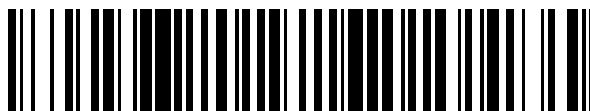


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 029**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/28** (2006.01)

**C11D 3/386** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.1999 E 06110159 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 1676913**

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

30 Prioridad:

**16.11.1998 DK 149598**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**13.11.2015**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)  
KROGSHOEJVEJ 36  
2880 BAGSVAERD, DK**

72 Inventor/es:

**SVENDSEN, ALLAN;  
KJÆRULFF, SØREN;  
BISGÅRD-FRANTZEN, HENRIK y  
ANDERSEN, CARSTEN**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 551 029 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 INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a variantes nuevas de  $\alpha$ -amilasas madres de tipo Termamyl con propiedades alteradas relativas de la alfa-amilasa madre. Dichas propiedades incluyen mayor estabilidad, p. ej., a pH ácido, p. ej., a concentraciones de calcio bajas y/o a altas temperaturas. Tales variantes son adecuadas para varias aplicaciones, en particular, para el tratamiento del almidón industrial (p. ej., licuefacción de almidón o sacarificación).

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Las  $\alpha$ -amilasas ( $\alpha$ -1,4-g1ucan-4-g1ucanohidrolasas, EC 3.2.1.1) constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del almidón y otros oligo-y polisacáridos 1,4-g1ucosídicos lineales y ramificados.

[0003] Hay un cuerpo muy extenso de patentes y bibliografía científica acerca de esta clase tan importante industrialmente de enzimas. Varias  $\alpha$ -amilasas tales como las variantes de  $\alpha$ -amilasas del tipo Termamyl son conocidas a partir de, p. ej., WO 90/11352, WO 95/10603, WO 95/26397, WO 96/23873 y WO 96/23874.

[0004] WO 96/23874 proporciona los datos estructurales por un cristal de rayos X tridimensional para una  $\alpha$ -amilasa del tipo Termamyl que consiste en los 300 residuos de aminoácidos N-terminales de la  $\alpha$ -amilasa de *B. amylicuefaciens* y los aminoácidos 301-483 del extremo C-terminal de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que comprende la secuencia de aminoácidos (esta última estando disponible comercialmente bajo el nombre comercial Termamyl<sup>TM</sup>), y que está por 10 tanto bastante relacionada con las  $\alpha$ -amilasas de *Bacillus* industrialmente importantes (las cuales en el presente contexto están comprendidas dentro del significado de los términos " $\alpha$ -amilasas del tipo Termamyl", y las cuales incluyen, entre otras, las  $\alpha$ -amilasas de *B. licheniformis*, *B. amylicuefaciens* y *B. stearothermophilus*). WO 96/23874 además describe la metodología para diseñar, en base a un análisis de la estructura de una  $\alpha$ -amilasa del tipo Termamyl, variantes de la  $\alpha$ -amilasa del tipo Termamyl las cuales muestran propiedades alteradas relativas a la madre. WO96/23873 y WO97/41213 divulgan variantes de  $\alpha$ -amilasas del tipo Termamyl que tienen propiedades mejoradas seleccionadas, por ejemplo, de estabilidad temporal, de estabilidad de oxidación, de dependencia reducida de Ca<sup>+</sup>. WO98/26078 divulga variantes de  $\alpha$ -amilasas *Bacillus amylicuefaciens* con una sustitución en una posición correspondiente a la posición 201.

## 35 BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

[0005] La presente invención se refiere a variantes de una  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl, donde:

- (a) la variante comprende una o más de las siguientes sustituciones: E376K; S417T; A420Q o R; S356A; o Y358F y además K176R+I201F+ H205N utilizando la numeración en SEC ID n°: 4, donde la alfa-amilasa tipo Termamyl madre tiene un grado de identidad para SEC ID n°: 4 de al menos 80%, y
- (b) la variante tiene actividad de alfa-amilasa y además las variantes tienen y una estabilidad aumentada a pH por debajo de 7,0, y/o a concentraciones de calcio por debajo de 1mM a en el rango de temperaturas de 95°C a 160°C relativamente a la alfa-amilasa tipo Termamyl madre. Las variantes son ventajosas en relación con, por ejemplo, el procesamiento industrial de almidón (licuefacción de almidón, sacarificación y similares) como se describe en la patente de EEUU n° 3,912,590 y publicaciones de patentes europeas N°. 252,730 y 63,909.

## 50 Conversión del almidón

[0006] Un proceso "tradicional" de conversión del almidón que degrada el almidón a componentes de carbohidratos de peso molecular mas bajo tales como azúcares o sustitutos de grasa incluye una fase desramificante.

## 55 Conversión de "almidón en azúcar"

[0007] En el caso de convertir el almidón en un azúcar el almidón es despolimerizado. Este proceso de despolimerización consiste en una fase de pretratamiento y dos o tres fases del proceso consecutivas, es decir, un proceso de licuefacción, un proceso de sacarificación y dependiendo del producto final deseado opcionalmente un proceso de isomerización.

60 Pretratamiento del almidón natural

[0008] El almidón natural consiste en gránulos microscópicos que son insolubles en agua a la temperatura ambiente. Cuando se calienta una pasta de almidón acuosa, los gránulos se hinchan y finalmente estallan, dispersando las moléculas de almidón en la solución. Durante este proceso de "gelatinización" hay un aumento espectacular de la viscosidad. Como el nivel de solidos es del 30-40% en un proceso normalmente industrial, el almidón tiene que ser diluido o "licuado" de modo que pueda ser manipulado. Esta reducción de la viscosidad es hoy principalmente obtenida

por degradación enzimática.

#### Licuefacción

5 [0009] Durante la fase de licuefacción, el almidón de cadena larga es degradado en unidades más cortas ramificadas y lineales (maltodextrinas) por una  $\alpha$ -amilasa (p. ej., Termamy<sup>TM</sup> SEC ID N°: 4 de la presente). El proceso de licuefacción se realiza a 105-110°C durante 5 a 10 minutos seguido de 1-2 horas a 95°C. El pH se encuentra entre 5.5 y 6.2. Para asegurar una estabilidad enzimática óptima bajo estas condiciones, se añade 1 mM de calcio (40 ppm de iones calcio libres). Después de este tratamiento, el almidón licuado tendrá un "equivalente de dextrosa" (DE) de 10-15.

10

#### Sacarificación

15 [0010] Después del proceso de licuefacción, las maltodextrinas son convertidas en dextrosa por adición de una glucoamilasa (p. ej., AMG<sup>TM</sup>) y una enzima desramificante, tal como una isoamilasa (patente estadounidense 4.335.208) o una pululanasa (p. ej., Promozyme<sup>TM</sup>) (patente estadounidense 4.560.651). Antes de esta fase el pH es reducido a un valor por debajo de 4.5, manteniendo la temperatura alta (por encima de 95°C) para inactivar la  $\alpha$ -amilasa licuefactante para reducir la formación de oligosacáridos cortos llamados "precursores de panosa" los cuales no pueden ser hidrolizados adecuadamente por la enzima desramificante.

20 [0011] La temperatura es reducida por debajo de 60°C, y la glucoamilasa y la enzima desramificante son agregadas. El proceso de sacarificación se efectúa durante 24-72 horas.

25 [0012] Normalmente, cuando se desnaturaliza la  $\alpha$ -amilasa después de la fase de licuefacción aproximadamente el 0.2-0.5% del producto de la sacarificación es el trisacárido ramificado 6<sup>2</sup>- $\alpha$ -glucosil maltosa (panosa) el cual no puede ser degradado por una pululanasa. Si la amilasa activa de la fase de licuefacción está presente durante la sacarificación (es decir, sin desnaturalización), este nivel puede ser tan elevado como 1-2%, que es muy indeseable puesto que reduce el rendimiento de la sacarificación significativamente.

#### Isomerización

30 [0013] Cuando el producto de azúcar final deseado es p. ej. jarabe con alto contenido en fructosa, el jarabe de dextrosa puede ser convertido en fructosa.

35 [0014] Después del proceso de sacarificación el pH es aumentado hasta un valor en la gama de 6-8, preferiblemente pH 7.5, Y el calcio es eliminado por intercambio iónico. El jarabe de dextrosa es luego convertido en jarabe con alto contenido en fructosa, p. ej., una glucosaisomerasa inmovilizada (tal como Sweetzyme<sup>TM</sup>)

40 [0015] En el contexto de la invención el termino "pH ácido" significa un pH inferior a 7.0, especialmente por debajo de la gama de pH en la que los procesos de licuefacción del almidón industriales son generalmente realizados, según el modo descrito anteriormente, el cual está entre pH 5.5 y 6.2.

45 [0016] En el contexto de la presente el término "baja concentración de calcio" se refiere a concentraciones por debajo del nivel normal usado en los procesos de licuefacción del almidón industriales tradicionales, como entre 0-40 ppm, preferiblemente entre 10-30<sup>2</sup> ppm, como entre 15-25 ppm de Calcio. Las concentraciones normales varían dependiendo de la concentración de Ca<sup>2+</sup> libre en el maíz. Normalmente se<sup>2</sup> añade una dosificación correspondiente a 1 mM (40 ppm) que junto con el nivel de maíz da entre 40 y 60 ppm de Ca<sup>2+</sup> libre.

50 [0017] En el contexto de la invención el término "temperatura elevada" se refiere a temperaturas entre 95 y 160°C, especialmente a la gama de temperatura en la que los procesos de licuefacción del almidón industriales son normalmente realizados, es decir entre 95 y 105°C.

55 [0018] La invención también se refiere a constructos de ADN que codifican variantes de la invención, a métodos para preparar las variantes de la invención, y al uso de las variantes de la invención, solas o en combinación con otras enzimas  $\alpha$ -amilolíticas, en varios procesos industriales, en particular para la licuefacción del almidón.

#### Nomenclatura

60 [0019] En la presente descripción y reivindicaciones, se usan los códigos una sola letra y de tres letras convencionales para residuos de aminoácidos. Para una referencia más fácil, las variantes de  $\alpha$ -amilasa de la invención se describen usando la nomenclatura siguiente:

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

65 [0020] Según esta nomenclatura, por ejemplo la sustitución de alanina por asparraguina en la posición 30 se indica como:

Ala30Asn o A30N

una supresión de alanina en la misma posición se indica como:

Ala30\* o A30\*

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

Ala30AlaLys o A30AK

[0021] Una supresión de una extensión consecutiva de residuos de aminoácidos, como los residuos de los aminoácidos 30-33, se indica como (30-33)\* o Δ (A30-N33).

[0022] Cuando una α-amilasa específica contiene una "supresión" en comparación con otras α-amilasas y se hace una inserción en esta posición esto se indica como:

\*36Asp o \*36D

para la inserción de un ácido aspártico en la posición 36.

Las mutaciones múltiples son separadas por el signo mas, es decir:

[0023] 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. Una mutación múltiple puede también ser separada como sigue, es decir, significando lo mismo que el signo mas:

Ala30Asp/Glu34Ser o A30N/E34S

[0024] Cuando uno o mas residuos de aminoácidos alternativos pueden ser insertados en una posición dada, se indica como A30N,E o A30N oA30E

[0025] Además, cuando una posición adecuada para la modificación es identificada en la presente sin que se sugiera una modificación específica, debe entenderse que cualquier residuo de aminoácido puede ser sustituido por el residuo de aminoácido presente en la posición. Así, por ejemplo, cuando una modificación de una alanina en la posición 30 se menciona, pero no se especifica, debe entenderse que la alanina puede ser suprimida o sustituida por cualquier otro aminoácido, es decir, cualquiera de:

R,N,D,A,C,Q,E,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

[0026] Figura 1 es un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de seis α-amilasas madres del tipo Termamyl en el contexto de la invención. Los números en el Extremo izquierdo designan las secuencias de aminoácidos respectivas como sigue:

- 1: SEC ID N°: 2,
- 2: Amilasa
- 3: SEC ID N°: 1,
- 4: SEC ID N°: 5,
- 5: SEC ID N°: 4,
- 6: SEC ID N°: 3.

Figura 2 muestra la estrategia de la PCR usada en el ejemplo 1.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

##### La α-amilasa del tipo Termamyl

[0027] Es bien sabido que varias α-amilasas producidas por *Bacillus* spp. son muy homólogas en el nivel aminoácido. Por ejemplo, la α-amilasa de *B. licheniformis* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 4 (comercialmente disponible como Termamyl™) se ha encontrado que tiene sobre el 89% de homología con la α-amilasa de *B. amylicuefaciens* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 5 y sobre el 79% de homología con la α-amilasa de *B. stearothermophilus* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 3. Además las α-amilasas homólogas incluyen una α-amilasa derivada de una cepa del *Bacillus* sp. NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 o DSM 9375, todas estando descritas con detalle en WO 95/26397, y la α-amilasa descrita por Tsukamoto *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 151 (1988), págs. 25-31.

[0028] Otras α-amilasas homólogas adicionales incluyen la α-amilasa producida por la cepa de *B. licheniformis* descrita en EP 0252666 (ATCC 27811), Y las α-amilasas identificadas en WO 91/00353 y WO 94/18314. Otras α-amilasas de *B. licheniformis* del tipo Termamyl comerciales son Optitherm™ y Takatherm™ (disponibles por Solvay),

MaxamyJT<sup>M</sup> (disponible por Gist-brocades/Genencor), Spezym AATM YSpezyme Delta AATM (disponible por Genencor), y Keistase<sup>TM</sup> (disponible por Daiwa).

5 [0029] Dada la homología sustancial encontrada entre estas  $\alpha$ -amilasas, se considera que pertenecen a la misma clase que las  $\alpha$ -amilasas, es decir a la clase de " $\alpha$ -amilasas del tipo Termamyl".

