del programa Pile Up del paquete GCG usando valores por defecto para penalizaciones de gap, es decir, una penalización por la creación de espacios de 3.0 y una penalización por la extensión de espacios de 0.1. Otros métodos de alineamiento estructural incluyen el análisis del cluster hidrofóbico (Gaboriaud *et al.*, (1987), FEBS LETTERS 224, pp. 149-155) y el enhebrado inverso (Huber, T ; Torda, AE, PROTEIN SCIENCE Vol. 7, No. 1 pp. 142-149 (1998)).

30 En este contexto, “derivado de” está destinado a indicar no sólo una alfa-amilasa producida o producible por una cepa del organismo en cuestión, sino también una alfa-amilasa codificada por una secuencia de DMA aislada de esta cepa y producida en un organismo huésped transformado con dicha secuencia de ADN. Finalmente, el término se destina a indicar una alfa-amilasa, que está codificada por una secuencia de ADN de origen sintético y/o de ADNc y que tiene las características de identificación de la alfa-amilasa en cuestión. El término está también destinado a indicar que la alfa-amilasa progenitora puede ser una variante de una alfa-amilasa de origen natural, es decir una variante, que es el resultado de una modificación (inserción, sustitución, eliminación) de uno o más residuos de aminoácidos de la alfa-amilasa de origen natural.

40 *Alfa-amilasas progenitoras híbridas*

La alfa-amilasa progenitora puede ser una alfa-amilasa híbrida, es decir, una alfa-amilasa, que comprende una combinación de secuencias de aminoácidos parciales derivadas de al menos dos alfa-amilasas.

45 La alfa-amilasa híbrida progenitora puede ser una, que en base a la homología del aminoácido y/o a la reacción cruzada inmunológica y/o a la hibridación del ADN (tal como se ha definido anteriormente) puede ser determinada como perteneciente a la familia de la alfa-amilasa tipo Termamyl. En este caso, la alfa-amilasa híbrida está normalmente compuesta al menos por una parte de una alfa-amilasa tipo Termamyl y parte(s) de una o más alfa-amilasas seleccionadas de alfa-amilasas tipo Termamyl o alfa-amilasas no de tipo Termamyl de origen microbiano (bacteriano o fúngico) y/o mamífero.

50 Así, la alfa-amilasa híbrida progenitora puede comprender una combinación de secuencias de aminoácidos parciales que derivan de al menos dos alfa-amilasas tipo Termamyl, o de al menos una alfa-amilasa tipo Termamyl y al menos una alfa-amilasa bacteriana no de tipo Termamyl, o de al menos una alfa-amilasa de tipo Termamyl y al menos una alfa-amilasa fúngica. La alfa-amilasa tipo Termamyl de la cual deriva una secuencia de aminoácidos parcial puede, p. ej., ser cualquiera de estas alfa-amilasa específicas tipo Termamyl a las que se hace referencia en la presente.

55 Por ejemplo, la alfa-amilasa progenitora puede comprender una parte C-terminal de una alfa-amilasa derivada de una cepa de *B. licheniformis*, y una parte N-terminal de una alfa-amilasa derivada de una cepa de *B. amyloliquefaciens* o de una cepa de *B. stearothermophilus*.

60 La alfa-amilasa que no es del tipo Termamyl puede, p. ej., ser una alfa-amilasa fúngica, una alfa-amilasa mamífera o vegetal o una alfa-amilasa bacteriana (diferente de una alfa-amilasa tipo Termamyl). Ejemplos específicos de alfa-amilasas de este tipo incluyen la TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, la alfa-amilasa ácida de *A. niger*, la alfa-amilasa de *Bacillus subtilis*, la alfa-amilasa porcina pancreática y una alfa-amilasa de cebada. Todas estas alfa-amilasas tienen estructuras dilucidadas, que son marcadamente diferentes de la estructura de una alfa-amilasa tipo Termamyl típica según se ha hecho referencia en la presente.

ES 2 286 012 T3

Las alfa-amilasas fúngicas mencionadas arriba, es decir, derivadas de *A. Niger* y *A. oryzae*, son muy homólogas a nivel aminoácido y generalmente consideradas como pertenecientes a la misma familia de las alfa-amilasas. La alfa-amilasa fúngica derivada de *Aspergillus oryzae* está comercialmente disponible bajo el nombre comercial Fungamyl™.

5 Además, cuando se hace referencia a una variante particular de una alfa-amilasa tipo Termamyl (variante de la invención) - de una manera convencional - por referencia a la modificación (p. ej., delección o sustitución) de residuos de aminoácidos específicos en la secuencia de aminoácidos de una alfa-amilasa específica tipo Termamyl, debe entenderse que variantes de otras alfa-amilasas tipo Termamyl modificadas en la(s) posición(es) equivalente(s) (según está determinado a partir del mejor alineamiento posible de las secuencias de aminoácidos entre las secuencias de aminoácidos respectivas) están comprendidas por la presente.

15 Una forma de realización preferida de una variante de la invención es una derivada de una alfa-amilasa de *B. licheniformis* (como la alfa-amilasa progenitora tipo Termamyl), p. ej., una de aquellas a las que se ha hecho referencia antes, tal como la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4.

Construcción de variantes de la invención

20 La construcción de la variante de interés puede ser realizada mediante el cultivo de un microorganismo que comprende una secuencia de ADN que codifica la variante bajo condiciones que son propicias para producir la variante. La variante puede ser recuperada posteriormente del resultante caldo de cultivo. Esto será descrito con más detalle a continuación.

Propiedades alteradas

25 A continuación se discute la relación entre las mutaciones, que pueden estar presentes en las variantes de la invención, y las alteraciones deseables en las propiedades (relativas a las de una alfa-amilasa progenitora tipo Termamyl), que pueden resultar de las mismas.

30 En una forma de realización preferida las variantes anteriores de la invención comprenden una mutación en una posición correspondiente al menos a una de las siguientes mutaciones en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4:

T49+G107A, A52S+V54N+T49L+G107A; o

35 T49F+G107A, T49V+G107A, T49D+G107A, T49Y+G107A, T49S+G107A, T49N+G107A, T49I+G107A, T49L+A52S+G107A, T49L+A52T+G107A, T49L+A52F+G107A, T49L+A52L+G107A, T49L+A52T+G107A, T49L+A52V+G107A.

40 En una forma de realización preferida, una variante de la invención comprende las siguientes mutaciones correspondientes a las siguientes mutaciones en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID. NO: 4:

T49X+A52X+V54N/I/L/Y/F/W+G107A, y pueden además comprender G108A.

45 En una forma de realización preferida una variante de la invención comprende al menos una mutación correspondiente a las siguientes mutaciones en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4:

T49L+G107A;

50 T49I+G107A:

T49L+G107A+V54I;

T49I+G107A+V54I;

55 A52S+V54N+T49L+G107A;

A52S+V54I+T49L+G107A;

60 A52S+T49L+G107A;

A52T+T49L+G107A;

A52S+V54N+T49I+G107A;

65 A52S+V54I+T49I+G107A;

A52S+T49I+G107A.

ES 2 286 012 T3

Todas las variantes de la invención mencionadas arriba tienen propiedades alteradas (lo que significa propiedades aumentadas o disminuidas), en particular al menos una de las siguientes propiedades relativa a la alfa-amilasa progenitora: capacidad reducida para disociar un sustrato cerca del punto de ramificación, especificidad de sustrato mejorada y/o actividad específica mejorada, unión del sustrato alterada, termoestabilidad alterada, perfil de pH/actividad alterado, perfil de pH/estabilidad alterado, estabilidad alterada hacia la oxidación, dependencia del Ca^{2+} alterada.

Estabilidad

En el contexto de la presente invención, las mutaciones (incluyendo las sustituciones y/o deleciones de aminoácidos) importantes con respecto al logro de la estabilidad, en particular la estabilidad mejorada (es decir, más alta o más baja), a un pH especialmente bajo (es decir, pH 4-6) incluyen cualquiera de las mutaciones mencionadas en la sección “propiedades alteradas”, más arriba y las variantes mencionadas justo abajo.

Las variantes siguientes: Q360A, K; N102A, N326A, L, N190G, N190K; Y262A, K, E (usando la numeración BAN, es decir, SEC ID N: 6) fueron también evaluadas por la estabilidad del pH. Una alfa-amilasa progenitora preferida puede ser BA2 anteriormente descrita. La estabilidad del pH fue determinada como se describe en la sección “Materiales & Métodos”.

Estabilidad de Ca^{2+}

Una estabilidad de Ca^{2+} alterada significa que la estabilidad de la enzima bajo la depleción de Ca^{2+} ha sido mejorada, es decir, mayor o menor estabilidad. En el contexto de la presente invención, las mutaciones (incluso las sustituciones del aminoácido) importantes con respecto al logro de la estabilidad de Ca^{2+} alterada, en particular estabilidad de Ca^{2+} mejorada, es decir, mayor o menor estabilidad, a un pH especialmente bajo (es decir, pH 4-6) incluyen cualquiera de las mutaciones mencionadas en la sección “propiedades alteradas” más arriba.

Actividad específica

En otro aspecto de la presente invención, las mutaciones importantes con respecto al logro de las variantes que presentan una actividad específica alterada, en particular una actividad específica aumentada o disminuida, especialmente a temperaturas entre 60-100°C, preferiblemente 70-95°C, especialmente 80-90°C, incluyen cualquiera de las mutaciones catalogadas en la sección “propiedades alteradas” más arriba. La actividad específica de LE174 y LE429 fue determinada a 16,000 NU/mg usando el ensayo de Fadebas® descrito en la sección “Materiales y Métodos”.

Modelo de seccionamiento alterado

En el proceso de la licuefacción del almidón es deseable usar una alfa-amilasa, que sea capaz de degradar las moléculas de almidón en oligosacáridos ramificados largos, más que una alfa-amilasa, dando lugar a la formación de oligosacáridos ramificados más cortos (como las alfa-amilasas tipo Termamyl convencionales). Los oligosacáridos ramificados cortos (precursores de la panosa) no son hidrolizados de manera satisfactora por las pululanases, las cuales se usan después del tratamiento de la alfa-amilasa en el proceso de licuefacción, o simultáneamente con una amiloglucosidasa de sacarificación (glucoamilasa), o antes de añadir una amiloglucosidasa de sacarificación (glucoamilasa). Así, en presencia de los precursores de panosa, la mezcla del presente producto después del tratamiento con glucoamilasa contiene una proporción significativa de la llamada dextrina límite, corta y ramificada, es decir, el trisacárido panosa. La presencia de panosa reduce el rendimiento de la sacarificación significativamente y es por lo tanto indeseable.

Se ha indicado anteriormente (patente estadounidense 5,234,823) que, durante la sacarificación con glucoamilasa y pululanasa, la presencia de actividad alfa-amilasa residual que surge del proceso de licuefacción, puede llevar a rendimientos más bajos de glucosa, si la alfa-amilasa no es inactivada antes de la fase de sacarificación. Esta inactivación puede ser normalmente realizada ajustando el pH por debajo de 4.7 a 95°C, antes de reducir la temperatura a 60°C para la sacarificación.

La razón de este efecto negativo en el rendimiento de la glucosa no está completamente entendido, pero se asume que la alfa-amilasa licuefactante (por ejemplo Termamyl 120 L de *B. licheniformis*) genera “dextrinas límites” (que son sustratos pobres en pululanasa), mediante la hidrolización de enlaces 1,4-alfa-glucosídicos cerca y en ambos lados de los puntos de ramificación en la amilopectina. Las hidrólisis de estas dextrinas límite por la glucoamilasa conduce a una generación del trisacárido panosa, que es sólo lentamente hidrolizado por la glucoamilasa.

El desarrollo de una alfa-amilasa termoestable, que no tenga esta desventaja, sería una mejora significativa, puesto que no se requeriría una inactivación por separado.

Así, el objetivo de la presente invención es conseguir una alfa-amilasa mutante con características de degradación del almidón modificadas de forma apropiada pero que conserve la termostabilidad de la alfa-amilasa progenitora tipo Termamyl.

Por consiguiente, la invención se refiere a una variante de una alfa-amilasa tipo Termamyl, con una capacidad reducida mejorada para disociar un sustrato cerca del punto de ramificación, y que además tiene especificidad de sustrato mejorada y/o actividad específica mejorada.

ES 2 286 012 T3

Es de particular interés una variante, que secciona un sustrato de amilopectina, desde el extremo reductor, más de una unidad de glucosa desde el punto de ramificación, preferiblemente más de dos o tres unidades de glucosa desde el punto de ramificación, es decir, a más distancia desde el punto de ramificación que aquella que se obtiene usando una alfa-amilasa de *B. licheniformis* de tipo salvaje.

5

Se puede mencionar aquí que según WO 96/23874, se prevén variantes que comprenden al menos una de las siguientes mutaciones para prevenir un seccionamiento cerca del punto de ramificación:

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

10

D53L, I, F, Y, W;

Y56W;

15

Q333W;

G57, todos los residuos de aminoácidos posibles;

A52, residuos de aminoácidos más grandes que A, p. ej., A52W, Y, L, F, I.

20

Las mutaciones de interés particular en relación con la obtención de variantes según la invención con una capacidad reducida mejorada para seccionar un sustrato cerca del punto de ramificación, y teniendo además una especificidad de sustrato mejorada y/o una actividad específica mejorada, incluyen las mutaciones en las siguientes posiciones en la alfa-amilasa *B. licheniformis*, SEC ID NO: 4:

25

H156; A181; N190; A209; Q264 y I201.

También, la alfa-amilasa de *B. licheniformis* mostrada en la SEC ID NO: 4 que comprende una o más de las siguientes mutaciones puede ser usada como esqueleto (usando la SEC ID NO: 4 para la numeración de las mutaciones):

30

E119C;

S130C;

35

D124C;

R127C;

A52 todos los residuos de aminoácidos posibles;

40

S85 todos los residuos de aminoácidos posibles;

N96 todos los residuos de aminoácidos posibles;

45

V129 todos los residuos de aminoácidos posibles;

A269 todos los residuos de aminoácidos posibles;

A378 todos los residuos de aminoácidos posibles;

50

S148 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular S148N;

E211 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular E211Q;

55

N188 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular N188S, N188P

M197 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular M197T, M197A, M197G, M197I, M197L, M197Y, M197F, M197I;

60

W138 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular W138Y;

D207 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular D207Y;

H133 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular H133Y;

65

H205 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular H205H, H205C, H205R;

S187 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular S187D;

ES 2 286 012 T3

A210 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular A210S, A210T;

H405 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular H405D;

5 K176 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular K176R;

F279 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular F279Y;

Q298 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular Q298H;

10 G299 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular G299R;

L308 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular L308F;

15 T412 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular T412A;

Además, la alfa-amilasa de *B. licheniformis* mostrada en la SEC ID NO: 4 comprendiendo al menos una de las siguientes mutaciones puede ser usada como esqueleto:

20 M15 todos los residuos de aminoácidos posibles;

A33 todos los residuos de aminoácidos posibles;

25 En una forma de realización preferida una variante de la invención comprende al menos una mutación en una posición correspondiente a las mutaciones siguientes en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4:

T49+G107A, A52S+V54N+T49L+G107A; o

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

En una forma de realización preferida una variante de la invención comprende al menos una mutación en una posición correspondiente a las siguientes mutaciones en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4:

35 T49X+A52X+V54N/I/L/Y/F/W+G107A, y puede además comprender G108A.

En una forma de realización preferida una variante de la invención comprende al menos una mutación en una posición correspondiente a las siguientes mutaciones en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4:

40 T49L-G107A;

T49I+G107A;

T49L+G107A+V54I;

45 T49I+G107A+V54I;

A52S+V54N+T49L+G107A;

50 A52S+V54I+T49L+G107A;

A52S+T49L+G107A;

A52T+T49L+G107A;

55 A52S+V54N+T49I+G107A;

A52S+V54I+T49I+G107A;

60 A52S+T49I+G107A.

Mutaciones generales en variantes de la invención

65 Puede ser preferido que una variante de la invención comprenda una o más modificaciones además de las perfiladas arriba. Así, puede ser ventajoso que uno o más residuos de prolina presente(s) en la parte de la variante de la alfa-amilasa que es modificada sea/sean sustituido(s) con un residuo que no sea de prolina que puede ser cualquiera de los posibles residuos de origen natural que no sean de prolina, y que preferiblemente sea una alanina, glicina, serina, treonina, valina o leucina.

ES 2 286 012 T3

Análogamente, puede ser preferido que uno o más residuos de cisteína presentes entre los residuos de aminoácidos con los cuales la alfa-amilasa progenitora es modificada sea/sean sustituido(s) con un residuo que no sea de cisteína tal como serina, alanina, treonina, glicina, valina o leucina.

5 Además, una variante de la invención puede -en combinación con cualquiera de las modificaciones perfiladas arriba- ser modificada de modo que uno o más Asp y/o Glu presente en un fragmento del aminoácido correspondiente al fragmento del aminoácido 185-209 de la SEC ID n°. 4 sea sustituido por Asn y/o Gln, respectivamente. También es de interés la sustitución, en la alfa-amilasa de tipo Termamyl, de uno o más de los residuos de Lys presentes en un fragmento e aminoácido correspondiente al fragmento de aminoácido 185-209 de la SEC ID NO: 4 por un Arg.

10 Será entendido que la presente invención comprende variantes que incorporan dos o más de las modificaciones perfiladas arriba.

15 Además, puede ser ventajoso introducir mutaciones puntuales en cualquiera de las variantes descritas en la presente.

Métodos para preparar variantes de la alfa-amilasa

20 Diferentes métodos para introducir mutaciones en genes son conocidos en la técnica. Después de una breve discusión sobre la clonación de secuencias de ADN que codifican la alfa-amilasa, se discutirán unos métodos para generar mutaciones en sitios específicos dentro de la secuencia de codificación de la alfa-amilasa.

Clonación de una secuencia de ADN que codifica una alfa-amilasa

25 La secuencia de ADN codificadora de una alfa-amilasa progenitora puede ser aislada de cualquier célula o microorganismo que produzca la alfa-amilasa en cuestión, usando varios métodos bien conocidos en la técnica. En primer lugar, se debería construir una biblioteca de ADN genómico y/o de ADNc usando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo productor de la alfa-amilasa que debe ser estudiada. Después, si la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa es conocida, se pueden sintetizar sondas de oligonucleótidos homólogas y marcadas y se pueden utilizar para identificar clones codificadores de la alfa-amilasa de una biblioteca genómica preparada a partir del organismo en cuestión. De forma alternativa, una sonda de oligonucleótidos marcada conteniendo secuencias homólogas a un gen de alfa-amilasa conocido podría ser usada como una sonda para identificar clones codificadores de la alfa-amilasa, usando condiciones de hibridación y de lavado de astringencia más bajas.

35 Otro método para identificar clones codificadores de la alfa-amilasa implican la inserción de fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, la transformación de bacterias alfa-amilasa- negativas con la resultante biblioteca de ADN genómico, y después la colocación en placas de las bacterias transformadas en agar conteniendo un sustrato para alfa-amilasa, de ese modo permitiendo identificar los clones que codifican la alfa-amilasa.

40 De forma alternativa, la secuencia de ADN codificadora de la enzima puede ser preparada sintéticamente por métodos estándar, p. ej., el método de la fosforamidita descrito por S.L. Beaucage y M.H. Caruthers (1981) o el método descrito por Mattes *et al.* (1984). En el método de la fosforamidita, los oligonucleótidos son sintetizados, p. ej., en un sintetizador de ADN automático, purificados, anillados, ligados y clonados en los vectores apropiados.

45 Finalmente, la secuencia de ADN puede ser de origen mezclado genómico y sintético, de origen mezclado sintético y de ADNc o de origen mezclado genómico y de ADNc, preparado ligando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (si fuera apropiado, los fragmentos correspondientes a varias partes de la secuencia de ADN entera), de acuerdo con las técnicas estándar. La secuencia de ADN puede también ser preparada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4,683,202 o R.K. Saiki *et al.* (1988).

Mutagénesis sitio dirigida

55 Una vez que una secuencia de ADN codificadora de la alfa-amilasa haya sido aislada, y que se hayan identificado los sitios deseables para la mutación, se pueden introducir mutaciones usando los oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios para la mutación deseada; los nucleótidos mutantes son insertados durante la síntesis de los oligonucleótidos. En un método específico, un espacio monocatenario de ADN, que conecta la secuencia codificadora de la alfa-amilasa, es creado en un vector que transporta el gen de la alfa-amilasa. A continuación el nucleótido sintético, que contiene la mutación deseada, es anillado hasta una parte homóloga del ADN monocatenario. El espacio restante es luego rellenado con ADN polimerasa I (fragmento Klenow) y el constructo es ligado usando T4 ligasa. Un ejemplo específico de este método está descrito en Morinaga *et al.* (1984). US 4,760,025 describe la introducción de oligonucleótidos que codifican las mutaciones múltiples mediante la realización de alteraciones mínimas del casete. No obstante, una variedad incluso superior de mutaciones puede ser introducida en cualquier momento por el método de Morinaga, ya que se puede introducir una multitud de oligonucleótidos de varias longitudes.

Otro método para introducir mutaciones en las secuencias de ADN codificadoras de la alfa-amilasa está descrito en Nelson y Long (1989). Implica la generación en 3 fases de un fragmento de PCR que contiene la mutación deseada introducida usando una cadena de ADN sintetizada químicamente como uno de los cebadores en las reacciones de la PCR. A partir del fragmento generado por reacción en cadena de la polimerasa, un fragmento de ADN que transporta la mutación puede ser aislado por el seccionamiento con endonucleasas de restricción y reinsertados en un plásmido de expresión.

Mutagénesis aleatoria

La mutagénesis aleatoria se realiza de manera adecuada bien como una mutagénesis aleatoria localizada o región-específica en al menos tres partes del gen que traduce la secuencia de aminoácidos mostrada en cuestión, o dentro del gen entero.

La mutagénesis aleatoria de una secuencia de ADN que codifica una alfa-amilasa progenitora puede ser convenientemente realizada usando cualquier método conocido en la técnica.

En relación con lo anterior, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para generar una variante de una alfa-amilasa progenitora, p. ej., donde la variante muestra una capacidad reducida de seccionamiento de un sustrato oligosacárido cerca del punto de ramificación, y además presenta especificidad de sustrato mejorada y/o una actividad específica mejorada con respecto al progenitor, el método:

(a) sometiendo una secuencia de ADN codificadora de la alfa-amilasa progenitora a una mutagénesis aleatoria,

(b) expresando la secuencia de ADN mutada obtenida en la fase (a) en una célula huésped, y

(c) seleccionando las células huéspedes que expresan una variante de la alfa-amilasa con una propiedad alterada (es decir, termoestabilidad) con respecto a la alfa-amilasa progenitora

La fase (a) del método anterior de la invención es preferiblemente realizado usando cebadores dopados. Por ejemplo, la mutagénesis aleatoria puede ser realizada usando un agente mutagenizante físico o químico adecuado, usando un oligonucleótido adecuado, o sometiendo la secuencia de ADN a mutagénesis generada por PCR. Además, la mutagénesis aleatoria puede ser realizada usando cualquier combinación de estos agentes mutagenizantes. El agente mutagenizante puede, p. ej., ser uno, que induce transiciones, transversiones, inversiones, aleatorizaciones, deleciones, y/o inserciones.