10 [0030] En consecuencia, en este contexto, el término " $\alpha$ -amilasa del tipo Termamyl" se destina a indicar una  $\alpha$ -amilasa que, a nivel del aminoácido, muestra una homología sustancial al Termamyl<sup>TM</sup>, es decir, la  $\alpha$ -amilasa de *B. lichenijormis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 4 de la presente. En otras palabras, una  $\alpha$ -amilasa del tipo Termamyl es una  $\alpha$ -amilasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEC ID Nos: 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 u 8 de la presente, y la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID N°: 1 de WO 95/26397 (la misma que la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N°: 7 en la presente) o en la SEC ID N°: 2 de WO 95/26397 (la misma que en la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N°: 8 en la presente) o en Tsukamoto *et al.*, 1988, (cuya secuencia de aminoácidos está mostrada en la SEC ID N°: 6 en la presente) o i) que muestra al menos el 80%, especialmente al menos el 85%, especialmente preferido al menos el 90%, especialmente al menos el 95%, incluso especialmente más preferido al menos el 97%, especialmente al menos el 99% de homología con al menos una de dichas secuencias de aminoácidos mostradas en SEC ID N° 1: o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 o 8 y/o ii) muestra reacción cruzada inmunológica con un anticuerpo mejorado contra una o más de dichas  $\alpha$ -amilasas, y/o iii) que está codificada por una secuencia de ADN que se hibridiza, bajo condiciones de baja a muy alta astringencia (dichas condiciones descritas abajo) hasta las secuencias de ADN que codifican las  $\alpha$ -amilasas especificadas anteriormente que son aparentes de las SEC ID N°: 9, 10, 11, 12, y 32, respectivamente, de la presente solicitud (que codifica las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID N°: 1; 2; 3; 4, y 5 en la presente, respectivamente), de la SEC ID N°: 4 de WO 95/26397 (cuya secuencia de ADN, con el codón de detención TAA, está mostrada en la SEC ID N°: 13 de la presente y codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 8 de la presente) y de la SEC ID N°: 5 de WO 95/26397 (mostrada en la SEC ID N°: 14 de la presente), respectivamente.

30 [0031] En relación con la propiedad i), la "homología" (identidad) puede ser determinada usando cualquier algoritmo convencional, preferiblemente usando el programa gap del paquete GCG versión 8 (Agosto 1994) que utiliza valores por defecto para las penalizaciones de los huecos, es decir, una penalización por creación de huecos de 3.0 y penalización por extensión de los huecos de 0.1 (Genetic Computer Group (1991) Programme Manual for the GCG Package, version 8, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EEUU 53711).

35 [0032] La estructura de  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl madre puede tener en una forma de realización una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad para SEC ID n°: 4 de al menos 65%, preferiblemente al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, de forma más preferible al menos 80%, de forma más preferible al menos 85%, incluso de forma más preferible al menos aproximadamente 90%, incluso de forma más preferible al menos 95%, incluso de forma más preferible al menos 97%, e incluso de forma más preferible al menos 99% de identidad determinada como se ha descrito anteriormente.

40 [0033] Un alineamiento estructural entre Termamyl® (SEC ID N°: 4) y una  $\alpha$ -amilasa del tipo Termamyl puede ser usado para identificar posiciones equivalentes/correspondientes en otras  $\alpha$ -amilasas del tipo Termamyl. Un método para obtener dicho alineamiento estructural es usando el programa Pile Up del paquete GCG usando valores por defecto de penalizaciones por huecos, es decir, una penalización por creación de huecos de 3.0 y una penalización por extensión de los huecos de 0.1. Otros métodos de alineamiento estructural incluyen el análisis del cluster hidrofóbico (Gaboriaud *et al.*, (1987), FEBS LETTERS 224, págs. 149-155) y enhebrado inverso (Huber, T; Torda, AE, PROTEIN SCIENCE Vol. 7, No. 1 págs. 142-149 (1998).

50 [0034] Por ejemplo, las posiciones correspondientes, de residuos diana encontrados en el C-dominio de la  $\alpha$ -amilasa de *B. lichenijormis*, en las secuencias de aminoácidos de varias  $\alpha$ -amilasas del tipo Termamyl que han sido ya mencionadas son las siguientes:

$\alpha$ -amilasa del tipo Termamyl					
<i>B. lich.</i> (SEC ID n°: 4)	S356	Y358	E376	S417	A420
<i>B. amylo.</i> (SEC ID n°: 5)	S356	Y358	E376	S417	A420
<i>B. stearo.</i> (SEC ID n°: 3)	----	Y361	----	----	----
<i>Bac.</i> WO 95/26397 (SEC ID n°: 2)	----	Y363	----	S419	----
<i>Bac.</i> WO 95/26397 (SEC ID n°: 1)	----	Y363	----	----	----

55 [0035] Como se describirá adicionalmente más adelante, las mutaciones de estos residuos de aminoácidos conservados están muy relacionadas con el aumento de la estabilidad a pH ácido y/o a una concentración de calcio baja a altas temperaturas.

[0036] Propiedad ii) (ver arriba) de la  $\alpha$ -amilasa, es decir, la reactividad cruzada inmunológica, puede ser evaluada usando un anticuerpo preparado contra, o reactivo con, al menos un epítipo de la  $\alpha$ -amilasa del tipo Termamyl relevante. El anticuerpo, que puede bien ser monoclonal o policlonal, puede ser producido por métodos conocidos en la

técnica, p. ej., como se describe por Hudson *et al.*, Practical Immunology, Third edition (1989), Blackwell Scientific Publications. La reacción cruzada inmunológica puede ser determinada usando ensayos conocidos en la técnica, ejemplos de ellos son el de Western Blotting o el ensayo de inmunodifusión radial, p. ej., como se describe por Hudson *et al.*, 1989. En este aspecto, se ha encontrado la reacción cruzada inmunológica entre las  $\alpha$ -amilasas que tienen las secuencias de aminoácidos SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 respectivamente.

[0037] La sonda de oligonucleótidos usada en la caracterización de la  $\alpha$ -amilasa del tipo Termamyl conforme a la propiedad iii) arriba puede de manera adecuada ser preparada basándose en la secuencia completa o parcial de nucleótidos o de aminoácidos de la  $\alpha$ -amilasa en cuestión.

[0038] Condiciones adecuadas para evaluar la hibridación implican el pre remojo en 5xSSC y la prehibridación durante 1 hora a  $\sim 40^{\circ}\text{C}$  en una solución del 20% de formamida, solución de 5xDenhardt, 50 mM de fosfato sódico, pH 6.8, y 50 mg de ADN de timo de ternero ultrasónico desnaturalizado, seguido de la hibridación en la misma solución suplementada con 100 mM de ATP durante 18 horas a  $\sim 40^{\circ}\text{C}$ , seguido de tres lavados del filtro en 2xSSC, 0.2% de SDS a  $40^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos (astringencia baja), preferido a  $50^{\circ}\text{C}$  (astringencia media), mas preferiblemente a 6SOC (astringencia alta), incluso mas preferiblemente a  $\sim 75^{\circ}\text{C}$  (astringencia muy alta). Mas detalles sobre el método de hibridación pueden ser encontrados en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2<sup>a</sup> Ed., Cold Spring Harbor, 1989.

[0039] En este contexto, "derivado de" está destinado no sólo a indicar una  $\alpha$ -amilasa producida o producible por una cepa del organismo en cuestión, sino también una  $\alpha$ -amilasa codificada por una secuencia de ADN aislada de esta cepa y producida en un organismo huésped transformado con dicha secuencia de ADN. Finalmente, el término se destina a indicar una  $\alpha$ -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  $\alpha$ -amilasa en cuestión. El término está también destinado a indicar que la  $\alpha$ -amilasa madre puede ser una variante de una  $\alpha$ -amilasa de origen natural, es decir, una variante que es el resultado de una modificación (inserción, sustitución, supresión) de uno o mas residuos de aminoácidos de la  $\alpha$ -amilasa de origen natural.

#### $\alpha$ -amilasas híbridas madres

[0040] La  $\alpha$ -amilasa madre (la basal) puede ser una  $\alpha$ -amilasa híbrida, es decir, una  $\alpha$ -amilasa que comprende una combinación de secuencias de aminoácidos parciales derivada de al menos dos  $\alpha$ -amilasas.

[0041] La  $\alpha$ -amilasa híbrida madre puede ser una que, tomando como base la homología de aminoácido y/o reactividad cruzada inmunológica y/o hibridación de ADN (tal y como se define anteriormente), se puede determinar que pertenece a la familia de  $\alpha$ -amilasas de tipo Termamyl. En este caso, la  $\alpha$ -amilasa híbrida está normalmente compuesta de al menos una parte de una  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl y parte(s) de unas o más otras  $\alpha$ -amilasas seleccionadas de  $\alpha$ -amilasas de tipo Termamyl o  $\alpha$ -amilasas de tipo no-Termamyl de origen microbiano (bacteriano o fúngico) y/o mamífero.

[0042] Así, la  $\alpha$ -amilasa híbrida madre puede comprender una combinación de secuencias de aminoácidos parciales que derivan de al menos dos  $\alpha$ -amilasas de tipo Termamyl, o de al menos un de tipo Termamyl y al menos una  $\alpha$ -amilasa bacteriana de tipo no-Termamyl, o de al menos una de tipo Termamyl y al menos una  $\alpha$ -amilasa fúngica. La  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl de la que deriva una secuencia de aminoácidos parcial puede, por ejemplo, ser cualquiera de las  $\alpha$ -amilasas específicas de tipo Termamyl a las que se hace referencia en este documento.

[0043] Por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa madre puede comprender una parte C-terminal de una  $\alpha$ -amilasa derivada de una cepa de *B. licheniformis*, y una parte N-terminal de una  $\alpha$ -amilasa derivada de una cepa de *B. amylolicuefaciens* o de una cepa de *B. stearothermophilus*. Por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa madre puede comprender al menos 430 residuos de aminoácidos de la parte C-terminal de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*. Una tal  $\alpha$ -amilasa híbrida de tipo Termamyl puede ser idéntica a la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en SEC ID n°: 4, excepto en que los residuos de aminoácidos (de la proteína madura) del N-terminal 35 se sustituyen por residuos de aminoácidos de la proteína madura de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus amylolicuefaciens* (BAN) el N-terminal 33 mostrados en SEC ID n°: 5. Dicho híbrido también puede consistir en un segmento de aminoácido que corresponde con los residuos de aminoácidos del N-terminal 68 de la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n°: 3 y un segmento de aminoácidos que corresponde con los residuos de aminoácidos del C-terminal 415 de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n°: 4.

[0044] La  $\alpha$ -amilasa de tipo no Termamyl puede, por ejemplo, ser una  $\alpha$ -amilasa fúngica, una  $\alpha$ -amilasa de mamífero o de planta o una  $\alpha$ -amilasa bacteriana (diferente de una  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl). Ejemplos específicos de tales  $\alpha$ -amilasas incluyen el la  $\alpha$ -amilasa *Aspergillus oryzae* TAKA, la  $\alpha$ -amilasa de *A. niger*, la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus subtilis*, la  $\alpha$ -amilasa pancreática porcina y una  $\alpha$ -amilasa de cebada. Todas estas  $\alpha$ -amilasas tienen estructuras distintivas que son marcadamente diferentes de la estructura de una  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl típica como las que se menciona en este documento.

[0045] Las  $\alpha$ -amilasas fúngicas mencionadas anteriormente, es decir, las derivadas de *A. niger* y *A. oryzae*, son

altamente homólogas a nivel aminoácido y generalmente se considera que pertenecen a la misma familia de  $\alpha$ -amilasas. La  $\alpha$ -amilasa fúngica derivada de *Aspergillus oryzae* está comercialmente disponible bajo el nombre comercial de Fungamyl™.

5 [0046] Además, cuando se hace referencia, de manera convencional, a una variante particular de una  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl (variante de la invención), por referencia a la modificación (por ejemplo, eliminación o sustitución) de residuos de aminoácidos específicos en la secuencia de aminoácidos de una  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl específica, debe entenderse que las variantes de otra  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl modificada en la(s) posición(es) equivalente(s) (determinadas a partir del mejor alineamiento de secuencia de aminoácidos posible entre las secuencias de aminoácidos respectivas) también están incluidas.

10 [0047] Una forma de realización preferida de una variante de la invención es un derivado de una  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* (como  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl madre), por ejemplo, una de las que se ha mencionado previamente, tales como la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n°: 4.

15 Propiedades alteradas de las variantes de la invención

[0048] A continuación se discute la relación entre alteraciones/mutaciones que pueden estar presentes en las variantes de la invención, y las alteraciones deseables en las propiedades (respecto a las de una  $\alpha$ -amilasa del tipo Termamyl madre) que pueden resultar de éstas.

20 Estabilidad aumentada a pH ácido y/o a una concentración de calcio baja a altas temperaturas

[0049] La presente divulgación se refiere a una variante de una  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl madre, dicha  $\alpha$ -amilasa variante ha sido alterada en comparación con la  $\alpha$ -amilasa madre en uno o más residuos de aminoácidos expuestos a solvente en la superficie de la  $\alpha$ -amilasa para aumentar la hidrofobicidad de la  $\alpha$ -amilasa y/o para aumentar los números totales de grupos de metilo en las cadenas laterales de dichos residuos de aminoácidos expuestos a solvente en la superficie.

25 [0050] En una forma de realización preferida, uno o varios residuos de aminoácidos expuestos a solvente en una superficie cóncava con depresión hacia adentro se alteran para obtener residuos de aminoácidos más hidrofóbicos.

[0051] En otra forma de realización preferida, uno o varios residuos de aminoácidos expuestos a solvente en una superficie convexa se alteran para aumentar el número de grupos de metilo de la cadena lateral.

30 [0052] La presente invención se refiere a una variante de  $\alpha$ -amilasa de una  $\alpha$ -amilasa híbrida madre, que comprende una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo de:

E376, S417, A420, S356, Y358;

35 Donde(a) la(s) alteración(s) son independientemente

- (i) una inserción de un aminoácido por debajo del aminoácido que ocupa la posición,  
 (ii) una eliminación del aminoácido que ocupa la posición, o  
 (iii) una sustitución del aminoácido que ocupa la posición con un aminoácido diferente,

(b) la variante tiene actividad de  $\alpha$ -amilasa y (c) cada posición corresponde a una posición de la secuencia de aminoácidos de la  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl madre con la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 4.

40 [0053] En una forma de realización, la alteración es una de las sustituciones siguientes:

E376A, R, D, C, Q, G, H, I, K, L, M, N, F, P, S, T, W, Y, V.

En una forma de realización preferida, la sustitución es: E376K.

55 [0054] En una forma de realización, la alteración es una de las sustituciones siguientes: S417A, R, D, C, E, Q, G, H, I, K, L, M, N, F, P, T, W, Y, V; En una forma de realización preferida la sustitución es S417T.

60 [0055] En una forma de realización la alteración es una de las sustituciones siguientes: A420R, D, C, E, Q, G, H, I, K, L, M, N, F, P, S, T, W, Y, V; En una forma de realización preferida la sustitución es: A420Q, R.

65 [0056] En una forma de realización la alteración es una de las sustituciones siguientes: S356A, R, D, C, E, Q, G, H, I, K, L, M, N, F, P, T, W, Y, V.