Ejemplos de un agente mutagenizante físico o químico adecuado para este propósito incluyen la irradiación ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), O-metil hidroxilamina, ácido nitroso, etil metano sulfonato (EMS), bisulfito de sodio, ácido fórmico, y análogos nucleótidos. Cuando estos agentes son usados, la mutagénesis es normalmente realizada incubando la secuencia de ADN que codifica la enzima progenitora que debe ser mutagenizada en presencia del agente mutagenizante de elección bajo condiciones adecuadas para que ocurra la mutagénesis, y seleccionando el ADN mutado que tenga las propiedades deseadas. Cuando la mutagénesis se realiza por el uso de un oligonucleótido, el oligonucleótido puede ser dopado o adicionado con los tres nucleótidos no progenitores durante la síntesis del oligonucleótido en las posiciones que deben ser cambiadas. El dopaje o adicionado puede hacerse de modo que se eviten los codones para los aminoácidos indeseados. El oligonucleótido dopado o adicionado puede ser incorporado en el ADN que codifica la enzima alfa-amilasa mediante cualquier técnica publicada, usando p. ej., PCR, LCR o cualquier ADN-polimerasa y ligasa según se considere apropiado. Preferiblemente, el dopaje se realiza usando un "dopaje aleatorio constante", donde el porcentaje de tipo salvaje y mutación en cada posición está predefinido. Además, el dopaje puede estar dirigido hacia una preferencia para introducir ciertos nucleótidos, y por tanto hacia una preferencia para introducir uno o más residuos de aminoácidos específicos. El dopaje puede hacerse, p. ej., para permitir la introducción del 90% de tipo salvaje y el 10% de mutaciones en cada posición. Una consideración adicional para la elección de un esquema de dopaje se basa en la genética así como en las limitaciones estructurales de las proteínas. El esquema del dopaje puede hacerse usando el programa DOPE, que, entre otras cosas, asegura que se evita la introducción de codones de parada. Cuando se utiliza la mutagénesis generada por PCR, bien un gen tratado o no tratado químicamente que codifica una alfa-amilasa progenitora es sometido a PCR bajo condiciones que aumentan la desincorporación de nucleótidos (Deshler 1992; Leung *et al.*, Technique, Vol.1, 1989, pp. 11-15). Una cepa mutágena de *E. coli* (Fowler *et al.*, Molec. Gen. Genet.; 133, 1974; págs. 179-191), *S. cerevisiae* o cualquier otro organismo microbiano puede ser usada para la mutagénesis aleatoria del ADN que codifica la alfa-amilasa por, p. ej., transformando un plásmido que contenga la glicosilasa progenitora en la cepa mutágena, haciendo crecer la cepa mutágena con el plásmido y aislando el plásmido mutado de la cepa mutágena. El plásmido mutado puede ser posteriormente transformado en el organismo de expresión. La secuencia de ADN para ser mutagenizada puede estar convenientemente presente en una biblioteca genómica o de ADNc obtenida a partir de un organismo que expresa la alfa-amilasa progenitora. De forma alternativa, la secuencia de ADN puede estar presente en un vector adecuado tal como un plásmido o un bacteriófago, que como tal puede ser incubado con o, por el contrario, puede ser expuesto al agente mutagenizante. El ADN que debe ser mutagenizado puede también estar presente en una célula huésped bien estando integrado en el genoma de dicha célula o estando presente en un vector contenido en la célula. Finalmente, el ADN que debe ser mutagenizado puede estar en forma aislada. Se entenderá que la secuencia de ADN que debe ser sometida a mutagénesis aleatoria es preferiblemente una secuencia de ADNc o de ADN genómico. En algunos casos puede ser conveniente el hecho de amplificar la secuencia de ADN mutada antes de realizar la fase de expresión b) o

la fase de selección c). Tal amplificación puede ser realizada de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, el método actualmente preferido es la amplificación generada por PCR usando cebadores oligonucleótidos preparados en base a la secuencia de ADN o secuencia de aminoácidos de la enzima madre. Después de la incubación con o exposición al agente mutagenizante, el ADN mutado es expresado mediante el cultivo de una célula huésped adecuada que transporta la secuencia de ADN bajo condiciones que permiten que la expresión tenga lugar. La célula huésped usada para este propósito puede ser una que haya sido transformada con la secuencia de ADN mutada, opcionalmente presente en un vector, o una que fuera transportada por la secuencia de ADN codificadora de la enzima madre durante el tratamiento por mutagénesis. Ejemplos de células huéspedes adecuadas son las siguientes: bacterias gram positivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; y bacterias gram-negativas tales como *E. coli*. La secuencia de ADN mutada puede además comprender una secuencia de ADN que codifica funciones que permiten la expresión de la secuencia de ADN mutada.

15 *Mutagénesis aleatoria localizada*

La mutagénesis aleatoria puede estar ventajosamente localizada en una parte de la alfa-amilasa progenitora en cuestión. Esto puede, p. ej., ser ventajoso cuando ciertas regiones de la enzima han sido identificadas por ser de importancia particular para una propiedad dada de la enzima, y cuando se modifican se prevé que resulten en una variante con propiedades mejoradas. Tales regiones pueden normalmente ser identificadas cuando la estructura terciaria de la enzima madre ha sido dilucidada y relacionada con la función de la enzima.

La mutagénesis aleatoria localizada, o, región-específica se realiza convenientemente usando técnicas de mutagénesis generada por PCR según el modo descrito anteriormente o cualquier otra técnica adecuada conocida en la técnica. De forma alternativa, la secuencia de ADN que codifica la parte de la secuencia de ADN que debe ser modificada puede ser aislada, p. ej., por inserción en un vector adecuado, y dicha parte puede ser posteriormente sometida a mutagénesis usando cualquiera de los métodos de mutagénesis mencionados anteriormente.

30 *Métodos alternativos para proporcionar variantes de la alfa-amilasa*

Los métodos alternativos para proporcionar variantes de la invención incluyen el método de redistribución de genes conocido en la técnica incluyendo p. ej. los métodos, descritos en WO 95/22625 (de Affymax Technologies N.V.) y WO 96/00343 (de Novo Nordisk A/S).

35 *Expresión de variantes de la alfa-amilasa*

Según la invención, una secuencia de ADN que codifica la variante producida por los métodos descritos anteriormente, o por cualquier método alternativo conocido en la técnica, puede ser expresada, en forma enzimática, usando un vector de expresión que normalmente incluye las secuencias de control que codifican un promotor, operador, sitio de unión del ribosoma, señal de iniciación de la traducción, y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores.

El vector de expresión recombinante que transporta la secuencia de ADN que codifica una variante de la alfa-amilasa de la invención puede ser cualquier vector, que puede convenientemente ser sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que debe ser introducido. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector, que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido, un bacteriófago o un elemento extracromosómico, minicromosoma o un cromosoma artificial. De forma alternativa, el vector puede ser uno que, al introducirse en una célula huésped, se integre en el genoma de la célula huésped y se replique con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se haya integrado.

En el vector, la secuencia de ADN debería ser operativamente conectada a una secuencia del promotor adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN, que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede derivar de proteínas codificadoras de genes bien homólogos o heterólogos a la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN codificadora de una variante de alfa-amilasa de la invención, especialmente en un huésped bacteriano, son el promotor del operón lac de *E. coli*, los promotores del gen de la agarasa *dagA* de *Streptomyces coelicolor*, los promotores del gen de la alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, los promotores del gen de la amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, los promotores de la alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, los promotores de los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis* etc. para la transcripción en un huésped fúngico, ejemplos de promotores útiles son aquellos derivados del gen que codifica la TAKA amilasa de *A. oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la alfa-amilasa neutra de *A. niger*, la alfa-amilasa estable en ácido de *A. niger*, la glucoamilasa *A. niger*, la lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteasa alcalina de *A. oryzae*, la triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae* o la acetamidasa de *A. nidulans*.

El vector de expresión de la invención puede comprender también un terminador de la transcripción adecuado y, en eucariotas, secuencias de poliadenilación operativamente conectadas a la secuencia de ADN que codifica la variante de la alfa-amilasa de la invención. Las secuencias de terminación y de poliadenilación pueden de manera adecuada derivar de las mismas fuentes que el promotor.

El vector puede además comprender una secuencia de ADN que permita que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de secuencias de este tipo son los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

5 El vector puede también comprender un marcador seleccionable, p. ej., un gen cuyo producto implementa una carencia en la célula huésped, tal como los genes *dal* de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, o uno que confiera resistencia a los antibióticos tal como resistencia a la ampicilina, canamicina, cloranfenicol o a la tetraciclina. Además, el vector puede comprender marcadores de la selección de *Aspergillus* tales como *amdS*, *argB*, *niaD* y *sC*, un marcador que de lugar a la resistencia a la higromicina, o la selección puede ser realizada por cotransformación, p. ej., como se describe en WO 91/17243.

Mientras que la expresión intracelular puede ser ventajosa en algunos aspectos, p. ej., cuando se usan ciertas bacterias como las células huéspedes, es generalmente preferido que la expresión sea extracelular. En general, las alfa-amilasas de *Bacillus* mencionadas aquí comprenden una prerregión que permite la secreción de la proteasa expresada en el medio de cultivo. Si fuera deseable, esta prerregión puede ser sustituida por una prerregión diferente o una secuencia señal, convenientemente realizada por la sustitución de las secuencias de ADN que codifican las prerregiones respectivas.

Los procedimientos usados para ligar el constructo de ADN de la invención que codifica una variante de alfa-amilasa, el promotor, terminador y otros elementos, respectivamente, y para insertarlos en los vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989).

La célula de la invención, que comprende sea un constructo de ADN o sea un vector de expresión de la invención tal como se ha definido anteriormente, se utiliza ventajosamente como una célula huésped para la producción recombinante de una variante de alfa-amilasa de la invención. La célula puede ser transformada con el constructo de ADN de la invención que codifica la variante, integrando convenientemente el constructo de ADN (en una o más copias) en el cromosoma huésped. Esta integración está generalmente considerada como una ventaja puesto que la secuencia de ADN tiene más probabilidad de ser mantenida de manera estable en la célula. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped puede ser realizada según métodos convencionales, p. ej., por recombinación homóloga o heteróloga. De forma alternativa, la célula puede ser transformada con un vector de expresión según el modo descrito anteriormente en relación con los diferentes tipos de células huéspedes.

La célula de la invención puede ser una célula de un organismo mayor tal como un mamífero o un insecto, pero es preferiblemente una célula microbiana, p. ej., una célula bacteriana o fúngica (incluida la levadura).

Ejemplos de bacterias adecuadas son bacterias gram-positivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, o *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas tales como *E. coli*. La transformación de las bacterias puede, por ejemplo, efectuarse mediante la transformación del protoplasto o usando células competentes según cierto modo conocido *per se*.

El organismo de la levadura puede ser seleccionado de forma favorable de unas especies de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*. El hongo filamentoso puede ventajosamente ser una especie de *Aspergillus*, p. ej., *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus Niger*. Las células micóticas pueden ser transformadas por un proceso que implica la formación del protoplasto y la transformación de los protoplastos seguido de la regeneración de la pared celular en cierto modo conocido *per se*. Un procedimiento adecuado para la transformación de células huéspedes de *Aspergillus* está descrito en EP 238 023.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una variante de la alfa-amilasa de la invención, dicho método comprende el cultivo de una célula huésped según el modo descrito anteriormente bajo las condiciones propicias para la producción de la variante y la recuperación de la variante de las células y/o del medio de cultivo.

El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para hacer crecer la célula huésped en cuestión y obtener la expresión de la variante de la alfa-amilasa de la invención. Los medios adecuados están disponibles por proveedores comerciales o pueden ser preparados según las recetas publicadas (p. ej., como se describe en catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo).

La variante de la alfa-amilasa segregada a partir de las células huéspedes puede convenientemente ser recuperada del medio de cultivo por procedimientos bien conocidos, incluyendo la separación de las células del medio por centrifugado o filtración, y la precipitación de componentes proteínicos del medio mediante una sal tal como sulfato de amonio, seguido del uso de procedimientos cromatográficos tal como la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, o similar.