[0057] En una forma de realización, la alteración es una de las sustituciones siguientes Y358A,R,D,C,E,Q,G,H,I,K,L,M,N, F,P,S,T,W,V.

En una forma de realización preferida la sustitución es Y358F.

5 [0058] En una forma de realización de la invención una variante comprende una o más de las sustituciones siguientes: E376K, S417T, A420Q,R, S356A, Y358F.

10 [0059] El aumento de estabilidad a pH ácido y/o a una concentración de calcio baja a altas temperaturas puede ser determinado usando el método descrito abajo en el ejemplo 2 que ilustra la invención. La  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl madre usada como base para preparar variantes de la invención puede ser cualquier  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl tal y como se ha definido anteriormente.

15 [0060] Se contemplan específicamente  $\alpha$ -amilasas madres de tipo Termamyl seleccionadas del grupo derivado de *B. licheniformis*, tal como la cepa ATCC 27811 de *B. Licheniformis*, *B. amylolicuefaciens*, *B. stearothermophilus*, especie Bacillus NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 o DSM 9375, y las  $\alpha$ -amilasas de tipo Termamyl madre representadas en la SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

20 [0061] En una forma de realización de la divulgación, la  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl madre es una  $\alpha$ -amilasa híbrida que es idéntica a la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en SEC ID n°: 4 (Termamyl), excepto en que los residuos de aminoácidos (de la proteína madura) del N-terminal 35 se sustituyen con residuos de aminoácidos de la proteína madura del N-terminal 33 de la  $\alpha$ -amilasa del *Bacillus amyloliquefaciens* (BAN) mostrado en SEC ID n°: 5. La  $\alpha$ -amilasa híbrida de tipo Termamyl madre puede ser la  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl de híbrido anteriormente mencionado que además tiene las siguientes mutaciones: H156Y+181T+190F+209V+264S (utilizando la numeración de la SEC ID n°: 4). A dicha estructura se la denomina más adelante como "LE174".

25 [0062] La  $\alpha$ -amilasa madre puede ventajosamente también tener una mutación en una o más de las posiciones siguientes: K176, I201 y H205 (usando la numeración de la SEC ID N°: 4), especialmente una o más de las sustituciones siguientes: K176R, I201F, y H205N (usando la numeración de la SEC ID N°: 4), así como específicamente las sustituciones siguientes: K176R+I201F+H205N (usando la numeración de la SEC ID N°: 4).

30 [0063] Los inventores han descubierto que las variantes anteriormente mencionadas tienen estabilidad aumentada a pH inferiores a 7,0 (es decir, pH ácido) y/o a una concentración de calcio inferior a 1 mM (40 ppm) (es decir, concentraciones de calcio bajas) a temperaturas entre 95 y 160°C (es decir, temperaturas altas) con respecto a la  $\alpha$ -amilasa madre del tipo Termamyl.

35 [0064] Las alteraciones (p. ej., por sustitución) de uno o más residuos de aminoácidos expuestos a solventes que 1) aumentan la hidrofobicidad global de la enzima, o 2) aumentan el número de grupos metilo en las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos expuestos a solventes mejoran la estabilidad de la temperatura. Se prefiere alterar (p. ej., por sustitución) a más residuos hidrofóbicos en una superficie cóncava con un pliegue hacia adentro. En una superficie convexa las alteraciones (p. ej., por sustitución) a residuos de aminoácidos con un número aumentado de grupos metilo en la cadena lateral son preferidas.

40 [0065] Usando el programa CAST encontrado en Internet en <http://sunrise.cbs.umn.edu/castlversion> 1.0 (lanzado en Feb. 1998). (referencia: Jie Liang, Herbert Edeisbrunner, and Ciare Woodward. 1998. Anatomy of protein Pockets and Cavities: Measurements of binding site geometry and implications for ligand design. Protein Science, 7, pags. 1884-1897), un área cóncava que accede a la superficie puede ser identificada. El acceso a la superficie está definido en el programa como una sonda con un diámetro de 1.4 Å que puede pasar dentro y fuera. Usando los parámetros por defecto del programa CAST, se pueden encontrar cavidades cóncavas usando la estructura de alfa-amilasa baja en calcio de *B. licheniformis* como se encuentra en la base de datos de Brookhaven (IBPL):

50 Tres tipos de interacción pueden ser racionalizados:

- A. Interacción entre la cadena lateral del residuo y la proteína,
- B. Interacción entre la cadena lateral del residuo y el agua circundante,
- C. Interacción entre el agua y la proteína.

55 [0066] Usando la  $\alpha$ -amilasa del tipo Termamyl madre mostrada en SEC ID N°: 4 como basal, las posiciones siguientes están consideradas a estar expuestas a solventes y pueden ser alteradas de manera adecuada: E376, S417, A420, S356, Y358.

60 [0067] Las posiciones expuestas a solventes correspondientes y otras posiciones en la superficie de otra  $\alpha$ -amilasa del tipo Termamyl pueden ser identificadas usando el programa dssp de W. Kabsch y C. Sander, Biopolymers 22 (1983) págs. 2577-2637. Las superficies convexas pueden ser identificadas usando el programa AACAVI parte del paquete WHATIF (G. Vriend, Whatif and drug design program. J. Mol. Graph. 8, pp. 52-56. (1990) versión 19980317).

65 [0068] En una forma de realización de la invención, una variante comprende una o más de las sustituciones siguientes: E376K, S417T, A420Q,R, S356A, Y358F.

5 [0069] Los inventores han descubierto que la estabilidad a pH ácido y/o a una concentración de calcio baja a altas temperaturas puede ser aumentada todavía más combinando las mutaciones en las posiciones anteriormente mencionadas, es decir, E376, S417, A420, S356, Y358, (usando la numeración de la SEC ID N°: 4) con mutaciones en una o más de las posiciones K176, I201, y H205.

[0070] Las sustituciones adicionales siguientes son preferidas:

10 K176A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,M,N,F,P,S,T,W,Y,V;  
I201A,R,D,C,E,Q,G,H,L,K,M,N,F,P,S,T,W,Y,V;  
H205A,R,D,C,E,Q,G,I,L,K,M,N,F,P,S,T,W,Y,V;

15 [0071] Como también se muestra en el ejemplo 2 que ilustra la invención, la combinación de las mutaciones siguientes dan una estabilidad aumentada:

20 KI76+I201F+H205N+E376K+A420R o  
KI76+I201F+H205N+S417T+A420Q o  
KI76+I201F+H205N+S356A+ Y358F usando la  $\alpha$ -amilasa híbrida a la que se hace referencia como LE174 como la  $\alpha$ -amilasa del tipo Termamyl madre.

#### Mutaciones generales en variantes de la invención

25 [0072] Puede ser preferido que una variante de la invención comprenda una o más modificaciones además de las subrayadas arriba. Así, puede ser ventajoso que uno o más residuos de prolina presentes) en la parte de la variante de  $\alpha$ -amilasa a que es modificada sean sustituido(s) con un residuo sin prolina que puede ser cualquiera de los posibles residuos sin prolina de origen natural, y que preferiblemente es una alanina, glicina, serina, treonina, valina o leucina.

30 [0073] Análogamente, puede ser preferido que uno o más residuos de cisteína presentes entre los residuos de aminoácidos con los cuales la  $\alpha$ -amilasa madre es modificada sean sustituido(s) con un residuo sin cisteína tal como serina, alanina, treonina, glicina, valina o leucina.

35 [0074] Además, una variante de la invención puede -bien como única modificación o en combinación con cualquiera de las modificaciones arriba subrayadas- ser modificada de modo que una o más Asp y/o Glu presentes en un fragmento de aminoácido correspondiente al fragmento de aminoácido 185-209 de la SEC ID N°: 4 sea sustituido por una Asn y/o Gln, respectivamente. También es de interés la sustitución, en la  $\alpha$ -amilasa del tipo Termamyl, de uno o más de los residuos de Lys presentes en un fragmento de aminoácido correspondiente al fragmento de aminoácido 185-209 de la SEC ID N°: 4 por una Arg.

40 [0075] Será entendido que la presente invención comprende las variantes que incorporan dos o más de las modificaciones arriba subrayadas.

[0076] Además, puede ser ventajoso introducir mutaciones puntuales en cualquiera de las variantes descritas en la presente.

#### Clonación de una secuencia de ADN que codifica una $\alpha$ -amilasa de la invención

45 [0077] La secuencia de ADN que codifica una  $\alpha$ -amilasa madre puede ser aislada de cualquier célula o microorganismo que produce la  $\alpha$ -amilasa en cuestión, usando varios métodos bien conocidos en la técnica. Primero, un ADN genómico y/o biblioteca de ADNc debería ser construida usando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la  $\alpha$ -amilasa por estudiar. Después, si la secuencia de aminoácidos de la  $\alpha$ -amilasa es conocida, las sondas de oligonucleótidos homólogos marcadas pueden ser sintetizadas y usadas para identificar clones codificadores de  $\alpha$ -amilasa de una biblioteca genómica obtenida a partir del organismo en cuestión. De forma alternativa, una sonda de oligonucleótidos marcada que contiene secuencias homólogas a un gen de  $\alpha$ -amilasa conocido podría ser usada como sonda para identificar clones codificadores de  $\alpha$ -amilasa, usando unas condiciones de hibridación y de lavado de menor astringencia.

55 [0078] Otro método para identificar clones codificadores de  $\alpha$ -amilasa implica la inserción de fragmentos de ADN genómica en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformación de bacterias  $\alpha$ -amilasa-negativas con la biblioteca de ADN genómico resultante, y luego colocación en placas de las bacterias transformadas en agar conteniendo un sustrato para  $\alpha$ -amilasa, permitiendo así que los clones expresen la  $\alpha$ -amilasa para ser identificada.

60 [0079] De forma alternativa, la secuencia de ADN que codifica la enzima puede ser preparada sintéticamente por métodos estándar establecidos, p. ej. el método de fosforamidita descrito por S.L. Beaucage y M.H. Caruthers (1981) o el método descrito por Matthes *et al.* (1984). En el método de fosforamidita, los oligonucleótidos son sintetizados, p. ej., en un sintetizador de ADN automático, purificados, fijados, ligados y clonados en los vectores apropiados.

65 [0080] Finalmente, la secuencia de ADN puede ser de origen genómico y sintético mezclado, de origen sintético y de ADNc mezclado o de origen genómico y de ADNc mezclado, preparado ligando fragmentos de origen sintético,

genómico o de ADNc (según sea apropiado, los fragmentos correspondiendo a varias partes de la secuencia de ADN entera), según 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 4.683.2020 R.K. Saiki *et al.* (1988).

5

#### Mutagénesis sitio dirigida

[0081] Una vez que una secuencia de ADN codificadora de  $\alpha$ -amilasa ha sido aislada, y los sitios deseables para la mutación han sido identificados, las mutaciones pueden ser introducidas usando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que franquean los sitios de mutación deseados; los nucleótidos mutantes son insertados durante la síntesis de los oligonucleótidos. En un método específico, un hueco monocatenario de ADN, que conecta la secuencia codificadora de  $\alpha$ -amilasa, es creado en un vector portador del gen de  $\alpha$ -amilasa. Luego, el nucleótido sintético, portador de la mutación deseada, es fijado a una parte homóloga del ADN monocatenario. El hueco restante es luego rellenado con ADN polimerasa I (Fragmento Klenow) y la construcción es ligada usando T4 ligasa. Un ejemplo específico de este método está descrito en Morinaga *et al.* (1984). US 4.760.025 expone la introducción de oligonucleótidos que codifican mutaciones múltiples mediante la realización de menores alteraciones del cassette. No obstante, una variedad todavía superior de mutaciones puede ser introducida en un momento cualquiera por el método de Morinaga, porque se puede introducir una multitud de oligonucleótidos, de varias longitudes.

20

[0082] Otro método para introducir mutaciones en secuencias de ADN codificadoras de  $\alpha$ -amilasa está descrito en Nelson y Long (1989). Esto 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. Del fragmento generado por PCR, un fragmento de ADN portador de la mutación puede ser aislado por seccionamiento con endonucleasas de restricción y reinsertado en un plásmido de expresión.

25

#### Mutagénesis aleatoria

[0083] La mutagénesis aleatoria se realiza de manera adecuada bien como mutagénesis aleatoria localizada o específica de la región en al menos tres partes del gen que traduce a la secuencia de aminoácidos mostrada en cuestión, o dentro del gen entero.

30

[0084] La mutagénesis aleatoria de una secuencia de ADN que codifica una  $\alpha$ -amilasa madre puede ser convenientemente realizada usando cualquier método conocido en la técnica.

35

[0085] En relación con 10 anterior, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para generar una variante de una  $\alpha$ -amilasa madre, p. ej., en el que la variante muestra termoestabilidad alterada o aumentada con respecto a la madre, el método comprendiendo:

40

- (a) someter a una secuencia de ADN que codifica la  $\alpha$ -amilasa madre a mutagénesis aleatoria,
- (b) expresar la secuencia de ADN mutada obtenida en la fase (a) en una célula huésped, y
- (c) seleccionar células huéspedes que expresan una variante de  $\alpha$ -amilasa que tiene una propiedad alterada (es decir termoestabilidad) con respecto a la  $\alpha$ -amilasa madre.

45

[0086] La fase (a) del método anterior de la invención es preferiblemente realizada usando cebadores dopados.

[0087] Por ejemplo, la mutagénesis aleatoria puede ser realizada usando un agente mutagenizante físico o químico adecuado, usando un oligonucleótido adecuado, o sometiendo a 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, aleatorización, eliminaciones, y/o inserciones.

50

[0088] Ejemplos de un agente mutagenizante físico o químico adecuado para este objetivo 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 de nucleótidos. Cuando estos agentes son usados, la mutagénesis es normalmente realizada incubando la secuencia de ADN que codifica la enzima madre por mutagenizar ante el agente mutagenizante de elección bajo las condiciones adecuadas para que la mutagénesis tenga lugar, y seleccionando el ADN mutado que tiene las propiedades deseadas.

55

[0089] Cuando la mutagénesis es realizada usando un oligonucleótido, el oligonucleótido puede ser dopado o adicionado con los tres nucleótidos no parentales durante la síntesis del oligonucleótido en las posiciones que deben ser cambiadas. El dopaje o adición puede hacerse de tal manera que los codones para los aminoácidos indeseados sean evitados. El oligonucleótido dopado adicionado puede ser incorporado en el ADN que codifica la enzima alfa-amilasa por cualquier técnica publicada, usando p. ej. PCR, LCR o cualquier ADN polimerasa y ligasa como se crea apropiado.

60

65

[0090] Preferiblemente, el dopaje se realiza usando "dopaje aleatorio constante", donde se predefina el porcentaje de

tipo salvaje y la mutación en cada posición. Además, el dopaje puede ser dirigido a una preferencia para la introducción de los nucleótidos determinados, y de ese modo una preferencia para la introducción de uno o más residuos de aminoácidos específicos. El dopaje puede hacerse, p. ej., para permitir la introducción del 90% de tipo salvaje y del 10% de mutaciones en cada posición. Una consideración adicional en la elección de un esquema de dopaje se basa en limitaciones genéticas al igual que proteínicas-estructurales. El esquema de dopaje puede ser hecho usando el programa DOPE que, entre otras cosas, asegura que se evita la introducción de codones de detención.

[0091] Cuando se usa la mutagénesis generada por PCR, bien un gen tratado o no tratado químicamente que codifica una  $\alpha$ -amilasa madre es sometido a PCR bajo condiciones que aumentan la desincorporación de nucleótidos (Deshler 1992; Leung *et al.*, Technique, Vol. 1, 1989, págs. 11-15).

[0092] Una cepa mutadora 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  $\alpha$ -amilasa, p. ej., mediante la transformación de un plásmido conteniendo la glicosilasa madre en la cepa mutadora, haciendo crecer la cepa mutadora con el plásmido y aislando el plásmido mutado de la cepa mutadora. El plásmido mutado puede ser posteriormente transformado en el organismo de expresión.

[0093] La secuencia de ADN por mutagenizar puede estar presente convenientemente en una biblioteca genómica o de ADNc obtenida a partir de un organismo que expresa la alfa-amilasa madre. De forma alternativa, la secuencia de ADN puede estar presente en un vector adecuado tal como un plásmido o un bacteriófago, el cual como tal puede ser incubado con o por el contrario expuesto al agente mutagenizante. El ADN por mutagenizar puede también estar presente en una célula huésped bien siendo integrado en el genoma de dicha célula o estando presente en un vector comprendido en la célula. Finalmente, el ADN por mutagenizar puede estar en forma aislada. Sera entendido que la secuencia de ADN que se deba someter a mutagénesis aleatoria sea preferiblemente un ADNc o una secuencia de ADN genómico.

[0094] En algunos casos puede ser conveniente amplificar la secuencia de ADN mutada antes de realizar la fase de expresión b) o la fase de selección c). Esta amplificación puede ser realizada conforme a métodos conocidos en la técnica, el método actualmente preferido siendo la amplificación generada por PCR usando cebadores de oligonucleótidos preparada en base a la secuencia de ADN de aminoácidos de la enzima madre.

[0095] Después de la incubación con o de la exposición al agente mutagenizante, el ADN mutado es expresado cultivando una célula huésped adecuada portadora de 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 llevada por la secuencia de ADN que codifica la enzima madre durante el tratamiento de 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 amyloliquejaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; y bacterias gram-negativas tales como *E. coli*.

[0096] La secuencia de ADN mutada puede además comprender una secuencia de ADN que codifica las funciones que permiten la expresión de la secuencia de ADN mutada.

#### Mutagénesis aleatoria localizada

[0097] La mutagénesis aleatoria puede estar ventajosamente localizada en una parte de la  $\alpha$ -amilasa madre en cuestión. Esto puede, p. ej., ser ventajoso cuando algunas regiones de la enzima han sido identificadas por ser de particular importancia para una propiedad dada de la enzima, y que al modificarse está previsto 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.

[0098] La mutagénesis aleatoria localizada, o específica de la región es convenientemente realizada 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 se debe modificar puede ser aislada, p. ej., mediante la inserción en un vector adecuado, y dicha parte puede ser posteriormente sometida a mutagénesis usando cualquiera de los métodos de mutagénesis mencionados anteriormente.

#### Métodos alternativos para proporcionar variantes de $\alpha$ -amilasa

[0099] Los métodos alternativos para proporcionar variantes de la invención incluyen el método de transposición de genes conocido en la técnica incluyendo los métodos, p. ej., descritos en WO 95/22625 (de Affymax Technologies N.Y.) y WO 96/00343 (de Novo Nordisk A/S).

#### Expresión de variantes de $\alpha$ -amilasa de la invención

[0100] De acuerdo con la invención, una secuencia de ADN que codifica la variante producida por los métodos anteriormente descritos, o por cualquier método alternativo conocido en la técnica, puede ser expresada, en forma enzimática, usando un vector de expresión que normalmente incluye secuencias de control que codifican un promotor, operador, sitio de unión de ribosomas, señal de iniciación de la traducción, y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores.

[0101] El vector de expresión recombinante que lleva la secuencia de ADN que codifica una variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención puede ser cualquier vector que puede ser sometido convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector a menudo dependerá de la célula huésped en la que se deba introducir. 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, mini cromosoma o un cromosoma artificial. De forma alternativa, el vector puede ser uno que, al ser introducido en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el(los) cromosoma(s) donde se ha integrado.

[0102] En el vector, la secuencia de ADN debería estar operativamente conectada a una secuencia de un promotor adecuado. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede derivar de genes que codifican proteínas bien homologas o heterólogas a la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN que codifica una variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención, especialmente en un huésped bacteriano, son el promotor del operon *lac* de *E. coli*, los promotores del gen de agarasa *dagA* de *Streptomyces coelicolor*, los promotores del gen de  $\alpha$ -amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, los promotores del gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus Stearothermophilus*, los promotores de  $\alpha$ -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 los derivados del gen que codifica la TAKA amilasa de *A. oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*,  $\alpha$ -amilasa neutra de *A. Niger*,  $\alpha$ -amilasa estable acida de *A. Nfger*, glucoamilasa de *A. Niger*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *A. oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae* o acetamidasa de *A. nidulans*.

[0103] El vector de expresión de la invención puede también comprender un terminador de la transcripción adecuado y, en eucariotas, las secuencias de poliadenilación operativamente conectadas a la secuencia de ADN que codifica la variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención. Las secuencias de terminación y de poliadenilación pueden de manera adecuada derivar de las mismas fuentes que el promotor.

[0104] El vector puede además comprender una secuencia de ADN que permita que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de tales secuencias son los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB 110, pE194, pAMBI Y pIJ702.

[0105] El vector puede también comprender un marcador seleccionable, p. ej. un gen cuyo producto complemente un defecto en la célula huésped, tal como los genes *dal* de *B. subtilis* o de *B. licheniformis*, o uno que confiera resistencia antibiótica tal como resistencia a la ampicilina, canamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Además, el vector puede comprender marcadores de selección de *Aspergillus* tales como *amdS*, *argB*, *niaD* y *sC*, un marcador que de lugar a la resistencia a la higromicina, o bien la selección puede ser realizada por cotransformación, p. ej. como se describe en WO 91/17243.

[0106] Mientras que la expresión intracelular puede ser ventajosa en algunos aspectos, p. ej. cuando se usan bacterias determinadas como células huéspedes, es generalmente preferido que la expresión sea extracelular. En general, las  $\alpha$ -amilasas de *Bacillus* mencionadas en la presente comprenden una prerregión que permite la secreción de la proteasa expresada en el medio de cultivo. Si se desea, esta prerregión puede ser sustituida por una prerregión diferente o secuencia señal, realizándose convenientemente por sustitución de las secuencias de ADN que codifican las prerregiones respectivas.

[0107] Los procedimientos usados para ligar el constructo de ADN de la invención que codifica una variante de  $\alpha$ -amilasa, el promotor, terminador y otros elementos, respectivamente, y para insertarlos en los vectores adecuados conteniendo la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook *et al*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor, 1989).

[0108] La célula de la invención, que comprende bien un constructo de ADN o bien un vector de expresión de la invención tal como se ha definido anteriormente, es ventajosamente usada como célula huésped para la producción recombinante de una variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención. La célula puede ser transformada con el constructo de ADN de la invención que codifica la variante, convenientemente integrando el constructo de ADN (en una o más copias) en el cromosoma huésped. Esta integración esta generalmente considerada como una ventaja puesto que la secuencia de ADN es mas propensa a ser mantenida de forma estable en la célula. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped puede ser realizada según los métodos convencionales, p. ej. por recombinación homologa 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.

[0109] La célula de la invención puede ser una célula de un organismo mas grande tal como un mamífero o un insecto, pero es preferiblemente una célula microbiana, p. ej., una célula bacteriana o una fúngica (incluyendo la levadura).

[0110] Ejemplos de bacterias adecuadas son bacterias gram positivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquejaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, o *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*, o bacterias gramnegativas tales como *E. coli*. La transformación de las bacterias puede, por ejemplo, ser efectuada por transformación de protoplastos o usando células competentes de una manera conocida *per se*.

[0111] El organismo de la levadura puede ser seleccionado de forma favorable de una especie de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomices*, p. ej. *Saccharomyces cerevisiae*. El hongo filamentoso puede ventajosamente pertenecer a una especie de *Aspergillus*, p. ej. *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus Niger*. Las células micóticas pueden ser transformadas por un proceso que implica la formación de protoplastos 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 huésped de *Aspergillus* esta descrito en EP 238 023.

[0112] En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para producir una variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención, este método comprende el cultivo de una célula huésped según el modo descrito anteriormente bajo condiciones propicias para la producción de la variante y la recuperación de la variante de las células y/o del medio de cultivo.

[0113] 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  $\alpha$ -amilasa de la invención. Los medios adecuados están disponibles por proveedores comerciales o pueden ser preparados según recetas publicadas (p. ej., como se describe en los catálogos de la American Type Culture Collection).

[0114] La variante de  $\alpha$ -amilasa segregada a partir de las células huésped 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 precipitación de los componentes proteináceos del medio mediante una sal tal como sulfato de amonio, seguido del uso de procedimientos cromatográficos tales como la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, o similares.

#### Aplicaciones industriales

[0115] Las variantes de  $\alpha$ -amilasa de esta invención poseen propiedades valiosas que permiten una variedad de aplicaciones industriales. Una variante enzimática de la invención es aplicable como componente en composiciones detergentes para lavar la ropa, para lavavajillas y para la limpieza de superficies duras. Muchas variantes son particularmente útiles en la producción de edulcorantes y etanol a partir de almidón, y/o para el desencolado textil. Las condiciones para procesos de conversión del almidón convencionales, incluyendo la licuefacción del almidón y/o procesos de sacarificación, están descritos en, p. ej., US 3.912.590 y en las publicaciones de patentes EP Nos. 252.730 y 63.909.

#### Producción de edulcorantes de almidón

[0116] Un proceso "tradicional" para la conversión del almidón en jarabes de fructosa normalmente consiste en tres procesos enzimáticos consecutivos, 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 a dextrinas por una  $\alpha$ -amilasa (p. ej. Termamyl<sup>TM</sup>) 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 una estabilidad enzimática óptima bajo estas condiciones, se añade 1 mM de calcio (40 ppm de iones de calcio libre).

[0117] Después del proceso de licuefacción las dextrinas son convertidas en dextrosa por adición de una glucoamilasa (p. ej. AMG<sup>TM</sup>) y una enzima desramificante, tal como una isoamilasa o una pululanasa (p. ej. Promozyme<sup>TM</sup>) Antes de esta fase el pH es reducido a un valor por debajo de 4.5, manteniendo la temperatura alta (por encima de 95°C), y la actividad  $\alpha$ -amilasa licuefactante es desnaturalizada. La temperatura es reducida a 60°C, y se añade la glucoamilasa y la enzima desramificante. El proceso de sacarificación se desarrolla durante 24-72 horas.

[0118] Después del proceso de sacarificación el pH es aumentado a un valor en la gama de pH de 6-8, preferiblemente de 7.5, Y el calcio es quitado por intercambio iónico. El jarabe de dextrosa es luego convertido en sirope rico en fructosa usando, p. ej., una glucosaisomerasa inmovilizada (tal como Sweetzyme<sup>TM</sup>).

[0119] Al menos 1 mejora enzimática de este proceso podría ser prevista. Reducción de la dependencia del calcio de la  $\alpha$ -amilasa licuefactante. La adición de calcio libre es requerida para asegurar adecuadamente una estabilidad elevada de la  $\alpha$ -amilasa, pero el calcio libre inhibe fuertemente la actividad de la glucosaisomerasa y requiere ser retirado, mediante una operación unitaria costosa, hasta un punto en el que reduce el nivel de calcio libre por debajo de 3-5 ppm. Los ahorros en el coste podrían ser obtenidos si esta operación pudiera ser evitada y el proceso de licuefacción pudiera

ser realizado sin adición de iones de calcio libre.

5 [0120] Para conseguirlo, se requiere una  $\alpha$ -amilasa del tipo Termamyl menos calcio-dependiente que sea estable y altamente activa a concentraciones bajas de calcio libre « 40 ppm). Esta  $\alpha$ -amilasa del tipo Termamyl debería tener un pH 6ptimo a un pH en la gama de 4.5-6.5, preferiblemente en la gama de 4.5-5.5.

#### Composiciones de detergentes

10 [0121] Como se ha mencionado anteriormente, las variantes de la invención pueden ser incorporadas de manera adecuada en composiciones de detergentes. Se hace referencia, por ejemplo, a WO 96/23874 y WO 97/07202 para detalles adicionales referentes a ingredientes pertinentes de composiciones de detergentes (tales como detergentes para lavar la ropa o lavavajillas), métodos apropiados de formulación de las variantes en tales composiciones de detergentes, y para ejemplos de tipos relevantes de composiciones de detergentes.

15 [0122] Las composiciones de detergentes que comprenden una variante de la invención pueden también comprender una o más enzimas distintas, tales como una lipasa, cutinasa, proteasa, célulasa, peroxidasa o lacasa, y/u otra  $\alpha$ -amilasa.

20 [0123] Las variantes de  $\alpha$ -amilasa de la invención pueden ser incorporadas en detergentes a concentraciones empleadas de forma convencional. Está actualmente contemplado que una variante de la invención pueda ser incorporada en una cantidad correspondiente a 0.00001-1 mg (calculado como proteína enzimática activa pura) de  $\alpha$ -amilasa por litro de solución para lavar la ropa/lavavajillas usando niveles de dosificación convencionales del detergente.