Aplicaciones industriales

Las variantes de la alfa-amilasa de esta invención poseen propiedades valiosas que permiten una variedad de aplicaciones industriales. En particular, variantes enzimáticas de la invención son aplicables como un componente para composiciones de detergentes para el lavado, para lavavajillas y para la limpieza de superficies duras. Numerosas variantes son particularmente útiles en la producción de edulcorantes y etanol, p. ej., etanol para combustible, para bebidas o industrial, a partir de almidón, y/o para el descolado textil. Las condiciones para los procesos de conversión del almidón convencionales, incluyendo la licuefacción del almidón y/o procesos de sacarificación, están descritos en, p. ej., 3,912,590 y en las publicaciones de patentes EP Nos. 252 730 y 63 909.

Producción de edulcorantes a partir de almidón

Un proceso "tradicional" para la conversión de almidón en jarabes de fructosa normalmente consiste en tres procesos consecutivos enzimáticos, es decir, un proceso de licuefacción seguido de un proceso de sacarificación y un proceso de isomerización. Durante el proceso de licuefacción, el almidón es degradado en dextrinas por una alfa-amilasa (p. ej., TermamylTM) a valores de pH entre 5.5 y 6.2 y a temperaturas de 95-160°C durante un periodo de aprox. 2 horas. Para asegurar la estabilidad enzimática bajo estas condiciones; se añade 1 mM de calcio (40 ppm de iones de calcio libre).

Después del proceso de licuefacción las dextrinas son convertidas en dextrosa mediante la adición de una glucoamilasa (p. ej., AMGTM) y una enzima desramificante, tal como una isoamilasa o una pululanasa (p. ej., PromozymeTM). Antes de esta fase el pH es reducido a un valor inferior a 4.5, manteniendo la temperatura elevada (por encima de 95°C), y la actividad licuefactante de la alfa-amilasa es desnaturalizada. La temperatura es reducida a 60°C, y se añaden la enzima glucoamilasa y la desramificante. El proceso de sacarificación continua durante 24-72 horas.

Después del proceso de sacarificación el pH es aumentado a un valor en la gama de 6-8, preferiblemente pH 7.5, y el calcio se elimina por intercambio iónico. El jarabe de dextrosa es luego convertido en jarabe rico en fructosa usando, p. ej., una glucosaisomerasa inmovilizada (tal como SweetzymeTM).

Al menos una mejora enzimática de este proceso podría ser prevista: reducción de la dependencia del calcio de la alfa-amilasa licuefactante. Se requiere la adición de calcio libre para asegurar una estabilidad adecuadamente alta de la alfa-amilasa, pero el calcio libre inhibe fuertemente la actividad de la glucosaisomerasa y necesita ser eliminado, mediante una operación individual cara, hasta el punto de reducir el nivel de calcio libre por debajo de 3-5 ppm. Se podrían obtener ahorros en el coste si esta operación pudiera ser evitada y el proceso de licuefacción fuera realizado sin la adición de iones de calcio libre.

Para conseguirlo, se requiere una alfa-amilasa menos calcio-dependiente del tipo Termamyl que sea estable y muy activa a concentraciones bajas de calcio libre (< 40 ppm). Tal alfa-amilasa tipo Termamyl debería tener un pH óptimo a un pH en la gama de 4.5-6.5, preferiblemente en la gama de 4.5-5.5.

La invención también se refiere a una composición que comprende una mezcla de una o más variantes de la invención derivadas de (igual que la alfa-amilasa progenitora tipo Termamyl) la alfa-amilasa de *B. stearothermophilus* que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 8 y una alfa-amilasa tipo Termamyl derivada de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 4.

Una variante de la alfa-amilasa de la invención o una composición de la invención puede en cierto aspecto de la invención ser usada para la licuefacción del almidón, en una composición de detergente, como composiciones para el lavado de la ropa, de la vajilla y para la limpieza de superficies duras, para la producción de etanol, como la producción de etanol para combustible, para bebidas e industrial, para el descolado textil, de tejidos y prendas.

Materiales y métodos*Enzimas**LE174: variante de la alfa-amilasa híbrida*

LE174 es una alfa-amilasa tipo Termamyl híbrida que es idéntica a la secuencia de Termamyl, es decir, la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en la SEC ID NO: 4, a excepción de que los 35 residuos de los aminoácidos N-terminales (de la proteína madura) han sido sustituidos por los 33 residuos de BAN N-terminales (proteína madura), es decir, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la SEC ID NO: 6, que además tiene las mutaciones siguientes:

H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S (SEC ID NO: 4).

ES 2 286 012 T3

LE429 variante de la alfa-amilasa híbrida

LE429 es una alfa-amilasa tipo Termamyl híbrida que es idéntica a la secuencia de Termamyl, es decir, la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en la SEC ID NO: 4, a excepción de que los 35 residuos de los aminoácidos N-terminales (de la proteína madura) han sido sustituidos por los 33 residuos de BAN N-terminales (proteína madura), es decir, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la SEC ID NO: 6, que además tiene las mutaciones siguientes: H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+I201F (SEC ID NO: 4). LE429 está mostrada como la SEC ID NO: 2 y fue construida por SOE-PCR (Higuchi *et al.* 1988, *Nucleic Acids Research* 16:7351).

Dextrozyme™ E: una mezcla equilibrada de glucoamilasa (AMG) y pululanasa obtenible a partir de cepas seleccionadas de *Aspergillus Niger* y *Bacillus deramificans* (disponible por Novo Nordisk A/S).

Fermentación y purificación de variantes de la alfa-amilasa

Una cepa de *B. subtilis* que alberga el plásmido de expresión pertinente es alineada en una placa de LB-agar con 10 micro g/ml de canamicina de stock a -80°C, y se deja crecer durante toda la noche a 37°C.

Las colonias son transferidas a 100 ml de medios de BPX suplementados con 10 micro g/ml de canamicina en un matraz de agitación de 500 ml.

Composición de medio de BPX:

Almidón de patata	100 g/l
Harina de cebada	50 g/l
BAN 5000 SKB	0.1 g/l
Caseinato sódico	10 g/l
Harina de soja	20 g/l
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	9 g/l
Pluronic™	0.1 g/l

El cultivo se agita a 37°C a 270 rpm durante 5 días.

Las células y el detrito celular son eliminados del caldo de fermentación por centrifugado a 4500 rpm en 20-25 minutos. Después el sobrenadante es filtrado para obtener una solución completamente clara. El producto filtrado es concentrado y lavado en un filtro UF (membrana con 10000 cortes) y el tampón es cambiado a 20 mM de acetato a pH 5.5. El producto filtrado de UF es aplicado en una S-Sepharose F.F. y la elución se realiza por fases con 0.2M de NaCl en el mismo tampón. El eluato es dializado contra 10 mM de Tris, pH 9.0 y aplicado en una Q-Sepharose F.F. y eluido con un gradiente lineal de 0-0.3M de NaCl por 6 volúmenes de columna. Las fracciones que contienen la actividad (medida por el ensayo de Phadebas) son agrupadas, el pH fue ajustado a pH 7.5 y el color restante fue eliminado por un tratamiento con 0.5% P/vol. de carbón activo en 5 minutos.

Determinación de la actividad - (KNU)

Una Unidad Kilo de alfa-amilasa (1 KNU) es la cantidad de enzima que rompe 5.26 g de almidón (Merck, Amylum Solubile, Erg. B 6, lote 9947275) por hora en el método estándar de Novo Nordisk para la determinación de alfa-amilasa basándose en la condición siguiente:

Sustrato	almidón soluble
Contenido de calcio en solvente	0.0043 M
Tiempo de reacción	7-20 minutos
Temperatura	37°C
pH	5.6

La descripción detallada del método analítico de Novo Nordisk (AF 9) está disponible bajo petición.

Ensayo para la actividad alfa-amilasa

La actividad alfa-amilasa está determinada por un método que utiliza comprimidos de Phadebas® como sustrato. Los comprimidos de Phadebas (Test de Amilasa de Phadebas®, suministrado por Pharmacia Diagnostic) contiene un polímero de almidón de color azul insoluble reticulado, que ha sido mezclado con albúmina de suero bovino y una sustancia tampón y dispuesto en comprimidos.

Para cada medición individual un comprimido es suspendido en un tubo que contiene 5 ml de tampón Britton-Robinson 50 mM (50 mM de ácido acético; 50 mM de ácido fosfórico; 50 mM de ácido bórico; 0.1 mM de CaCl₂, pH

ES 2 286 012 T3

ajustado al valor de interés con NaOH). La prueba se realiza al baño maría a la temperatura de interés. La alfa-amilasa que debe evaluarse es diluida en x ml de tampón Britton-Robinson 50 mM. 1 ml de esta solución de alfa-amilasa se añade a los 5 ml de tampón Britton-Robinson 50 mM. El almidón es hidrolizado por la alfa-amilasa dando fragmentos azules solubles. La absorbencia de la solución azul resultante, medida espectrofotométricamente a 620 nm, es una función de la actividad de la alfa-amilasa.

Es importante que la absorbencia de 620 nm medida después de 10 o 15 minutos de incubación (tiempo de testado) esté en la gama de 0.2 a 2.0 unidades de absorbencia a 620 nm. En este rango de absorbencia hay linealidad entre actividad y absorbencia (ley de Lambert-Beer). La dilución de la enzima debe en consecuencia ser ajustada para cumplir este criterio. Bajo un grupo específico de condiciones (temp., pH, tiempo de reacción, condiciones del tampón) 1 mg de una alfa-amilasa dada hidrolizará una cantidad determinada de sustrato y un color azul será producido. La intensidad del color es medida a 620 nm. La absorbencia medida es directamente proporcional a la actividad específica (actividad/mg de proteína de la alfa-amilasa pura) de la alfa-amilasa en cuestión según el grupo de condiciones dado.

15 *Determinación de la actividad específica*

La actividad específica se determina usando el ensayo de Phadebas (Pharmacia) como actividad/mg de enzima.

20 *Medición del perfil de actividad del pH (estabilidad del pH)*

La variante es almacenada en 20 mM de Tris pH 7.5, 0.1 mM, CaCl₂ y evaluada a 30°C; 50 mM de Britton-Robinson; 0.1 mM de CaCl₂. La actividad del pH es medida a pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.5, 9.5, 10; y 10.5; usando el ensayo Phadebas anteriormente descrito.

25 *Determinación de la actividad de AGU y como AGU/mg*

Una unidad Novo de amiloglucosidasa (AGU) se define como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto a 37°C y pH 4.3. Una descripción detallada del método analítico (AEL-SM-0131) está disponible bajo petición por Novo Nordisk.

La actividad está determinada como AGU/ml por un método modificado después de (AEL-SM-0131) usando el kit Glucose GOD-Perid de Boehringer Mannheim; 124036. Estándar: AMG estándar, lote 7-1195, 195 AGU/ml.

375 microL de sustrato (maltosa al 1 % en 50 mM de acetato sódico, pH 4.3) es incubado 5 minutos a 37°C. Se añaden 25 microL de enzima diluidos en acetato sódico. La reacción es detenida después de 10 minutos añadiendo 100 microL de NaOH 0.25 M. 20 microL son transferidos a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se añaden 200 microL de solución GOD-Perid. Después de 30 minutos a la temperatura ambiente, la absorbencia es medida a 650 nm y la actividad calculada en AGU/mi a partir del ANG estándar.

La actividad específica en AGU/mg es luego calculada a partir de la actividad (AGU/ml) dividida con la concentración proteínica (mg/ml).