## 25 MATERIALES Y MÉTODOS

Enzimas :

30 [0124] Variante de alfa-amilasa híbrida LE174: LE174 es una alfa-amilasa híbrida del tipo Termamyl que es idéntica a la secuencia de Termamyl, es decir, la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en la SEC ID n°: 4, a excepción de que los 35 residuos de aminoácidos N-terminales (de la proteína madura) han sido sustituidos por los 33 residuos N-terminales de BAN (proteína madura), es decir, la Alfa-amilasa de *Bacillus amylolicuefaciens* mostrada en la SEC ID n°: 5, que además tiene las mutaciones siguientes: H156Y+AI8IT+NI90F+A209V+Q264S (usando la numeración de la SEC ID N°: 4).

### 35 Construcción de pSNK10I

40 [0125] Este vector transportador de *E. coli*/*Bacillus* puede utilizarse para introducir mutaciones sin la expresión de  $\alpha$ -amilasa en *E. coli* y luego ser modificado de tal manera que la  $\alpha$ -amilasa este activa en *Bacillus*. El vector fue construido como sigue: El gen de  $\alpha$ -amilasa en el vector de pX (pDN1528 con las alteraciones siguientes dentro de amyL: BAN(1-33), H156Y, AI8IT, NI90F, A209V, Q264S, el plásmido pDN1528 está también descrito en el ejemplo 1) fue inactivado por interrupción en el sitio PstI en la región de codificación 5' del gen de alfa-amilasa por un fragmento de 1.2 kb que contenía un fragmento de origen de *E. coli*. Este fragmento fue amplificado a partir del pUC19 (GenBank Accession #:X02514) usando el cebador directo 1: 5' -gacctgcagtcaggcaacta-3' (SEC ID n°: 28) y el cebador inverso 1: 5'-tagagtcgacctgcaggcat-3' (SEC ID n°: 29). El amplicón de la PCR y el plásmido pX que contenía el gen de  $\alpha$ -amilasa fueron digeridos con PstI a 37°C durante 2 horas. El fragmento del vector de pX y el amplicón de origen de *E. coli* fueron ligados a temperatura ambiente durante 1 hora y transformados en *E. coli* por electro transformación. El vector resultante se denomina pSnK101.

50 [0126] Este vector transportador de *E. coli*/*Bacillus* puede utilizarse para introducir mutaciones sin expresión de  $\alpha$ -amilasa en *E. coli* y luego ser modificado de tal manera que la  $\alpha$ -amilasa este activa en *Bacillus*. El vector fue construido como sigue: El gen de  $\alpha$ -amilasa en el vector de pX (pDN 1528 con las alteraciones siguientes dentro de amyL: BAN(1-33), H156Y +A181T +NI90F+A209V+Q264S, el plásmido pDN1528 esta posteriormente descrito en el ejemplo 1) fue inactivado por interrupción en el sitio PstI en la región de codificación 5' del gen de alfa-amilasa por un fragmento de 1,2 kb conteniendo un fragmento de origen de *E. coli*. Este fragmento fue amplificado del pUC19 (GenBank Accesion #:X02514) usando el cebador directo 2: 5'-gacctgcagtcaggcaacta-3' (SEC ID n°: 30) y el cebador inverso 2: 5'-tagagtcgacctgcaggcat-3' (SEC ID n°: 31). El amplicón de la PCR y el plasmido pX conteniendo el gen de  $\alpha$ -amilasa fueron digeridos con PstI a 37°C durante 2 horas. El fragmento del vector de pX y el amplicón de origen de *E. coli* fueron ligados a temperatura ambiente durante 1 hora y transformados en *E. coli* por electrotransformación. El vector resultante se denomina pSnK101.

Ensayo de filtro a bajo pH

65 [0127] Se colocan bibliotecas de *Bacillus* en un sandwich de acetato de celulosa (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) -y filtros de nitrocelulosa (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) en placas de TY agar con 10 (g/ml de cloranfenicol a 37°C durante al menos 21 h. La capa de acetato de celulosa está localizada en la placa de

TY agar.

[0128] Cada sandwich de filtro es específicamente marcado con una aguja después de la colocación en placas, pero antes de la incubación con el fin de poder localizar variantes positivas en el filtro y el filtro de nitrocelulosa con las variantes unidas es transferido a un contenedor con tampón citrato, pH 4.5 e incubado a 90°C durante 15 min. Los filtros de acetato de celulosa con colonias son almacenados en las placas de TY a temperatura ambiente hasta su uso. Tras la incubación, la actividad residual es detectada en las placas de ensayo que contienen un 1 % de agarosa, 0.2% de almidón en tampón citrato, pH 6.0. Las placas de ensayo con filtros de nitrocelulosa son marcados de la misma manera que el sandwich de filtro e incubados durante 2 horas a 50°C. Después de la eliminación de los filtros las placas de ensayo son coloreadas con una solución de Lugol al 10%. Las variantes que degradan el almidón son detectadas como manchas blancas en fondo azul oscuro y luego identificadas en las placas de almacenamiento. Las variantes positivas son reseleccionadas dos veces bajo las mismas condiciones que la primera selección.

Selección secundaria

[0129] Los transformantes positivos después de la reselección son elegidos de la placa de almacenamiento y evaluados en un ensayo de placas secundario. Transformantes positivos son hechos crecer durante 22 horas a 37°C en 5 ml de LB + cloranfenicol. El cultivo de *Bacillus* de cada transformante positivo y una variante de LE174 de control fueron incubados en un tampón citrato, pH 4.5 a 90°C y se tomaron muestras a 0, 10, 20, 30, 40, 60 y 80 minutos. Una muestra de 3 microlitros fue esparcida en una placa de ensayo. La placa de ensayo fue coloreada con una solución de Lugol al 10%. Las variantes mejoradas fueron vistas como variantes con actividad residual mas alta detectada como halos en la placa de ensayo que la basal. Las variantes mejoradas son determinadas por secuenciación nucleótida.

Fermentación y purificación de variantes de  $\alpha$ -amilasa

[0130] Una cepa de *B. subtilis* conteniendo el plásmido de expresión pertinente es colocado en líneas en una placa de LB-agar con 15  $\mu$ g/ml de cloranfenicol de un caldo a -80°C, y hecho crecer durante toda la noche a 37°C. Las colonias son transferidas a 100 ml de medios de BPX suplementadas con 15  $\mu$ g/ml de cloranfenicol en un matraz de agitación de 500 ml. Composición del medio de BPX:

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

[0131] El cultivo es agitado a 37°C a 270 rpm durante 5 días.

[0132] Las células y fragmentos celulares son extraídos 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 de 10000 cortes) y el tampón es cambiado a 20 mM de Acetato, pH 5.5. El producto filtrado por UF es aplicado en una S-sepharose EE y se realiza la elución por una elución por fases con 0.2 M NaCl en el mismo tampón. El eluato es dializado contra 10 mM de Tris, pH 9.0 y aplicado en una Q-sepharose EE y eluido con un gradiente lineal de 0-0.3 M de NaCl sobre 6 volúmenes de columna. Las fracciones que contienen la actividad (medidas por el ensayo Phadebas) son agrupadas, el pH fue ajustado a pH 7.5 y el color restante fue extraído por un tratamiento con 0.5% w/vol. de carbón activo en 5 minutos.

50 Determinación de la estabilidad

[0133] Todos los procesos de estabilidad han sido realizados usando la misma preparación. El método es:

[0134] La enzima es incubada bajo las condiciones pertinentes (1-4). Las muestras son tomadas a 0,5, 10, 15 Y 30 minutos y diluidas 25 veces (misma dilución para todas las muestras tomadas) en un tampón de ensayo (0.1 M 50 mM tampón Britton pH 7.3) Y la actividad es medida usando el ensayo Phadebas (Pharmacia) bajo condiciones estándar pH 7.3, 37°C.

[0135] La actividad medida antes de la incubación (0 minutos) se usa como referencia (100%). El descenso del porcentaje es calculado como función del período de incubación. La tabla muestra la actividad residual después de 30 minutos de incubación.

Determinación de actividad - (KNU)

[0136] Una unidad de kilo de alfa-amilasa (1 KNU) es la cantidad de enzimática que rompe 5.26 g de almidón (Merck, Amylum Solubile, Erg. B 6, Batch 9947275) por hora en el método estándar de Novo Nordisk para la determinación de

alfa-amilasa en base a la condición siguiente:

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

[0137] Una descripción detallada del método analítico de Novo Nordisk (AF 9) está disponible bajo pedido.

10

Determinación de la actividad específica

Ensayo para la actividad  $\alpha$ -amilasa

15

[0138] La actividad  $\alpha$ -amilasa está determinada por un método que utiliza comprimidos de Phadebas® como sustrato. Los comprimidos de Phadebas (Phadebas® Amylase Test, suministrada por Pharmacia Diagnostic) contienen un polímero de almidón coloreado de azul insoluble entrecruzado que ha sido mezclado con albumina de suero bovino y una sustancia del tampón y colocado en comprimidos.

20

[0139] Para cada medición individual una pastilla es suspendida en un tuba conteniendo 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 CaCl<sub>2</sub>, pH ajustado al valor de interés con NaOH). La prueba es realizada al baño maría a la temperatura de interés. La  $\alpha$ -amilasa que debe evaluarse es diluida en x ml de 50 mM de tampón Britton-Robinson. 1 ml de esta solución de  $\alpha$ -amilasa es añadido a x ml de tampón Britton-Robinson 50 mM. El almidón es hidrolizado por la  $\alpha$ -amilasa dando fragmentos azules solubles. La absorbencia de la solución azul resultante, medida espectrofotométricamente a 620 nm, es una función de la actividad  $\alpha$ -amilasa.

25

30

[0140] Es importante que la absorbencia medida de 620 nm después de 10 o 15 minutos de incubación (duración de la prueba) esté en la gama de 0.2 a 2.0 unidades de absorbencia a 620 nm. En esta gama de absorbencia hay un alineamiento 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  $\alpha$ -amilasa dada hidrolizará una cantidad determinada de sustrato y se producirá un color azul. La intensidad del color es medida a 620 nm. La absorbencia medida es directamente proporcional a la actividad específica (actividad/mg de proteína pura de  $\alpha$ -amilasa) de la  $\alpha$ -amilasa en cuestión bajo el grupo dado de condiciones.

35

EJEMPLOS

Ejemplo 1

40

[0141] Construcción, por mutagénesis aleatoria, de variantes de  $\alpha$ -amilasa LE174 del tipo Termamyl con una estabilidad mejorada a bajo pH y una dependencia reducida de iones calcio para la estabilidad en comparación con la enzima madre.

Mutagénesis aleatoria

45

[0142] Para mejorar la estabilidad a bajo pH y la concentración de calcio bajo la variante de  $\alpha$ -amilasa LE174 madre, se realizó la mutagénesis aleatoria en regiones preseleccionadas.

50

[0143] Las regiones eran:

Región:	Residuo:
SERI	A425-Y438
SERII	W411-L424
SERIII	G397-G410
SERV	T369-H382
SERVII	G310-F323
SERIX	L346-P359

55

[0144] Por cada seis regiones, se sintetizan oligonucleótidos aleatorios usando el mismo nivel de mutación (97% de la basal y 1 % de cada uno de los tres nucleótidos restantes dando el 3% de mutaciones) en cada posición de nucleótidos en las regiones anteriores, p. ej., 1. posición en el codón para A425: 97%C, 1 %A, 1 %T, 1 %G. Los seis oligonucleótidos aleatorios y en caso de usar cebadores auxiliares SOE complementarios se muestran en las tablas 1-6: Con las cuatro distribuciones de nucleótidos a continuación.

## ES 2 551 029 T3

### Tabla 1

[0145] RSERI: 5'-GC GTT TTG CCG GCC GAC ATA 312 234 322 243 333 133 444 233 423 242 212 211 243 343  
CAA ACC TGA ATT-3' (SEC ID n°: 15)

### Tabla 2

[0146] RSERII: 5'-GC GTT TTG CCG GCC GAC ATA CAT TCG CTT TGC CCC ACC GGG TCC GTC TGT TAT TAA  
TGC CGC 311 133 241 122 243 113 341 432 423 433 223 332 242 331 GCC GAC AAT GTC ATG GTG-3' (SEC ID n°:  
16)

### Tabla 3

[0147] RSERIII: 5'-GTC GCC TTC CCT TGT CCA 433 413 112 423 124 424 423 411 121 123 124 324 243 233 GTA  
CGC ATA CTG TTT TCT-3' (SEC ID n°: 17)  
Cebador auxiliar FSERIII: 5'-TGG ACA AGG GAA GGC GAC AG-3' (SEC ID n°: 17)

### Tabla 4

[0148] RSERV: 5-TAA GAT CGG TTC AAT TTT 424 222 311 443 144 112 223 434 324 441 423 233 222 342 CCC  
GTA CAT ATC CCC GTA GAA-3 (SEC ID n°: 19)  
Cebador auxiliar FSERV: 5-AAA ATT GAA CCG ATC TTA-3 (SEC ID N°: 20)

### Tabla 5

[0149] FSERVII: 5'-TT CCA TGC TGC ATC GAC ACA GGG AGG CGG CTA TGA TAT GAG GAA ATT GCT GAA  
344 213 442 342 223 311 431 233 422 411 123 442 213 122 TGT CGA TAA CCA-3' (SEC ID N°: 21)

[0150] Cebador auxiliar RSERVII: 5'- TGT CGA TGC AGC ATG GAA - 3' (SEQ ID NO: 22)

### Tabla 6

[0151] FSERIX: 5'-GT CCA AAC ATG GTT TAA GCC 432 243 221 343 222 212 232 313 114 441 123 244 121 333  
TCA GGT TTT CTA CGG GGA-3' (SEC ID N°: 23)  
Cebador auxiliar RSERIX: 5'-GGC TTA AAC CAT GTT TGG AC-3' (SEQ ID N°: 24)

[0152] Distribución de nucleótidos en cada posición de nucleótidos mutados

1:97%A, 1%T, 1%C, 1%G  
2:97%T, 1%A, 1%C, 1%G  
3:97%C, 1%A, 1%T, 1%G  
4:97%G, 1%A, 1%T, 1%C

### Construcción de bibliotecas de plásmidos

[0153] Dos fragmentos de aproximadamente 1.4 kb fueron amplificados por PCR usando el cebador 1B: 5' -CGA TTG  
CTG ACG CTG TTA TTT GCG-3' y el oligonucleótido aleatorio aparente de la tabla 1, respectivamente el  
oligonucleótido aleatorio aparente de la tabla 2. El vector pSnK101 y los fragmentos de la PCR fueron digeridos con  
EcoRV y EagI durante 2 horas. El fragmento de vector de aproximadamente 3.6 kb Y los fragmentos de la PCR de  
aproximadamente 1.3 kb fueron purificados y ligados durante toda la noche y transformados en *E. coli* y luego  
transformados adicionalmente en una estarina huésped de *Bacillus* como se describe abajo. Los oligonucleótidos  
aleatorios aparentes de las Tablas 3-6 (que por un término común se denomina aSER y bSER en Fig. 2) para cada  
región y los cebadores 1B específicos de *B. lichenijormis* (SEC ID n°: 26) y #63: 5'-CTA TCT TTG MC ATA AAT TGA  
AAC C-3' (SEC ID n°: 27) que cubren los sitios EcoRV y EagI en la secuencia de LE174 se utilizan para generar  
fragmentos de una biblioteca de PCR por el método de extensión de la superposición (Horton *et al.*, Gene, 77 (1989),  
págs. 6168) La Figura 2 muestra la estrategia de la PCR. Los fragmentos de la PCR son clonados en el vector  
transportador pSNK101 de *E. colilbacillus* (ver Materiales y Métodos) permitiendo la mutagénesis en *E. coli* y la  
expresión inmediata en *Bacillus subtilis* evitando la acumulación letal de amilasas en *E. coli*. Después de establecer los  
fragmentos de la PCR clonados en *E. coli*, un fragmento de pUC19 modificado es digerido fuera del plásmido y el  
promotor y el gen Termamyl mutado es físicamente conectado y la expresión puede tener lugar en el huésped de  
*Bacillus*.

### Selección

[0154] Las seis bibliotecas fueron seleccionadas en los ensayos de filtro a bajo pH descritos en la sección "Materiales y  
Métodos" arriba.

[0155] Todas las variantes catalogadas en la tabla en el ejemplo 2 a continuación fueron preparadas como se describe  
en el Ejemplo 1.

Ejemplo 2

Medición de la estabilidad

5

[0156] Normalmente, los procesos de licuefacción industriales son realizados a pH 6.0-6.2 con adición de aproximadamente 40 ppm de calcio libre para mejorar la estabilidad a 95°C - 105°C. Las variantes de la invención han sido hechas para mejorar la estabilidad a

10

1. pH inferior a pH 6.2 y/o
2. a niveles de calcio libre inferiores a 40 ppm de calcio libre.

[0157] Un ensayo que mide la estabilidad a pH ácido, pH 5.0, ante 5 ppm de calcio libre fue usado para medir el aumento de la estabilidad.

15

[0158] 10 µg de la variante fueron incubados bajo las condiciones siguientes: una solución de acetato 0.1 M, pH ajustado a pH 5.0, que contiene 5 ppm de calcio y 5% p/p almidón de maíz común (libre de calcio). La incubación fue realizada al baño maría a 95°C durante 30 minutos.

20

Resultados:

[0159] Estabilidad aumentada a pH 5.0, 5 ppm de calcio incubado a 95°C

MINUTOS DE INCUBACIÓN	LE174 K176R+ H205N	CON I201F+ H205N	LE174 CON I201F+ H205N+ A420R	K176R+ E376K+	LE174 CON I201F+ H205N+ A420Q	K176R+ S417T+	LE174 CON I201F+ H205N+ Y358F	K176R+ S356A+
0	100		100		100		100	
5	65		61		66		66	
10	58		53		60		59	
15	51		48		55		56	
30	36		39		45		49	

25

Determinación de la actividad específica

[0160] La actividad específica fue determinada usando el ensayo Phadebas (Pharmacia) (anteriormente descrito) como actividad/mg de enzima. La actividad fue determinada usando el ensayo de α-amilasa descrito en la sección Materiales y Métodos de la presente.

30

LE174 con las sustituciones siguientes:

K176R+I201F+H205N  
Actividad específica determinada: 13400 NU/mg

35

LE174 con las sustituciones siguientes:

K176R+I201F+H205N+E376K+A420R:  
Actividad específica determinada: 14770 NU/mg

40

LE174 con las sustituciones siguientes: K176R+I201F+H205N+S417T +A420Q:

Actividad específica determinada:16670 NU/mg

45

LE174 con las sustituciones siguientes: K176R+I201F+H205N+S356A+ Y358F:

Actividad específica determinada: 15300 NU/mg

REFERENCIAS CITADAS

50

[0161]

Klein, C., et al., Biochemistry 1992, 31, 8740-8746 ,  
Mizuno, H., et al., J. Mol. Biol. (1993) 234, 1282-1283 ,  
Chang, C., et al, J. Mol. Biol. (1993) 229, 235-238 ,  
Larson, S.B., J. Mol. Biol. (1994) 235, 1560-1584 ,  
Lawson, C.L., J. Mol. Biol. (1994) 236, 590-600 ,

55

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

LISTADO DE SECUENCIAS

[0162]

- 25 <110> Novozymes A/S
- <120> Variantes de alfa-amilasa
- 30 <130> 5709.204-WO
- <140> PCT/DK99/00628  
 <141> 1999-11-16
- 35 <150> DK PA 1998 01495  
 <151> 1998-11-16
- <160> 32
- 40 <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1  
 <211> 485  
 <212> PRT
- 45 <213> *Bacillus* sp.
- <400>

ES 2 551 029 T3

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala  
 20 25 30  
 Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp  
 35 40 45  
 Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
 50 55 60  
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly  
 85 90 95  
 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp  
 100 105 110  
 Gly Thr Glu Ile Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn  
 115 120 125  
 Gln Glu Thr Ser Gly Glu Tyr Ala Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp  
 130 135 140

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



ES 2 551 029 T3

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

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

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

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

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

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

Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met  
 195 200 205

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

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

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

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

Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val  
 275 280 285

Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly  
 290 295 300

Gly Asn Tyr Asp Met Ala Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Gln Lys  
 305 310 315 320

His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro  
 325 330 335

Gly Glu Ser Leu Glu Ser Phe Val Gln Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 340 345 350

Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr

	355					360						365					
Gly	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Pro	Thr	His	Ser	Val	Pro	Ala	Met	Lys	Ala		
	370					375					380						
Lys	Ile	Asp	Pro	Ile	Leu	Glu	Ala	Arg	Gln	Asn	Phe	Ala	Tyr	Gly	Thr		
385					390					395				400			
Gln	His	Asp	Tyr	Phe	Asp	His	His	Asn	Ile	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu		
				405					410					415			
Gly	Asn	Thr	Thr	His	Pro	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala	Thr	Ile	Met	Ser	Asp		
			420					425					430				
Gly	Pro	Gly	Gly	Glu	Lys	Trp	Met	Tyr	Val	Gly	Gln	Asn	Lys	Ala	Gly		
		435					440						445				
Gln	Val	Trp	His	Asp	Ile	Thr	Gly	Asn	Lys	Pro	Gly	Thr	Val	Thr	Ile		
	450					455					460						
Asn	Ala	Asp	Gly	Trp	Ala	Asn	Phe	Ser	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser		
465					470					475					480		
Ile	Trp	Val	Lys	Arg													
				485													

<210> 3  
 <211> 514  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus stearothermophilus  
  
 <400>3

5  
  
  
  
  
  
  
  
  
 10

ES 2 551 029 T3

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

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

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

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

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

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



ES 2 551 029 T3

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

ES 2 551 029 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly  
 355 360 365

Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile  
 370 375 380

Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His  
 385 390 395 400

Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp  
 405 410 415

Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro  
 420 425 430

Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr  
 435 440 445

Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser  
 450 455 460

Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr  
 465 470 475 480

Val Gln Arg  
 <210> 5

<211> 480

<212> PRT

<213> Bacillus amyloliquefaciens

5

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Ser  
210 215 220

Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe Ser Phe  
 225 230 235 240  
 Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met  
 245 250 255  
 Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn Ala Gly Lys Leu Glu Asn  
 260 265 270  
 Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser Val Phe Asp Val Pro Leu  
 275 280 285  
 His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met  
 290 295 300  
 Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser Arg His Pro Glu Lys Ala  
 305 310 315 320  
 Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu  
 325 330 335  
 Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu  
 340 345 350  
 Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly  
 355 360 365  
 Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp Asn Ile  
 370 375 380  
 Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro Gln His  
 385 390 395 400  
 Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp  
 405 410 415  
 Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro  
 420 425 430  
 Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys Asn Ala Gly Glu Thr  
 435 440 445  
 Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Lys Ile Gly Ser  
 450 455 460  
 Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp Gly Ser Val Ser Ile Tyr

**465**

**470**

**475**

**480**

5

<210> 6

<211> 485

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

10

<400> 6

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

Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr  
 210 215 220  
 Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His  
 225 230 235 240  
 Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala  
 245 250 255  
 Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu  
 260 265 270  
 Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Gln Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val  
 275 280 285  
 Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly  
 290 295 300  
 Gly Asn Tyr Asp Met Arg Asn Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg  
 305 310 315 320  
 His Pro Ser His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro  
 325 330 335  
 Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 340 345 350  
 Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr  
 355 360 365  
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Arg Ser  
 370 375 380  
 Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Lys  
 385 390 395 400  
 Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
 405 410 415  
 Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp  
 420 425 430  
 Gly Ala Gly Gly Ser Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly  
 435 440 445

Gln Val Trp Ser Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile  
450 455 460

Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
465 470 475 480

Ile Trp Val Asn Lys  
485

<210> 7

<211> 485

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 7

5

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala  
 20 25 30  
 Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp  
 35 40 45  
 Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
 50 55 60  
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly  
 85 90 95  
 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp  
 100 105 110  
 Gly Thr Glu Ile Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn  
 115 120 125  
 Gln Glu Thr Ser Gly Glu Tyr Ala Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp  
 130 135 140  
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Asn His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
 145 150 155 160  
 His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys  
 165 170 175

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

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

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

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

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

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

Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val  
 275 280 285

Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly  
 290 295 300

Gly Tyr Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys  
 305 310 315 320

His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro  
 325 330 335

Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Gln Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 340 345 350

Tyr Ala Leu Val Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr  
 355 360 365

Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser  
 370 375 380

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

Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
 405 410 415

Gly Asn Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp  
 420 425 430

Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Asn Lys Ala Gly  
 435 440 445

Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile  
 450 455 460

Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
 465 470 475 480

Val Trp Val Lys Gln  
 485

- <210> 8
- 5 <211> 485
- <212> PRT
- <213> Bacillus sp.
- <400> 8

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ser  
 20 25 30  
 Asn Leu Arg Asn Arg Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Trp  
 35 40 45  
 Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
 50 55 60  
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Ser Gln Leu Glu Ser Ala Ile His Ala Leu Lys Asn Asn Gly  
 85 90 95  
 Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp  
 100 105 110  
 Ala Thr Glu Asn Val Leu Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn  
 115 120 125  
 Gln Glu Ile Ser Gly Asp Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp  
 130 135 140

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

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

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

Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met  
 195 200 205

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

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

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

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

Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val  
 275 280 285

Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly  
 290 295 300

Gly Asn Tyr Asp Met Ala Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Gln Lys  
 305 310 315 320

His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro  
 325 330 335

Gly Glu Ser Leu Glu Ser Phe Val Gln Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 340 345 350

Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr  
 355 360 365

Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Ser Val Pro Ala Met Lys Ala  
 370 375 380

Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Asn Phe Ala Tyr Gly Thr  
 385 390 395 400

Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
 405 410 415

Gly Asn Thr Thr His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp  
 420 425 430

Gly Pro Gly Gly Glu Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Asn Lys Ala Gly  
 435 440 445

Gln Val Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Lys Pro Gly Thr Val Thr Ile  
 450 455 460

Asn Ala Asp Gly Trp Ala Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
 465 470 475 480

Ile Trp Val Lys Arg  
 485

5

- <210> 9
- <211> 1455
- <212> ADN
- <213> Bacillus sp.
- <400> 9

ES 2 551 029 T3

catcataatg gaacaantgg tactatgatg caatattttog aatggtatth gccaaatgac 60  
 gggaatcatt ggaacaggtt gagggatgac gcagctaact taaagagtaa agggataaca 120  
 gctgtatgga toccacctgc atggaagggg acttcccaga atgatgtagg ttatggagcc 180  
 tatgatttat atgatcttgg agagtttaac cagaagggga cggttcgtac aaaatatgga 240  
 acacgcaacc agctacaggc tgcggtgacc tctttaaaaa ataacggcat tcaggtatat 300  
 ggtgatgtcg tcatgaatca taaaggtgga gcagatggta cggaaattgt aatgaggta 360  
 gaagtgaatc ggagcaacog aaaccaggaa acctcaggag agtatgcaat aqaagcgtgg 420  
 acaaagtttg attttccctgg aagaggaaat aaccattcca gctttaagtg gcgctggtat 480  
 cttttgatg ggacagattg ggatcagtoa cggcagcttc aaaacaaaat atataaattc 540  
 aggggaacag gcaaggcotg ggactgggaa gtcgatacag agaatggcaa ctatgactat 600  
 cttatgtatg cagaogtggg tatggatcac ccagaagtaa tacatgaact tagaaactgg 660  
 ggagtgtggt atacgaatac actgaacott gatggattta gaatagatgc agtgaacat 720  
 ataaaatata gctttacgag agattggott acacatgtgc gtaacaccac aggtaaacca 780  
 atgtttgacg tggctgagtt ttggaaaaat gacctgggtg caattgaaaa ctatttgaat 840  
 aaaacaagtt ggaatcactc ggtgtttgat gttcctctcc actataattt gtacaatgca 900  
 tctaatacgc gtggttatta tgatatgaga aatattttaa atggttctgt ggtgcaaaaa 960  
  
 catccaacac atgcogttac ttttgttgat aaccatgatt ctacagcccg ggaagcattg 1020  
 gaatcctttg ttcaacaatg gtttaaacca cttgcatatg cattggttct gacaagggaa 1080  
 caaggttato cttccgtatt ttatggggat tactacggta toccaacca tgggtttccg 1140  
 gctatgaaat ctaaaataga ccctcttctg caggcaogtc aaacttttgc ctatggtacg 1200  
 cagcatgatt actttgatca tcatgatatt atcggttgga caagagaggg aatagctcc 1260  
 catccaatt caggccttgc caccattatg tcagatggtc cagggtgtaa caaatggatg 1320  
 tatgtgggga aaaatasagc gggacaagtt tggagagata ttaccggaaa taggacagcc 1380  
 accgtcacia ttaatgcaga cggatgggtt aatttctctg ttaatggagg gtcggtttcg 1440  
 gtttgggtga agcaa 1455

5

- <210> 10
- <211> 1455
- <212> ADN
- <213> Bacillus sp.