Ejemplos

45 Ejemplo 1

(Ejemplo referencial)

50 *Construcción de variantes de Termamyl según la invención*

Termamyl (alfa-amilasa de *B. licheniformis* de la SEC ID NO: 4) es expresada en *B. subtilis* a partir de un plásmido denominado pDN1528. Este plásmido contiene el gen completo que codifica Termamyl, *amyL*, cuya expresión es dirigida por su propio promotor. Además, el plásmido contiene el origen de replicación, *ori*, del plásmido pUB110 y el gen *cat* del plásmido pC194 lo que confiere resistencia al cloranfenicol. pDN1528 está mostrado en la Fig. 9 de WO 96/23874. Se preparó un vector específico de la mutagénesis conteniendo una mayor parte de la región de codificación de la SEC ID NO: 3. Las características más importantes de este vector, denominado pJeEN1, incluyen un origen de replicación derivado de los plásmidos pUC, el gen *cat* que confiere resistencia al cloranfenicol, y una versión conteniendo un desplazamiento del marco de lectura del gen *bla*, cuyo tipo salvaje normalmente confiere resistencia a la ampicilina (fenotipo amp^s). Esta versión mutada resulta en un fenotipo amp^s. El plásmido pJeEN1 está mostrado en la Fig. 10 de WO 96/23874, y el origen de replicación de *E. coli*, *ori*, *bla*, *cat*, la versión truncada en 5' del gen de la amilasa de Termamyl y sitios de restricción seleccionados están indicados en el plásmido.

Se introducen mutaciones en *amyL* por el método descrito por Deng y Nickoloff (1992, *Anal. Biochem.* 200, págs. 81-88) a excepción de que los plásmidos con el “cebador de selección” (cebador #6616; ver más abajo) incorporados están seleccionados en base al fenotipo amp^r de células transformadas de *E. coli* que contienen un plásmido con un gen *bla* reparado, en vez de utilizar la selección por digestión de la enzima de restricción perfilada por Deng y Nickoloff. Los productos químicos y enzimas usados para la mutagénesis fueron obtenidos a partir del kit de mutagénesis Chameleon[®] de Stratagene (número de fabricación 200509).

ES 2 286 012 T3

Después de la verificación de la secuencia de ADN en los plásmidos variantes, el gen truncado, conteniendo la alteración deseada, es subclonado en pDN1528 como un fragmento PstI-EcoRI y transformado en la cepa SHA273 pobre en proteasa y amilasa de *Bacillus subtilis* (descrita en WO92/11357 y WO95/10603) para expresar la enzima variante.

5 La variante de Termamyl V54W fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5' a 3', de izquierda a derecha):

PG GTC GTA GGC ACC GTA GCC CCA ATC CGC TTG (SEC ID NO: 9)

10

La variante de Termamyl A52W + V54W fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5' a 3', de izquierda a derecha):

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

Cebador #6616 (escrito 5' a 3', de izquierda a derecha; P se refiere a un 5' fosfato):

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

La variante de Termamyl V54E fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):

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

La variante de Termamyl V54M fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):

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

La variante de Termamyl V54I fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):

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

40

Las variantes de Termamyl Y290E y Y290K fueron construidas usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):

45 PGC AGC ATG GAA CTG CTY ATG MG AGG CAC GTC AAA C (SEC ID NO:15)

Y representa una mezcla igual de C y T. La presencia de un codón que codifica bien glutamato o lisina en la posición 290 fue verificada por la secuenciación del ADN.

50

La variante de Termamyl N190F fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):

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

La variante de Termamyl N188P+N190F fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):

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

La variante de Termamyl H140K+H142D fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):

65 PCC GCG CCC CGG GAA ATC AAA TTT TGT CCA GGC TTT AAT TAG (SEC ID NO: 18)

ES 2 286 012 T3

La variante de Termamyl H156Y fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):

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

5

La variante de Termamyl A181T fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):

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

10

La variante de Termamyl A209V fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):

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

15

La variante de Termamyl Q264S fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):

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

20

La variante de Termamyl S187D fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):

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

25

La variante de Termamyl DELTA(K370-G371-D372) (es decir, delecionada de los residuos de aminoácidos nos. 370, 371 y 372) fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):

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

30

La variante de Termamyl DELTA(D372-S373-Q374) fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):

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

40

Las variantes de Termamyl A181T y A209V fueron combinadas a A181T+A209V mediante la digestión del plásmido tipo pDN1528 conteniendo A181T (es decir, pDN1528 conteniendo dentro de *amyL* la mutación dando como resultado la alteración de A181T) y el plásmido tipo pDN1528 conteniendo A209V (es decir, pDN1528 conteniendo dentro de *amyL* la mutación dando como resultado la alteración de A209V) con la enzima de restricción *ClaI* que corta los plásmidos tipo pDN1528 dos veces dando como resultado un fragmento de 1116 pares de bases y la parte del vector (es decir que contiene el origen de replicación del plásmido) de 3850 pares de bases. El fragmento que contiene la mutación A209V y la parte del vector conteniendo la mutación de A181T fueron purificados por el kit de extracción en gel QIAquick (adquirido de Qiagen) después de la separación en un gel de agarosa. El fragmento y el vector fueron ligados y transformados en la cepa de *Bacillus subtilis* baja en proteasa y amilasa a la que se ha hecho referencia más arriba. El plásmido de *amy+* (zonas de aclarado en placas de agar con contenido en almidón) y transformantes resistentes al cloranfenicol fueron analizados para la presencia de ambas mutaciones en el plásmido.

45

50

De forma similar según se ha descrito anteriormente, H156Y y A209V fueron combinados utilizando las endonucleasas de restricción *Acc65I* y *EcoRI*, dando H156Y+A209V.

55

H156Y +A209V y A181T+A209V fueron combinados en H156Y+ A181T+A209V usando las endonucleasas de restricción *Acc65I* y *HindIII*.

60

Los 35 residuos N-terminales de la parte madura de la variante de Termamyl H156Y+ A181T+A209V fueron sustituidos por los 33 residuos N-terminales de alfa-amilasa de *B. amyloliquefaciens* (SEC ID NO: 4) (que en este contexto se denomina BAN) por un enfoque de SOE-PCR (Higuchi *et al.* 1988, *Nucleic Acids Research* 16:7351) como sigue:

65

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

ES 2 286 012 T3

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

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

5 Cebador 1C: CTC GTC CCA ATC GGT TCC GTC (SEC ID NO: 29)

10 Una PCR estándar, reacción en cadena de la polimerasa, se efectuó usando la polimerasa Pwo termoestable de Boehringer Mannheim según las instrucciones del fabricante y el ciclo de temperatura: 5 minutos a 94°C; 25 ciclos de (94°C durante 30 segundos; 50°C durante 45 segundos; 72°C durante 1 minuto); 72°C durante 10 minutos.

Un fragmento de aproximadamente 130 bp fue amplificado en una primera PCR denominada PCR1 con los cebadores 19364 y 19362 en un fragmento de ADN conteniendo el gen codificador de la alfa-amilasa de *B. amyloliquefaciens*.

15 Un fragmento de aproximadamente 400 bp fue amplificado en otra PCR denominada PCR2 con los cebadores 19363 y 1C en el molde pDN1528.

20 PCR1 y PCR2 fueron purificadas a partir de un gel de agarosa y usadas como moldes en PCR3 con los cebadores 19364 y 1C, que dieron como resultado un fragmento de aproximadamente 520 bp. Este fragmento contiene así una parte del ADN que codifica el N-término de BAN fusionado a una parte del ADN que codifica el Termamyl a partir del 35º aminoácido.

25 El fragmento de 520 bp fue subclonado en un plásmido tipo pDN1528 (conteniendo la variante de Termamyl del gen que codifica H156Y+ A181T+A209V) mediante la digestión con las endonucleasas de restricción *Pst*I y *Sac*II, la ligadura y la transformación de la cepa de *B. subtilis* tal y como se ha descrito anteriormente. La secuencia de ADN entre los sitios de restricción *Pst*I y *Sac*II fue verificada por la secuenciación del ADN en los plásmidos extraídos de *amy*+ y los transformantes resistentes al cloranfenicol.

30 El constructo final conteniendo el N-término correcto de BAN y H156Y+ A181T+A209V fue denominado BAN (1-35)+ H156Y+ A181T+A209V.

35 N190F fue combinado con BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+A209V dando BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+N190F+A209V realizando la mutagénesis según el modo descrito anteriormente a excepción de que la secuencia de *amy*L en pJeEN1 fue sustituida por la variante de Termamyl de la secuencia de ADN que codificaba BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+A209V.

40 Q264S fue combinado con BAN(1-35)+ H156y+ A181T+A209V dando BAN(1-35)+ H156y+ A181T+A209V+Q264S realizando la mutagénesis según el modo descrito anteriormente a excepción de que la secuencia de *amy*L en pJeEN fue sustituida por la variante de Termamyl de la secuencia de ADN que codificaba BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+A209V.

45 BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+A209V+Q264S y BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+N190F+A209V fueron combinados en BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+N190F+A209V+Q264S utilizando las endonucleasas de restricción *Bsa*HI (el sitio *Bsa*HI fue introducido cerca de la mutación de A209V) y *Pst*I. I201F fue combinado con BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+N190F+A209V+Q264S dando BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+N190F+A209V+Q264S+I201F (SEC ID NO: 2) realizando la mutagénesis según el modo descrito anteriormente. Se utilizó el cebador de la mutagénesis AM100, se introdujo la sustitución I201F y se eliminó simultáneamente un sitio de restricción *Cl*aI, facilitando la identificación de los mutantes.

50 cebador AM100:
5'GATGTATGCCGACTTCGATTATGACC 3' (SEC ID NO: 30)

Ejemplo 2

55 (Ejemplo referencial)

Construcción de variantes de la alfa-amilasa tipo Termamyl con un modelo de seccionamiento alterado según la invención

60 La variante de la alfa-amilasa termoestable de *B. licheniformis* consistente comprendiendo los 445 residuos de los aminoácidos C-terminales de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* mostrada en la SEC ID NO: 4 y los 37 residuos de los aminoácidos N-terminales de la alfa-amilasa derivada de *B. amyloliquefaciens* mostrada en la SEC ID NO: 6, y comprendiendo además las mutaciones siguientes:

65 H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+I201F (la construcción de esta variante está descrita en el ejemplo 1, y la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 2) tiene una capacidad reducida de seccionar un sustrato cerca del punto de ramificación.

ES 2 286 012 T3

En un intento de mejorar adicionalmente la capacidad reducida de seccionar un sustrato cerca del punto de ramificación de dicha variante de la alfa-amilasa, se efectuó una mutagénesis sitio dirigida usando el método Mega-primer como se describe por Sarkar y Sommer; 1990 (BioTechniques 8: 404-407).

5 Construcción de LE313: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S+V54N

El cebador específico del gen 27274 y el cebador mutagénico AM115 se utilizan para amplificar por PCR un fragmento de ADN de aproximadamente 440 bp a partir de un plásmido tipo pDN1528 (albergando las mutaciones BAN(1-35)+H156Y+A181T+N190F+I201 F+A209V+Q264S en el gen que codifica la amilasa de la SEC ID NO: 4).
10 El fragmento de 440 bp es purificado a partir de un gel de agarosa y se usa como Mega-primer junto con el cebador 113711 en una segunda PCR realizada en el mismo molde.

El fragmento resultante de aproximadamente 630 bp es digerido con las enzimas de restricción EcoR V y Acc65 I y el fragmento de ADN resultante de aproximadamente 370 bp es purificado y ligado con el plásmido tipo pDN1528 digerido con las mismas enzimas. Las células competentes SHA273 de *Bacillus subtilis* (bajas en amilasa y proteasa)
15 son transformadas con la ligadura y los transformantes resistentes al cloranfenicol son controlados por la secuenciación del ADN para verificar la presencia de las mutaciones correctas en el plásmido.

Cebador 27274:
20 5' CATAGTTGCCGAATTCATTGGAAACTTCCC 3' (SEC ID NO: 31)

Cebador 1B:
25 5' CCGATTGCTGACGCTGTTATTTGC 3' (SEC ID NO: 32)

Cebador AM115:
5' GCCAAGCGGATAACGGCTACGGTGC 3' (SEC ID NO:33)

30 Construcción de LE314: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S + A52S se realiza en una vía similar, a excepción de que se usa el cebador mutagénico AM116.