10

- <400> 10

ES 2 551 029 T3

catcataatg ggacaaatgg gacgatgatg caatactttg aatggcactt gcoataatgat 60  
 gggaaatcaact ggaatagatt aagagatgat gctagtaatc taagaaatag aggtataacc 120  
 gctatttggg ttcgcctgc ctggaaaggg acttcgcaaa atgatgtggg gtatggagcc 180  
 tatgatcttt atgatttagg ggaatttaat caaaagggga cggttcgtac taagtatggg 240  
 acacgtagtc aattggagtc tgccatccat gctttaaaga ataatggcgt tcaagtttat 300  
 ggggatgtag tgatgaacca taaaggagga gctgatgcta cagaaaacgt tcttgcgtgc 360  
 gaggtgaatc caaataaccg gaatcaagaa atatctgggg actacacaat tgaggcttgg 420  
 actaagtttg attttccagg gaggggtaat acatactcag actttaaatg gcgttgggat 480  
 catttcgatg gtgtagattg ggatcaatca cgacaattcc aaaatcgtat ctacaaattc 540  
 cgaggtgatg gtaaggcatg ggattgggaa gtagattcgg aaaatggaaa ttatgattat 600  
 ttaatgtatg cagatgtaga tatggatcat coggaggtag taaatgagct tagaagatgg 660  
 ggagaatggg atacaaatac attaaatctt gatggattta ggatcogatgc ggtgagcat 720  
 attaaatata gctttacacg tgattgggtg acccatgtaa gaaacgcaac gggaaagaa 780  
 atgtttgctg ttgctgaatt ttggaaaaat gatttaggtg ccttggagaa ctatttaaat 840  
 aaacaaact ggaatcattc tgcctttgat gtcccccttc attataatct ttataacggc 900  
 tcaaatagtg gaggcaacta tgacatggca aaacttotta atggaacggg tgttcaaaag 960  
 catccaatgc atgccgtaac tttgtggat aatcacgatt ctcaacctgg ggaatcatta 1020  
 gaaatcattg tacaagaatg gtttaagcca ottgcttatg cgttatattt aacaagagaa 1080  
 caaggotato cctctgtctt ctatggtagc taactatggaa ttccaacaca tagtgtccca 1140  
 gcaatgaaag ccaagattga tccaatotta gaggcgcgtc aaaattttgc atatgaca 1200  
 caacatgatt attttgacca tcataatata atcggatgga caogtgaagg aaataccacg 1260  
 catccaatt caggacttgc gactatcatg tcggatgggc cagggggaga gaaatggatg 1320  
 tacgtagggc aaataaagc aggtcaagtt tggcatgaca taactggaaa taaaccagga 1380  
 acagttacga tcaatgcaga tggatgggct aatttttcag taaatggagg atctgtttcc 1440  
 atttgggtga aacga 1455

5

- <210> 11
- <211> 1548
- <212> ADN
- <213> Bacillus stearothermophilus

10

- <400> 11

```

gccgcaccgt ttaacggcac catgatgcag tattttgaat ggtacttgcc ggatgatggc      60
acgttatgga ccaaagtggc caatgaagcc aacaacttat ccagccttgg catcacccgt      120
ctttggtgctc cgcgccgtta caaaggaaca agccgcagcg acgtagggtc cggagtatac      180
gacttgatag acctcggcga attcaatcaa aaagggacpg tccgcacaaa atacggaaca      240
aaagotcaat atcttcaagc cattcaagcc gcccaagccg ctggaatgca agtgtacgcc      300
gatgtcgtgt tcgaccataa agggcgcgct gacggcacgg aatgggtgga cgcctcga      360
gtcaatccgt ccgaccgcaa ccaagaatc tcgggcacct atcaaatcca agcatggaag      420
aaatttgatt ttcccggcg gggcaacacc tactccagct ttaagtggcg ctggtaccat      480
tttgacggcg ttgattggga cgaagccga aaattgagcc gcatttaca attccgccc      540
atcggcaaaag cgtgggattg ggaagtagac aoggaaaacg gaaactatga ctacttaatg      600
tatgccgacc ttgatatgga tcacccgaa gtcgtgaccg agctgaaaaa ctgggggaaa      660
tggtatgtca acacaacgaa cattgatggg ttccggcttg atgocgtcaa gcatattaag      720
ttcagttttt ttctgattg gttgtcgtat gtgccttctc agactggcaa gccctattt      780
accgtcgggg aatattggag ctatgacatc aacaagttgc acaattacat taogaaaaca      840
gacggaacga tgtctttgtt tgatgccccg ttacacaaca aatthtatac cgttccaaa      900
tcagggggcg cattlgatat ggcacggtta atgaccaata ctctcatgaa agatcaaccg      960
acattggccg tcacctcgt tgataatcat gacacogaac ccggccaagc gctgcagtca     1020
tgggtcgacc catggttcaa accgttggct tacgccttta ttotaaactcg gcaggaagga     1080
taccggtcgc tcttttatgg tgaotattat ggcattccac aatataacat tccttcgctg     1140
aaaagcaaaa tcgatccgct cctcatcgcg cgcagggatt atgottacgg aacgcaacat     1200
gattatcttg atcactccga catcatcggg tggacaaggg aagggggcac tgaaaaacca     1260
ggatccggac tggccgcact gatcaccgat gggccgggag gaagcaaatg gatgtacgtt     1320
ggcaacaac acgctggaaa agtgttotat gaocctaccg gcaaccggag tgacaccgto     1380
accatcaaca gtgatggatg gggggaatto aaagtcaatg gcggttcggg ttcggtttgg     1440
gttcttagaa aaacgaccgt ttctaccatc gctogggcga tcacaaoccg accgtggact     1500
ggtgaattcg tccgttggac cgaaccacgg ttggtggcat ggccttga     1548

```

5

- <210> 12
- <211> 1920
- <212>ADN
- <213> Bacillus licheniformis

10

- <220>
- <221> misc\_feature

<222> (421)..(1872)

<223> CDS

<400> 12

5

```

cggaagattg gaagtacaaa aataagcaaa agattgtcaa tcatgtcatg agccatgcgg      60
gagacggaaa aatogtotta atgcacgata tttatgcaac gttoqcagat gctgotgaag      120
agattattaa aaagctgaaa gcaaaaaggct atcaattggt aactgtatct cagcttgaag      180
aagtgaagaa gcagagaggc tattgaataa atgagttaga ggcacatctc ggcgcttttc      240
ttttggaaga aatatagggg aaatgggtac ttgttaaaaa ttcggaatat ttatacaaca      300
tcatatgttt cacattgaaa ggggaggaga atcatgaaac aacaaaaacg gctttacgcc      360
cgattgctga cgctgttatt tgcgctcctc ttottgctgc ctcatctctc agcagcggcg      420
gcaaatctta atgggacgct gatgcagtat tttgaatggt acatgcccaa tqacggccaa      480
cattggaggc gtttgcaaaa cgactcggca tatttggctg aacacggtat tactgccgtc      540
tggattcccc cggcatataa gggaacgagc caagcggatg tgggctacgg tgcttacgac      600
ctttatgatt taggggagtt tcatcaaaaa gggacggctc ggacaaaagta cggcacaana      660
ggagagctgc aatctgogat caaaagtctt cattcccgcg acattaacgt ttacggggat      720
gtggtcatca accacaaagg cggcgtctgat gcgaccgaag atgtaaccgc ggttgaagtc      780
gatcccgtg accgcaaccg cgtaatttca ggagaacacc taattaaagc ctggacacat      840
tttcattttc cggggcgcgg cagcacatac agcgatttta aatggcattg gtaccatttt      900

```

ES 2 551 029 T3

gacggaaccg attgggacga gtoccgaaag ctgaaocgca tctataagtt tcaaggaaag 960  
 gcttgggatt gggaaagtcc caatgaaaac ggcaactatg attatttgat gtatgccgac 1020  
 atcgattatg accatcctga tgtcgcagca gaaattaaga gatggggcac ttggtatgcc 1080  
 aatgaactgc aattggacgg tttcogtctt gatgctgtca aacacattaa attttctttt 1140  
 ttgccccgatt gggttaatca tgtcagggaa aaaacgggga aggaaatggt tacggtagct 1200  
 gaatattggc agaatgactt gggcgcgctg gaaaactatt tgaacaaaac aaattttaat 1260  
 cattcagtggt ttgacgtgcc gcttcattat cagttocatg ctgcatogac acagggaggc 1320  
 ggctatgata tgaggaaatt gctgaacggt acggtcgttt ccaagcatcc gttgaaatcg 1380  
 gttacatttg tcgataacca tgatacacag cgggggcaat cgcttgagtc gactgtccaa 1440  
 acatggttta agccgcttgc ttacgctttt attotcacia gggaaatctgg ataocctcag 1500  
 gttttctacg gggatatgta cgggacgaaa ggagactccc agcgcgaaat tccctgccttg 1560  
 aaacacaaaa ttgaaccgat cttaaaagcg agaaaacagt atgcgtacgg agcacagcat 1620  
 gattatttcg accaccatga cattgtoggc tggacaaggg aaggcgacag ctccggttgc 1680  
 aattcaggtt tggcggcatt aataacagac ggaccocggtg gggcaaagcg aatgtatgtc 1740  
 ggccggcaaa acgcccgtga gacatggcat gacattaccg gaaacogtto ggagccggtt 1800  
 gtcacatcaatt cggaaaggctg gggagagttt cacgtaaacg gcgggtcgggt ttcaatttat 1860  
 gttcaaaagt agaagagcag agaggacgga tttcctgaag gaaatcogtt tttttatttt 1920

<210> 13  
 <211> 1455  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus sp.

<400> 13

ES 2 551 029 T3

catcataatg gaacaantgg tactatgatg caatatttctg aatqgtattt gccaaatgac 60  
 gggaaatcatt ggaacaggtt gagggatgac gcagctaact taaagagtaa agggataaca 120  
 gctgtatgga tcccacctgc atggaagggg acttoccaga atgatgtagg ttatggagcc 180  
 tatgatttat atgatcttgg agagttaa acagaagggga oggttcgtac aaaatatgga 240  
 acacgcaacc agctacaggc tgcggtgacc tctttaaaaa ataacggcat tcaggtatat 300  
 ggtgatgtcg tcatgaatca taaaggtgga gcagatggtt cggaaattgt aatgcggtt 360  
 gaagtgaatc ggagcaaccg aaaccaggaa acctcaggag agtatgcaat agaagcgtgg 420  
 acaasgtttg attttcttgg aagaggaat aaccattcca gctttaagtg gcgctggtat 480  
 cttttgatg ggacagattg ggatcagtca cggcagcttc aaaacaaaat atataaattc 540  
 aggggaacag gcaaggcctg ggactgggaa gtogatacag agaatggcaa ctatgactat 600  
 cttatgtatg cagacgtgga tatggatcac ccagsagtaa tscatgaaot tagaaactgg 660  
 ggagtgtggt atacgaatc actgaacctt gatggattta gaatagatgc agtgaacat 720  
 ataaaatata gctttaocgag agattggctt acacatgtgc gtaacaccac aggtaaacca 780  
 atgtttgcag tggctgagtt ttggaaaaat gaccttggtg caattgaaaa ctatttgaat 840  
 aaaacaagtt ggaatcactc ggtgtttgat gttcctctcc actataattt gtacaatgca 900  
 tctaatacgc gtggttatta tgatagaga aatattttaa atggttctgt ggtgcaaaaa 960  
 catccaacac atgccgttac ttttgttgat aaccatgatt ctacagcccg ggaagcattg 1020  
 gaatcctttg ttcaacaatg gtttaacca ottgcatatg cattggttct gacaagggaa 1080  
 caaggttato ctteogtatt ttatggggat tactaocgta tcccaacca tgggttctcg 1140  
 gctatgaaat ctaaaataga cctcttctg caggcacgtc aaacttttgc ctatggtacg 1200  
 cagcatgatt accttgatca tcatgatatt atcggttgga caagagaggg aatagctcc 1260  
 catccaatt caggccttgc caccattatg tcagatggtc caggtggtaa caaatggatg 1320  
 tatgtgggga aaataaagc gggacaagtt tggagagata ttaccggaaa taggacaggc 1380  
 accgtcacia ttaatgcaga cggatggggt aatttctctg ttaatggagg gtcogttctg 1440  
 gtttgggtga agcaa 1455

5

- <210> 14
- <211> 1455
- <212> ADN
- <213> Bacillus sp.

10

- <400> 14

catcataatg ggacaastgg gacgatgatg caatactttg aatggcaott goctaattgat 60  
 gggaatcact ggaatagatt aagagatgat gctagtaatc taagaatatag aggtataacc 120  
 gctatattgga ttccgcctgc ctggaaaggg acttcgcaa atgatgtggg gtatggagcc 180  
 tatgatcttt atgatttagg ggaatttaat caaagggga cggttcgtac taagtatggg 240  
 acacgtagtc aattggagtc tgcocatccat gctttaaaga ataatggcgt tcaagtttat 300  
 ggggatgtag tgatgaacca taaaggagga gctgatgcta cagaaaacgt tcttgctgtc 360  
 gaggtgaatc caaataaccg gaatcaagaa atatctgggg actacacaat tgaggcttgg 420  
 actaagtttg atttccagg gaggggtaat acatactcag actttaaatg gcgttggtat 480  
 catttcgatg gtgtagattg ggatcaatca cgacaattoc aaaatcgtat ctacaaattc 540  
 cgaggtgatg glaaggcatg ggattgggaa gtagattcgg aaaatggaaa ttatgattat 600  
 ttaatgtatg cagatgtaga tatggatcat ccggaggtag taaatgagct tagaagatgg 660  
 ggagaatggt atacaaatac attaaatcct gatggattta ggatcogatgc ggtgaagcat 720  
 attaaatata gctttacacg tgattgggtg acccatgtaa gaaacgcac gggaaaagaa 780  
 atgtttgctg ttgctgaatt ttggaaaaat gatthaggtg ccttggagaa ctatttaaat 840  
 aaaacaaact ggaatcattc tgtctttgat gtcccccttc attataatct ttataacgcg 900  
 tcaaatagtg gaggaacta tgacatggca aaacttctta atggaaacgt tgttcaaaaag 960  
 catccaatgc atgccgtaac ttttgtggat aatcaogatt ctcaacctgg ggaatcatta 1020  
 gaatcatttg tacaagaatg gtttaagcca cttgcttatg cgcttatttt aacaagagaa 1080  
 caaggctatc cctctgtctt ctatggtgac tactatggaa ttccaacaca tagtgtcca 1140  
 gcaatgaaag ccaagattga tccaatotta gagggcgcgc aaaattttgc atatggaaca 1200  
 caacatgatt attttgacca tcataatata atcggatgga cacgtgaagg aaataccacg 1260  
 catcccaatt caggacttgc gactatcatg tcggatgggc cagggggaga gaaatggatg 1320  
 tacgtagggc aaataaagc aggtcaagtt tggcatgaca taactggaaa taaaccagga 1380  
 acagttaoga tcaatgcaga tggatgggct aatttttcag taaatggagg atctgtttoc 1440  
 atttgggtga aacga 1455

5

- <210> 15
- <211> 74
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

10

- <220>
- <223> Cebador RSERI
- <220>
- <221> misc\_feature

ES 2 551 029 T3

<222> (21)..(62)

<223> Los nucleótidos de las posiciones 21-62 se sintetizaron como: 3122343222 4333313344 4233423242 2122112433 43, donde 1:(97%A, 1%T, 1%C, 1%G); 2:(97%T, 1%A, 1%C, 1%G); 3:(97%C, 1%A, 1%T, 1%G); y 4: (97%G, 1%A, 1%T, 1%C).