AM116:
35 5' GAACGAGCCAATCGGACGTGGGCTACGG 3' (SEC ID NO: 34)

Construcción de LE315: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S + A52S+V54N se realiza en una vía similar, a excepción de que se usa el cebador mutagénico AM117.

40 AM117:
5' GGAACGAGCCAATCGGATAACGGCTACGGTGC 3' (SEC ID NO: 35)

45 Construcción de LE316: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S + T49L se realiza en una vía similar, a excepción de que se usa el cebador mutagénico AM118.

A.M118:
50 5' GCATATAAGGGACTGAGCCAAGCGG 3' (SEC ID NO: 36)

Construcción LE317: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S + T49L+G107A se realiza en una vía similar, a excepción de que se usan el cebador mutagénico AM118 y el cebador mutagénico AN119 simultáneamente.

AM119:
55 5' CAACCACAAAGCCGGCGCTGATGCG 3' (SEC ID NO: 37)

Construcción de LE318: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S + A52S+V54N+ T49L-G107A se realiza en una vía similar, a excepción de que se usan el cebador mutagénico AM120 y el cebador mutagénico AM119 simultáneamente.

65 AM 120:
5' GCATATAAGGGACTGAGCCAATCGGATAACGGCTACGGTGC 3' (SEC ID NO: 38)

ES 2 286 012 T3

Construcción de LE319: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S +A52S+V54N+T49L se realiza en una vía similar, a excepción de que se usa el cebador mutagénico AM120.

5 Construcción de LE320: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S + G107A se realiza en una vía similar, a excepción de que se usa el cebador mutagénico AM119.

10 Construcción de LE322: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S + Q51R+A52S se realiza en una vía similar, a excepción de que se usa el cebador mutagénico AM121.

AM121:

5' GAACGAGCCGATCGGACGTGGGCTACGG 3'

(SEC ID NO:39)

15

Construcción de LE323: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S + A52N se realiza en una vía similar, a excepción de que se usa el cebador mutagénico AM122.

20 AM122:

5' GAACGAGCCAAAACGACGTGGGCTACGG 3'

(SEC ID NO: 40)

25 Ejemplo 3

(Ejemplo referencial)

Testado de variantes LE429 (sacarificación)

30 Las condiciones de reacción estándares fueron:

Concentración del sustrato	30% p/p
Temperatura	60°C
35 pH Inicial (a 60°C)	5.5
Dosificación enzimática	

40

Glucoamilasa	0.18 AGU/g DS
Pululanasa	0.06 PUN/g DS

alfa-Amilasa	10 micro g enzima/g DS
--------------	------------------------

45 Dextrozyme™ E fue usada para obtener actividades glucoamilasa y pululanasa

50 Los sustratos para la sacarificación fueron preparados disolviendo almidón de maíz común en agua desionizada y ajustando la sustancia seca a aproximadamente 30% p/p. El pH fue ajustado a 5.5 (medido a 60°C), y partes alícuotas de sustrato correspondientes a 10 g por peso en seco fueron transferidas a frascos de vidrio con tapón azul.

55 Los frascos fueron luego colocados al baño María con agitación equilibrado a 60°C, y las enzimas fueron añadidas. El pH se reajustó a 5.5 cuando fue necesario. Las muestras fueron tomadas después de 48 horas de sacarificación; el pH fue ajustado a aproximadamente 3.0, y luego se calentaron al baño María con ebullición durante 15 minutos para inactivar las enzimas. Tras el enfriamiento, las muestras fueron tratadas con aproximadamente 0.1 g de resina de intercambio iónico de lecho mezclado (BIO-RAD 501 X8 (D)) durante 30 minutos en un mezclador giratorio para eliminar las sales y N soluble. Después de la filtración, la composición de carbohidratos fue determinada por HPLC. Se obtuvieron los siguientes resultados:

60 La alfa-amilasa progenitora para las variantes es LE429.

65

ES 2 286 012 T3

Variantes de alfa-amilasa añadidas	DP ₁	DP ₂	DP ₃	SPEC. ACT. (NU/mg)
V54N	96.1	1.75	1.18	8200
A52S	95.9	1.80	1.11	18800
A52S+V54N	96.3	1.84	1.08	10000
T49L	96.3	1.77	1.11	12300
T49L+G107A	96.4	1.87	0.72	13600
A52S+V54N+T49L+G107A	80.5	2.55	0.43	10000
A52S+V54N+T49L	95.8	1.76	0.84	8400
G107A	94.4	1.89	1.04	19600
Q51R+A52S	96.9	1.77	1.27	16500
A52N	95.5	1.89	1.56	17600
LE174 (CONTROL)	95.9/ 95.8	1.87/ 1.83	1.17/ 1.35	16000

En comparación con el control, la presencia de una variante de alfa-amilasa activa de la invención durante la licuefacción resulta en niveles de panosa disminuidos (DP₃).

Especialmente la variante T49L+G107A de LE429 y la variante A52S+V54N+T49L de LE429, respectivamente, suponen un nivel de panosa drásticamente disminuido (DP₃). Si estas variantes de la alfa-amilasa son usadas para la licuefacción del almidón, no será necesario inactivar la enzima antes del inicio de la sacarificación.

Ejemplo 4

(Ejemplo referencial)

Licuefacción y sacarificación de las variantes de LE429

El experimento del ejemplo 3 fue repetido para otras variantes de LE429 bajo las mismas condiciones. El resultado está mostrado a continuación:

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 286 012 T3

Perfil variante/azúcar	DP1	DP2	DP3	DP4+
T49V+G107A	95.9%	1.72%	1.27%	1.11%
T49Y+G107A	95.3%	1.73%	1.29%	1.65%
T49N+G107A	95.7%	1.64%	1.51%	1.18%
T49L+A52S+G107A	95.7%	1.73%	0.95%	1.67%
T49L+A52T+G107A	95.8%	1.66%	1.03%	1.48%
T49L+A52F+G107A	95.7%	1.69%	1.16%	1.42%
T49L+A52L+G107A	95.5%	1.70%	1.40%	1.38%
T49L+A52I+G107A	95.9%	1.72%	1.31%	1.07%
T49L+A52V+G107A	94.7%	1.69%	1.16%	2.44%
T49L+A52V+G107A+A111V	94.5%	1.75%	0.72%	2.99%
LE429	94.9%	1.71%	1.85%	1.51%

Ejemplo 5

(Ejemplo referencial)

El experimento del ejemplo 3 fue repetido para varias variantes de LE429 con la excepción de que la licuefacción se efectuó a 95°C, pH 6.0 y la sacarificación a 60°C, pH 4.5, 40 ppm de CaCl₂, seguido de la inactivación. La variante a la que se hace referencia más abajo es la variante de LE429. Los resultados encontrados son los siguientes:

Perfil variante/azúcar	DP4+	DP3	DP2	DP1
T49F	1.15	0.92	1.83	96.12
T49D+G107A	0.84	1.03	1.82	96.3
T49I+G107A	0.97	0.64	1.84	96.55
T49L+G107A	0.96	0.81	1.82	96.42
T49L+A52S+G107A	1.37	0.75	1.88	96.01
T49L+A52T+G107A	0.87	0.81	1.8	96.52
T49L+A52F+G107A	0.98	0.83	1.87	96.31
T49V+G107A	0.65	0.8	2.13	96.43
T49Y+G107A	0.83	0.94	1.89	96.35
LE429	1.16	1.21	1.77	95.87

Referencias citadas

- Klein, C., et al., *Biochemistry* 1992, 31, 8740-8746,**
- 5 **Mizuno, H., et al., *J. Mol. Biol.* (1993) 234, 1282-1283,**
- Chang, C., et al, *J. Mol. Biol.* (1993) 229, 235-238,**
- 10 **Larson, S.B., *J. Mol. Biol.* (1994) 235, 1560-1584,**
- Lawson, C.L., *J. Mol. Biol.* (1994) 236, 590-600,**
- Qian, M., et al., *J. Mol. Biol.* (1993) 231, 785-799,**
- 15 **Brady, R.L., et al., *Acta Crystallogr. sect. B*, 47, 527-535,**
- Swift, H.J., et al., *Acta Crystallogr. sect. B*, 47, 535-544**
- A. **Kadziola**, Ph.D. Thesis: "An alpha-amylase from Barley and its Complex with a Substrate Analogue Inhibitor Studied by X-ray Crystallography", Department of Chemistry University of Copenhagen 1993
- 20 **MacGregor, E.A.**, Food Hydrocolloids, 1987, Vol.1, No. 5-6, p. B. Diderichsen and L. Christiansen, Cloning of a maltogenic amylase from *Bacillus stearothermophilus*, *FEMS Microbiol. letters*: 56: pp. 53-60 (1988)
- 25 **Hudson et al., *Practical Immunology*, Third edition (1989), Blackwell Scientific Publications,**
- Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989**
- S.L. **Beaucage** and M.H. **Caruthers**, *Tetrahedron Letters* 22, 1981, pp. 1859-1869
- 30 **Matthes et al., *The EMBO J.* 3, 1984, pp. 801-805.**
- R.K. **Saiki et al., *Science* 239, 1988, pp. 487-491.**
- 35 **Morinaga et al., (1984, *Biotechnology* 2:646-639)**
- Nelson and Long, *Analytical Biochemistry* 180, 1989, pp. 147-151**
- Hunkapiller et al., 1984, *Nature* 310:105-111**
- 40 **R. Higuchi, B. Krummel, and R.K. Saiki (1988). A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucl. Acids Res.* 16:7351-7367.**
- Dubnau et al., 1971, *J. Mol. Biol.* 56, pp. 209-221.**
- 45 **Gryczan et al., 1978, *J. Bacteriol.* 134, pp. 318-329.**
- S.D. **Erlich, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, pp. 1680-1682.**
- 50 **Boel et al., 1990, *Biochemistry* 29, pp. 6244-6249**
- Sarkar and Sommer, 1990, *BioTechniques* 8, pp. 404-407.**

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Alfa-amilasa

5 i) con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4 o 8 en la presente, o

ii) con la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1 o figura 2, o

10 iii) con la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 3, o

iv) alfa-amilasa que muestra al menos el 90% de homología con las alfa-amilasas de i), ii) o iii),

15 donde la alfa-amilasa comprende la alteración G107A, y donde la posición 107 corresponde a la posición 107 de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 4.

2. Alfa-amilasa según la reivindicación 1, que comprende una mutación en una posición correspondiente a una de las siguientes mutaciones en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4:

20 T49L+G107A, A52S+V54N+T49L+G107A; o

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

25 3. Constructo de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una alfa-amilasa según la reivindicación 1 o reivindicación 2.

4. Vector de expresión recombinante que transporta un constructo de ADN según la reivindicación 3.

30 5. Célula transformada con un constructo de ADN según la reivindicación 3 o un vector según la reivindicación 4.

35 6. Célula según la reivindicación 5, que es un microorganismo, en particular una bacteria o un hongo, tal como una bacteria Gram positiva tal como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus* o *Bacillus thuringiensis*.

7. Composición que comprende:

40 (i) una mezcla de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* teniendo la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 4 con una o más alfa-amilasas según la reivindicación 1 o reivindicación 2 derivada de la alfa-amilasa de *B. stearothermophilus* teniendo la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 8; o

45 (ii) una mezcla de la alfa-amilasa de *B. stearothermophilus* teniendo la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 8 con una o más alfa-amilasas según la reivindicación 1 o reivindicación 2 derivada de una o más alfa-amilasas; o

(iii) una mezcla de una o más alfa-amilasas según la reivindicación 1 o reivindicación 2 derivada de la alfa-amilasa de *B. stearothermophilus* teniendo la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 8 con una o más alfa-amilasas según la reivindicación 1 o reivindicación 2 derivada de una o más alfa-amilasas.

50 8. Composición que comprende:

55 una mezcla de una o más alfa-amilasas según la reivindicación 1 o reivindicación 2 derivada de la alfa-amilasa de *B. stearothermophilus* teniendo la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 8 y una alfa-amilasa derivada de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* teniendo la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 4.

60 9. Uso de una alfa-amilasa según la reivindicación 1 o reivindicación 2 o una composición según cualquiera de la reivindicación 7 o reivindicación 8 para la licuefacción del almidón; en una composición de detergente, tal como composiciones para el lavado de la ropa, para lavavajillas y para la limpieza de superficies duras; para la producción de etanol, como la producción de etanol para combustible, para bebidas e industrial; para el descolado de telas, tejidos o prendas.

ES 2 286 012 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Novo Nordisk A/S																
5	<120>																
	<130>																
10	<160> 40																
	<170> PatentIn Ver. 2.1																
15	<210> 1																
	<211> 1443																
	<212> ADN																
20	<213> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>																
	<220>																
	<221> CDS																
25	<222> (1)..(1443)																
	<400> 1																
30	gta	ant	ggc	acg	ctg	atg	cag	tat	ttt	gaa	tgg	tat	acg	ccg	aac	gac	48
	Val	Asn	Gly	Thr	Leu	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr	Thr	Pro	Asn	Asp	
	1				5					10					15		
35	ggc	cag	cat	tgg	aaa	cga	ttg	cag	aat	gat	gcg	gaa	cat	tta	tcg	gat	96
	Gly	Gln	His	Trp	Lys	Arg	Leu	Gln	Asn	Asp	Ala	Glu	His	Leu	Ser	Asp	
				20					25					30			
40	atc	ggt	att	act	gcc	gtc	tgg	att	ccc	ccg	gca	tat	aag	gga	acg	agc	144
	Ile	Gly	Ile	Thr	Ala	Val	Trp	Ile	Pro	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gly	Thr	Ser	
			35					40					45				
45	caa	gcg	gat	gtg	ggc	tac	ggt	gct	tac	gac	ctt	tat	gat	tta	ggg	gag	192
	Gln	Ala	Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asp	Leu	Gly	Glu	
	50				55							60					
50	ttt	cat	caa	aaa	ggg	acg	gtt	cgg	aca	aag	tac	ggc	aca	aaa	gga	gag	240
	Phe	His	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly	Thr	Lys	Gly	Glu	
	65				70					75					80		
55	ctg	caa	tct	gcg	atc	aaa	agt	ctt	cat	tcc	cgc	gac	att	aac	gtt	tac	288
	Leu	Gln	Ser	Ala	Ile	Lys	Ser	Leu	His	Ser	Arg	Asp	Ile	Asn	Val	Tyr	
					85					90					95		
60	ggg	gat	gtg	gtc	atc	aac	cac	aaa	ggc	ggc	gct	gat	gcg	acc	gaa	gat	336
	Gly	Asp	Val	Val	Ile	Asn	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp	Ala	Thr	Glu	Asp	
				100				105						110			
65	gta	acc	gcg	ggt	gaa	gtc	gat	ccc	gct	gac	cgc	aac	cgc	gta	att	tca	384
	Val	Thr	Ala	Val	Glu	Val	Asp	Pro	Ala	Asp	Arg	Asn	Arg	Val	Ile	Ser	
			115					120					125				
70	gga	gaa	cac	cta	att	aaa	gcc	tgg	aca	cat	ttt	cat	ttt	ccg	ggg	cgc	432
	Gly	Glu	His	Leu	Ile	Lys	Ala	Trp	Thr	His	Phe	His	Phe	Pro	Gly	Arg	
			130				135					140					
75	ggc	agc	aca	tac	agc	gat	ttt	aag	tgg	tat	tgg	tac	cat	ttt	gac	gga	480
	Gly	Ser	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	Tyr	Trp	Tyr	His	Phe	Asp	Gly	
	145				150						155				160		
80	acc	gat	tgg	gac	gag	tcc	cga	aag	ctg	aac	cgc	atc	tat	aag	ttt	caa	528
	Thr	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Asn	Arg	Ile	Tyr	Lys	Phe	Gln	
					165					170					175		

ES 2 286 012 T3

	ggg aag act tgg gat tgg gaa gtt tcc aat gaa ttc ggc aac tat gat	576
	Gly Lys Thr Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Phe Gly Asn Tyr Asp	
	180	185
5	tat ttg atg tat gcc gac ttt gat tat gac cat cct gat gtc gta gca	524
	Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Phe Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Val Ala	
	195	200
10	gag att aag aga tgg ggc act tgg tat gcc aat gaa ctg caa ttg gac	672
	Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln Leu Asp	
	210	215
15	ggt ttc cgt ctt gat gct gtc aaa cac att aaa ttt tct ttt ttg cgg	720
	Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg	
	225	230
20	gat tgg gtt aat cat gtc agg gaa aaa acg ggg aag gaa atg ttt acg	768
	Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr	
	245	250
25	gta gct gag tac tgg tcc aat gac ttg ggc gcg ctg gaa aac tat ttg	816
	Val Ala Glu Tyr Trp Ser Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu	
	260	265
30	aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg cgg ott cat tat	864
	Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr	
	275	280
35	cag ttc cat gct gca tcc aca cag gga ggc ggc tat gat atg agg aaa	912
	Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys	
	290	295
40	ttg ctg aac ggt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa tcc gtt aca	960
	Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser Val Thr	
	305	310
45	ttt gtc gat aac aat gat aca cag ccg ggg caa tcc ett gag tcc act	1008
	Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr	
	325	330
50	gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct ttt att ctc aca agg	1056
	Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg	
	340	345
55	gaa tot gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg acg aaa	1104
	Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys	
	355	360
60	gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att gaa ccg	1152
	Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro	
	370	375
65	atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tcc gga gca cag cat gat tat	1200
	Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr	
	385	390
70	ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac agc tcc	1248
	Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser	
	405	410
75	gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc ggt ggg	1296
	Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly	
	420	425
80	gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca tgg cat	1344
	Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His	
	435	440

ES 2 286 012 T3

```

gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc aat tcg gaa ggc      1392
Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly
      450                      455                      460

5   tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg ccg gtt tca att tat gtt caa      1440
Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln
      465                      470                      475                      480

      aga                      1443
      Arg

10  <210> 2
      <211> 481
      <212> PRT
15  <213> Bacillus amyloliquefaciens

      <400> 2

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

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

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

      Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
      50                      55                      60

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

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

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

40  Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val Ile Ser
      115                     120                     125

      Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro Gly Arg
      130                     135                     140

45  Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Tyr Trp Tyr His Phe Asp Gly
      145                     150                     155                     160

      Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys Phe Gln
      165                     170                     175

50  Gly Lys Thr Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Phe Gly Asn Tyr Asp
      180                     185                     190

      Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Phe Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Val Ala
      195                     200                     205

55  Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln Leu Asp
      210                     215                     220

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

60  Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr
      245                     250                     255

```

65

ES 2 286 012 T3

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

- <210> 3
- 45 <211> 1920
- <212> ADN
- <213> *Bacillus licheniformis*
- 50 <220>
- <221> CDS
- <222> (421)..(1872)
- 55 <400> 3

cggaagattg gaagtacaaa aatagcaaa agattgtcaa tcatgtcatg agccatgctg 60
 gagacggaaa aatcgtctta atgcacgata tttatgcaac gttcgcagat gctgctgaag 120
 agattattaa aaagctgaaa gcaaaaggct atcaattggt aactgtatct cagcttgaag 180
 aagtgaagaa gcagagaggc tattgaataa atgagtagaa gcgccatctc ggcgcttttc 240
 65 ttttggaaaj aatataggg aaaatggtac ttgttaaaaa ttcggaatat ttatacaaca 300

ES 2 286 012 T3

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

65

ES 2 286 012 T3

ttt acg gta gct gaa tat tgg cag aat gac ttg ggc gcg ctg gaa aac 1236
 Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn
 260 265 270

5
 tat ttg aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt 1284
 Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
 275 280 285

10
 cat tat cag ttc cat gct gca tcg aca cag gga ggc ggc tat gat atg 1332
 His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
 290 295 300

15
 agg aaa ttg ctg aac ggt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa tcg 1380
 Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser
 305 310 315 320

20
 gtt aca ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tcg ctt gag 1428
 Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
 325 330 335

25
 tcg act gtc caa aca tgg ttt aag ccg ett gct tac gct ttt att ctc 1476
 Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
 340 345 350

30
 aca agg gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg 1524
 Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
 355 360 365

35
 acg aaa gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att 1572
 Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile
 370 375 380

40
 gaa ccg atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat 1620
 Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His
 385 390 395 400

45
 gat tat ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac 1668
 Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
 405 410 415

50
 agc tcg gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc 1716
 Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
 420 425 430

55
 ggt ggg gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca 1764
 Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr
 435 440 445

60
 tgg cat gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc aat tcg 1812
 Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser
 450 455 460

65
 gaa ggt tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca att tat 1860
 Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr
 465 470 475 480

gtt caa aga tag aagagcagag aggacggatt tccctgaagga aatccgtttt 1912
 Val Gln Arg

tttatcttt 1920

<210> 4

60 <211> 483

<212> PRT

<213> *Bacillus licheniformis*

65

ES 2 286 012 T3

<400> 4

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

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

10 Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
35 40 45

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

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

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

20 Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr
100 105 110

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

25 Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro
130 135 140

30 Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe
145 150 155 160

Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys
165 170 175

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

Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
195 200 205

40 Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln
210 215 220

45 Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
225 230 235 240

Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met
245 250 255

50 Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn
260 265 270

Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
275 280 285

55 His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
290 295 300

60 Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser
305 310 315 320

Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
325 330 335

65 Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
340 345 350

ES 2 286 012 T3

Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
 355 360 365
 5 Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile
 370 375 380
 Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His
 385 390 395 400
 10 Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
 405 410 415
 Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
 420 425 430
 15 Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr
 435 440 445
 Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser
 450 455 460
 20 Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr
 465 470 475 480
 Val Gln Arg

25 <210> 5
 <211> 2604
 <212> ADN
 30 <213> *Bacillus amyloliquefaciens*
 <220>
 <221> -10 señal
 35 <222> (707)..(712)
 <220>
 <221> -35 señal
 40 <222> (729)..(734)
 <220>
 <221> RBS
 45 <222> (759)..(762)
 <220>
 <221> sig_péptido
 50 <222> (770)..(862)
 <220>
 <221> mat_péptido
 55 <222> (863)..(2314)
 <220>
 <221> terminador
 60 <222> (2321)..(2376)
 <220>
 <221> CDS
 65 <222> (863)..(2314)

ES 2 286 012 T3

<400> 5

5 aagcttcaag cggcfaatcg gaatgtgeat cteqctteat acttaggttt tcaccccgcat 60
 10 attaaacgag cgtttttgaa ccgtgtgaca gaagctgttc gaaacccccg cgggocggtt 120
 15 gatcttaagg ggggacagta tgctgctctet tmcattaat etcagcggaa aaagaatcat 180
 20 cattgctggc gggggcaatg ttgcattaag aaggctgaaa egggtgttcc gaaagggcgt 240
 25 gatattaccg tgatcagttt gagcctgctt gaaattaaaa agctggcggg tgaaggacgc 300
 30 atccgctgga tcccccgag aattgaaatg aaagatctca agcccgcttt ttccattart 360
 35 gccgcgacaa atgaccgagg cgtgaatcag gagatagccg caaacgcttc tganacgcag 420
 40 ctggctcaact gtgtaagcaa ggcgtaacaa ggcagcgtat atatgcccga gatcaccgce 480
 45 aaagggcgca ttcaagtate agtatcaaca agcggggcaa gccccgcaca tacgaaaaga 540
 50 ctggctgaaa acattgagcc ttgatgact gatgatttgg ctgaagaagt ggatcgattg 600
 55 tttgagaaas gaagaagacc ataaaaatc cttgtctgtc atcagacagg gtatttttta 660
 60 tgctgtccag actgtccgct gtgtaaaaaa taggnataaa ggggggttgt tattathtta 720
 65 ctgatatgta aaatataatt tgtataagaa aatgagaggg agaggaacaa tgattcaaaa 780
 70 acgaaagcgg acagtttctg tcmgacttgt gcttatgtgc acgctgttat ttgtcagttt 840
 75 gccgattaca azaacatcag cc gta aat ggc acg ctg atg cag tac ttt gaa 892
 Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu
 1 5 10
 80 tgg tat acg ccg aac gac ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat 940
 Trp Tyr Thr Pro Asn Asp Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp
 15 20 25
 85 gcg gaa cat tta tog gat atc gga atc act gcc gtc tgg att cct ccc 988
 Ala Glu His Leu Ser Asp Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro
 30 35 40
 90 gca tac aaa gga ttc agc caa tcc gat aac gga tac gga cct tat gat 1036
 Ala Tyr Lys Gly Leu Ser Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp
 45 50 55
 95 ttg tat gat tta gga gaa ttc cag caa aaa ggg acg gtc aga ccg aaa 1084
 Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys
 60 65 70
 100 tac ggc aca aaa tca gag ctt caa gat gcg atc ggc tca ctg cat tcc 1132
 Tyr Gly Thr Lys Ser Glu Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser
 75 80 85 90
 105 cgg aac gtc caa gta tac gga gat gtg gtt ttg aat cat aag gct ggt 1180
 Arg Asn Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly
 95 100 105
 110 gct gat gca aca gaa gat gta act gcc gtc gaa gtc aat ccg gcc aat 1228
 Ala Asp Ala Thr Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn
 110 115 120
 125 aga aat cag gaa act tcg gag gaa tat caa atc aaa gcg tgg acg gat 1276
 Arg Asn Gln Glu Thr Ser Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp
 125 130 135
 130 ttt cgt ttt ccg ggc cgt gga aac ccg tac agt gat ttt aaa tgg cat 1324
 Phe Arg Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His
 140 145 150
 155 tgg tat cat ttc gac gga gcg gac tgg gat gaa tcc cgg aag atc agc 1372
 Trp Tyr His Phe Asp Gly Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser
 155 160 165 170

ES 2 286 012 T3

Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
 195 200 205
 5 Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Ser
 210 215 220
 Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
 225 230 235 240
 10 Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met
 245 250 255
 Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn Ala Gly Lys Leu Glu Asn
 260 265 270
 15 Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
 275 280 285
 His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
 290 295 300
 20 Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser Arg His Pro Glu Lys Ala
 305 310 315 320
 25 Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
 325 330 335
 Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
 340 345 350
 30 Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
 355 360 365
 35 Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp Asn Ile
 370 375 380
 Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro Gln His
 385 390 395 400
 40 Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
 405 410 415
 Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
 420 425 430
 45 Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys Asn Ala Gly Glu Thr
 435 440 445
 50 Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Lys Ile Gly Ser
 450 455 460
 Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp Gly Ser Val Ser Ile Tyr
 465 470 475 480
 55 Val Gln Lys

<210> 7
 60 <211> 1548
 <212> ADN
 <213> *Bacillus stearothermophilus*
 65 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1548)

ES 2 286 012 T3

<400> 7

5	gcc gca ccg ttt aac ggc acc atg atg cag tac ttt gaa tgg tac ttg 48 Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu 1 5 10 15
10	ccg gat gat ggc acg tta tgg acc aaa gtg gcc aat gaa gcc aac aac 96 Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn 20 25 30
15	tta tcc agc ctt ggc atc acc gct ctt tgg ctg ccg ccc gct tac aaa 144 Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys 35 40 45
20	gga aca agc cgc agc gac gta ggg tac gga gta tac gac ttg tat gac 192 Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp 50 55 60
25	ctc ggc gaa ttc aat caa aaa ggg acc gtc cgc aca aaa tac gga aca 240 Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr 65 70 75 80
30	aaa gct caa tat ctt aas gcc att caa gcc gcc caa gcc gct gga atg 288 Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met 85 90 95
35	caa gtg tac gcc gat gtc gtg ttc gac cat aaa ggc ggc gct gac ggc 336 Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly 100 105 110
40	acg gaa tgg gtg gac gcc gtc gaa gtc aat ccg tcc gac cgc aac caa 384 Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln 115 120 125
45	gaa atc tgg ggc acc tat caa atc caa gcc tgg acg aaa ttt gat ttt 432 Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe 130 135 140
50	ccc ggg cgg ggc aac acc tac tcc agc ttt aag tgg cgc tgg tac cat 480 Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His 145 150 155 160
55	ttt gac ggc gtt gat tgg gac gaa agc cga aaa ttg agc cgc att tac 528 Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr 165 170 175
60	aaa ttc cgc ggc atc ggc aaa gcg tgg gat tgg gaa gta gac acg gaa 576 Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu 180 185 190
65	aac ggc aac tat gac tac tta atg tat gcc gac ctt gat atg gat cat 624 Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His 195 200 205
70	ccc gaa gtc gtg acc gag ctg aaa aac tgg ggg aaa tgg tat gtc aac 672 Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn 210 215 220
75	aca acg aac att gat ggg ttc cgg ctt gat gcc gtc aag cat att aag 720 Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys 225 230 235 240
80	ttc agt ttc ttc cct gat tgg ttg tgg tat gtg cgt tct cag act ggc 768 Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly 245 250 255
85	aag ccg cta ttt acc gtc ggg gaa tat tgg agc tat gac atc aac aag 816 Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys

ES 2 286 012 T3

	260	265	270		
5	ttg cac aat tac att acg aaa aca gac gga acg atg tct ttg ttt gat Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp	275	280	285	854
10	gcc ccg tta cac aac aaa ttt tat acc get tcc aaa tca ggg ggc gca Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala	290	295	300	912
15	ttt gat atg cgc acg tta atg acc aat acc ctc atg aaa gat caa ccg Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro	305	310	315	960
20	aca ttg gcc gtc acc ttc gtt gat aat cat gac acc gaa ccc ggc caa Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln	325	330	335	1008
25	ggc ctg cag tca tgg gtc gac cca tgg ttc aaa ccg ttg get tac gcc Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala	340	345	350	1056
30	ttt att cta act cgg cag gaa gga tac cgg tgc gtc ttt tat ggt gac Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp	355	360	365	1104
35	tat tat ggc att cca caa tat aac att cct tgg ctg aaa agc aaa atc Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile	370	375	380	1152
40	gat ccg ctc ctc atc gcg cgc agg gat tat gct tac gga acg caa cat Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His	385	390	395	1200
45	gat tet ctt gat cac tcc gac atc atc ggg tgg aca agg gaa ggg ggc Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Gly	405	410	415	1248
50	act gaa aaa cca gga tcc gga ctg gcc gca ctg atc acc gat ggg ccg Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro	420	425	430	1296
55	gga gga agc aaa tgg atg tac gtt ggc aaa caa cac get gga aaa gtc Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val	435	440	445	1344
60	ttc tat gac ctt acc ggc aac cgg agt gac acc gtc acc atc aac agt Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser	450	455	460	1392
65	gat gga tgg ggg gaa ttc aaa gtc aat ggc ggt tgg gtt tgg gtt tgg Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp	465	470	475	1440
70	ggt cct aga aaa acg acc gtt tct acc atc gct cgg ccg atc aca acc Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr	485	490	495	1488
75	cga ccg tgg act ggt gaa ttc gtc cgt tgg acc gaa cca cgg ttg gtc Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val	500	505	510	1536
80	gca tgg cct tga Ala Trp Pro	515			1548

<210> 8

<211> 515

65 <212> PRT

<213> *Bacillus stearothermophilus*

ES 2 286 012 T3

<400> 8

5 Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu
1 5 10

Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn
20 25 30

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

Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp
50 55 60

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

20 Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met
85 90 95

Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly
100 105 110

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

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

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

Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr
165 170 175

35 Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu
180 185 190

40 Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His
195 200 205

Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn
210 215 220

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

Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly
245 250 255

50 Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys
260 265 270

Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp
275 280 285

55 Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala
290 295 300

60 Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro
305 310 315 320

Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln

65

ES 2 286 012 T3

	<400> 10	
	ggtcgtaggc accgtagccc caatcccatt ggctcg	36
5	<210> 11	
	<211> 28	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<400> 11	
	ctgtgactgg tgagtactca accaagtc	28
20	<210> 12	
	<211> 31	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
30	<400> 12	
	ggtcgtaggc accgtagccc tcattccgctt g	31
35	<210> 13	
	<211> 31	
	<212> ADN	
40	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
45	<400> 13	
	ggtcgtaggc accgtagccc atatccgctt g	31
50	<210> 14	
	<211> 31	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
60	<400> 14	
	ggtcgtaggc accgtagcca atatccgctt g	31
65	<210> 15	
	<211> 36	

ES 2 286 012 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 15	
10	gcagcatgga actgctiatg aagaggcacg tcaaac	36
	<210> 16	
15	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 16	
25	catagttgcc gaattcattg gaaactccc	30
	<210> 17	
30	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 17	
40	catagttgcc gaattcaggg gaaactccc aatc	34
	<210> 18	
45	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 18	
55	ccgcgccccg ggaaatcaaa tttgtccag gctttaatta g	41
	<210> 19	
60	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	

ES 2 286 012 T3

	<400> 19	
	caaaatggta ccaataccac ttaaatecgc Tg	32
5	<210> 20	
	<211> 29	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<400> 20	
	cttccaatc ccaagtcttc ccttgaaac	29
20	<210> 21	
	<211> 36	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
30	<400> 21	
	cttaatttct gctacgacgt caggatggtc ataac	36
35	<210> 22	
	<211> 38	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
45	<400> 22	
	cgccaagtc attegaccag tactcagcta ccgtaaac	38
50	<210> 23	
	<211> 29	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
60	<400> 23	
	gccgtttca ttgtcgactt cccaatccc	29
65	<210> 24	
	<211> 35	

ES 2 286 012 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 24	
10	ggaattcgc gctgactagt cccgtacata tcccc	35
	<210> 25	
15	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 25	
25	ggcaggaatt tcgacacctt tcgtcccgta catatc	36
	<210> 26	
30	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 26	
40	cctcattctg cagcagcagc cgtaaatggc acgctg	36
	<210> 27	
45	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 27	
55	tatccgataa de la gtaataccga de la ccagacggca atgttccg	38
	<210> 28	
60	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	

ES 2 286 012 T3

	<400> 28	
	cggatcgg tattactgcc gtctggatc	30
5	<210> 29	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
15	<400> 29	
	ctcgtcccaa tcggttcgt c	21
20	<210> 30	
	<211> 26	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
30	<400> 30	
	gatgatgcc gactcgatt atgacc	26
35	<210> 31	
	<211> 30	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
45	<400> 31	
	catagtgcc gaattcattg gaaactccc	30
50	<210> 32	
	<211> 24	
	<212> ADN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
60	<400> 32	
	ccgattgctg acgctgttat ttgc	24
65	<210> 33	
	<211> 25	

ES 2 286 012 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 33	
10	gccaagcgga taacggctac ggtgc	25
	<210> 34	
15	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 34	
25	gaacgagcca atcggacgtg ggctacgg	28
	<210> 35	
30	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 35	
40	ggaacgagcc aatcggataa cggctacggt gc	32
	<210> 36	
45	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	
	<400> 36	
55	gcatataagg gactgagcca agcgg	25
	<210> 37	
60	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador	

ES 2 286 012 T3

<400> 37
caaccacaaa gccggcgctg atgcg 25

5
<210> 38
<211> 41
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

15
<400> 38
gcatataagg gactgagcca atcggataac ggctacggtg c 41

20
<210> 39
<211> 28
<212> ADN
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

30
<400> 39
gaacgagccg atcggacgtg ggctacgg 28

35
<210> 40
<211> 28
<212> ADN
40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

45
<400> 40
gaacgagcca aaacgacgtg ggctacgg 28

50

55

60

65