5

<400> 15

```
gcgttttgcc ggcgcacata nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn      50
nncaaaacctg aatt                                             74
```

10

<210> 16  
<211> 122  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial

15

<220>  
<223> Cebador RSERII

<220>  
<221> misc\_feature

20

<222> (63)..(104)  
<223> Los nucleótidos de las posiciones 73-114 se sintetizaron como: 31113324 1122243113 3414324234 3322333224 2331, donde 1:(97%A, 1%T, 1%C, 1%G); 2:(97%T, 1%A, 1%C, 1%G); 3:(97%C, 1%A, 1%T, 1%G); y 4:(97%G, 1%A, 1%T, 1%C).

25

```
<400> 16
gcgttttgcc ggcgcacata cattcgettt gccccaccgg gtccgtctgt tattaatgcc      60
gennnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnngccgac aatgtcatgg    120
tg                                             122
```

<210> 17  
<211> 78  
<212> DNA  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Cebador RSERIII

30

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (19)..(60)  
<223> Los nucleótidos de las posiciones 19-60 se sintetizaron como: 43 3413112423 1244244234 1112112312 4324243233, como 1:(97%A, 1%T, 1%C, 1%G); 2:(97%T, 1%A, 1%C, 1%G); 3: (97%C, 1%A, 1%T, 1%G); y 4:(97%G, 1%A, 1%T, 1%C).

40

<400>

17

gtcgccttcc ctgtgccann nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

gtacgcatac tgttttct 78

5 <210> 18  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cebador FSERIII

<400> 18  
 tggacaaggg aaggcgacag 20

15 <210> 19  
 <211> 81  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Cebador RSERV

25 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (19)..(60)  
 <223> Los nucleótidos de las posiciones 19-60 se sintetizaron como: 42 4222311443 1441122234 3432444142  
 3233222342, donde 1:(97%A, 1%T, 1%C, 1%G); 2:(97%T, 1%A, 1%C, 1%G); 3: (97%C, 1%A, 1%T, 1%G); y  
 4:(97%G, 1%A, 1%T, 1%C).

<400> 19  
 taagetcggt tcaattttnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60

30 cccgtacata tccccgtaga a 81

<210> 20  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Cebador

<400> 20  
 aaaattgaac cgatctta 18

40 <210> 21  
 <211> 107  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Cebador FSERVII

ES 2 551 029 T3

<220>

<221> misc\_feature

<222> (19)..(60)

5 <223> Los nucleótidos de las posiciones 19-60 se sintetizaron como: 43 3413112423 1244244234 1112112312  
4324243233, donde 1:(97%A, 1%T, 1%C, 1%G); 2:(97%T, 1%A, 1%C, 1%G); 3: (97%C, 1%A, 1%T, 1%G); y  
4:(97%G, 1%A, 1%T, 1%C).

<400> 21

**ttccatgctg catcgacaca gggaggcggc tatgatatga ggaattgct gaannnnnnn 60**

10 **nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnntgtcg ataacca 107**

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador RSERVII

20 <400> 22

tgatgatgca gcatggaa 18

<210> 23

<211> 80

25 <212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador FSERIX

30

<220>

<221> misc\_feature

<222> (21)..(62)

35 <223> Los nucleótidos de las posiciones 21-62 se sintetizaron como: 4322432213 4322221223 2313114441  
1232441213 33, donde1:(97%A, 1%T, 1%C, 1%G); 2:(97%T, 1%A, 1%C, 1%G); 3:(97%C, 1%A, 1%T, 1%G); y  
4:(97%G, 1%A, 1%T, 1%C).

<400> 23

**gtccaaacat ggtttaagcc nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 60**

40 **nntcaggttt tctacgggga 80**

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador RSERIX  
  
 <400> 24  
 ggcttaaacc atgtttggac 20  
 5  
  
 <210> 25  
 <211> 0  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 10  
  
 <220>  
 <223> No hay SEC ID N°: 25  
  
 <400> 25  
 000  
 15  
  
 <210> 26  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
  
 <220>  
 <223> Cebador 1B  
  
 <400> 26  
 cgattgctga cgctgttatt tgcg 24  
 25  
  
 <210> 27  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
  
 <220>  
 <223> Cebador #63  
 35  
  
 <400> 27  
 ctatctttga acataaattg aaacc 25  
  
 <210> 28  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
  
 <220>  
 <223> Cebador hacia adelante 1  
 45  
  
 <400> 28  
 gacctgcagt caggcaacta 20

<210> 29  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador inverso 1  
  
 10 <400> 29  
 tagagtcgac ctgcaggcat 20  
  
 <210> 30  
 <211> 20  
 15 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Cebador directo 2  
 20  
  
 <400> 30  
 gacctgcagt caggcaacta 20  
  
 <210> 31  
 25 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 30 <223> Cebador inverso  
  
 <400> 31  
 tagagtcgac ctgcaggcat 20  
  
 35 <210> 32  
 <211> 2084  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus amyloliquefaciens  
  
 40 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (343)..(1794)  
 <223> CDS  
  
 45 <400> 32

gccccgcaca tacgaaaaga ctggctgaaa acattgagcc ttgatgact gatgatttgg 60  
ctgaagaagt ggatcgattg ttgagaaaa gaagaagacc ataaaatac cttgtctgtc 120  
atcagacagg gtatttttta tgctgtccag actgtccgct gtgtaaaaat aaggaataaa 180  
ggggggttgt tattatttta ctgatatgta aatataaatt tgtataagaa aatgagaggg 240  
agaggaaaca tgattcaaaa acgaaagcgg acagtttctg tcagacttgt gottatgtgc 300  
acgctgttat ttgtcagttt gccgattaca aaaacatcag ccgtaaatgg cacgctgatg 360  
cagtattttg aatggtatac gccgacgcac ggccagcatt ggaacgatt gcagaatgat 420  
goggaacatt tatcggatat cggaaactcact gccgtctgga ttctccccc atacaaagga 480  
ttgagccaat ccgataacgg atacggacct tatgatttgt atgatttagg agaattccag 540  
caaaaaggga cggtcagaac gaatacggc acaaaatcag agcttcaaga tgcgatcggc 600  
tcaactgcatt cccggaact ccaagtatac ggagatgtgg ttttgaatca taaggctggt 660  
gctgatgcaa cagaagatgt aactgccgtc gaagtcaatc cggccaatag aatcaggaa 720  
acttcggagg aatatcaaat caaagcgtgg accgattttc gttttccggg ccgtggaaac 780  
acgtacagtg attttaaatg gcattggtat catttgcacg gaggggactg ggatgaatcc 840  
cggaaagatca gccgcacctt taagtctcgt ggggaaggaa aagcgtggga ttgggaagta 900  
tcaagtgaaa acggcaacta tgactattta atgtatgctg atgttgacta cgaccacct 960  
gatgtcgtgg cagagacaaa aaaatgggtt atctggtatg cgaatgaact gtcattagac 1020  
ggcttccgta ttgatgccgc caacatatt aattttcat ttctcgtga ttgggttcag 1080  
gcggtcagac aggcgacggg aaaagaaatg tttacggttg cggagtattg gcagaataat 1140  
gccgggaaac tcgaaaacta cttgaataaa acaagcttta atcaatccgt gtttgatggt 1200  
ccgcttcatt tcaatttaca ggccgcttc tcacaaggag gcggatatga tatgagcgt 1260  
ttgctggacg gtaccgttgt gtccaggcat ccggaasagg cggttacatt tgttgaaat 1320  
catgacacac agccgggaca gtcattggaa tcgacagtcc aaacttggtt taacccgctt 1380  
gcatacgcct ttattttgac aagagaatcc ggttatcctc aggtgttcta tggggatatg 1440

taagggacaa	aagggacato	gocaaaggaa	attccctcac	tgaagataa	tatagagccg	1500
atTTTaaaag	cgcgtaagga	gtacgcatac	gggcccacgc	acgattatat	tgaccaccgg	1560
gatgtgatcg	gatggacgag	ggaagggtgac	agctccgccc	ccaatcagg	tttggccgct	1620
ttaatcacgg	acggaccggg	cggatcaaag	cggatgtatg	cggcctgaa	aatgcccggc	1680
gagacatggt	atgacataac	gggcaaccgt	tcagatactg	taaaatcgg	atctgacggc	1740
tggggagagt	ttcatgtaaa	cgatgggtcc	gtctccattt	atgttcagaa	ataaggtaat	1800
aaaaaaaaac	ctccaagctg	agtgcgggta	tcagcttgga	ggtgcgttta	ttttttcagc	1860
cgtatgacaa	ggtcggcctc	aggtgtgaca	aatacggtat	gctggctgtc	ataggtgaca	1920
aatccggggt	ttgcgcggtt	tggctttttc	acatgtctga	tttttgtata	atcaacaggc	1980
acggagccgg	aatctttcgc	cttggaaaaa	taagcggcga	tcgtagctgc	ttccaatatg	2040
gattgttcat	cgggctcgtc	gcttttaata	acaacgtggg	atcc		2084

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Variante de una alfa-amilasa madre de tipo Termamyl, donde
- (a) la variante comprende una o varias de las siguientes sustituciones: E376K; S417T; A420Q o R; S356A; o Y358F y además K176R+I201F+ H205N utilizando la numeración en SEC ID n°: 4, donde la alfa-amilasa madre de tipo Termamyl tiene un grado de identidad para SEC ID n°: 4 de al menos 80%, y
- 10 (b) la variante tiene actividad de alfa-amilasa y además las variantes tienen y una estabilidad aumentada a pH por debajo de 7.0, y/o a concentraciones de calcio por debajo de 1 mM a temperaturas en el rango de 95°C a 160°C relativamente a la alfa-amilasa madre de tipo Termamyl.
- 15 2. Variante según la reivindicación 1, donde la alfa-amilasa madre tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad para SEC ID n°: 4 de al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, de forma más preferible al menos 95%, incluso de forma más preferible al menos 97%, e incluso de forma más preferible al menos 99%.
3. Constructo de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una variante de alfa-amilasa según la reivindicación 1 o 2.
- 20 4. Vector de expresión recombinante que lleva un constructo de ADN según la reivindicación 3.
5. Célula que comprende un constructo de ADN según la reivindicación 3 o un vector según la reivindicación 4.
- 25 6. Célula según la reivindicación 5 que es un microorganismo, en particular una bacteria o un hongo.
7. Célula según la reivindicación 6, que es 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*.
- 30 8. Composición de detergente que incluye una variante de alfa-amilasa según la reivindicación 1 o 2.
9. Composición de detergente según la reivindicación 8, que adicionalmente comprende otra enzima tal como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, otra enzima amilolítica y/o una celulasa.
- 35 10. Composición para el lavado manual o automático de vajilla que comprende una variante de alfa-amilasa según la reivindicación 1 o 2.
11. Composición de detergente para el lavado de vajilla según la reivindicación 10, que adicionalmente comprende otra enzima tal como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, otra enzima amilolítica y/o una celulasa.
- 40 12. Composición para el lavado manual o automático de ropa que comprende una variante de alfa-amilasa según la reivindicación 1 o 2.
13. Composición para el lavado de ropa según la reivindicación 12, que adicionalmente comprende otra enzima tal como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, una enzima amilolítica y/o una celulasa.
- 45 14. Uso de una variante de alfa-amilasa según la reivindicación 1 o 2 para el lavado y/o el lavado de la vajilla o para desengrasado textil o para licuefacción de almidón.

	<b>1</b>				<b>50</b>
1	HHNGTNGTMM	QYFEWELPND	GNHWNRLRDD	ASNLRNRGIT	AIWIPPANRG
2	. . . . .	NGINGTMM	QYFEWYLPND	GNHWNRLRSD	ASNLDKKGIS
3	HHNGTNGTMM	QYFEWYLPND	GNHWNRLRDD	AANLKSNGIT	AVWIPPANRG
4	. . . . .	VNGTLM	QYFEWYTPND	GQHWRRLQND	AEHLSDIGIT
5	. . . . .	ANLNGTLM	QYFEWYMPND	GQHWRRLQND	SAYLAENGIT
6	. . . . .	AAPFNGTMM	QYFEWYLPDD	GTLWTKVANE	ANNLSSLGIT
	<b>51</b>				<b>100</b>
1	TSQNDVGYGA	YDLYDLGEFN	OKGTVRTKYG	TRSOLESAIH	ALKNNGVQVY
2	ASQNDVGYGA	YDLYDLGEFN	OKGTIRTKYG	TRNQLQAAVN	ALKSNGIOVY
3	TSQNDVGYGA	YDLYDLGEFN	OKGTVRTKYG	TRNQLQAAVT	SLKNGIOVY
4	LSQSDNGYGF	YDLYDLGEFQ	OKGTVRTKYG	TKSELODAIG	SLHSRNVQVY
5	TSQADVGYGA	YDLYDLGEFH	OKGTVRTKYG	TKGELQSAIK	SLHSRDINVY
6	TSRSDVGYGV	YDLYDLGEFN	OKGTVRTKYG	TKAQYLOAIO	AAHAAGMOVY
	<b>101</b>				<b>150</b>
1	GDVVMNHKGG	ADATENVLAV	EVNPNNRNQE	ISGDYTIKAW	TKFDFPGRGN
2	GDVVMNHKGG	ADATEMVRAY	EVNPNNRNQE	VSGETYTIKAW	TKFDFPGRGN
3	GDVVMNHKGG	ADGTEIVNAV	EVNRSNRNQE	TSGEYAIKAW	TKFDFPGRGN
4	GDVVLNHKAG	ADATEDVTAV	EVNPNANRNQE	TSEFYQIKAW	TDFRFPGRGN
5	GDVVINHKGG	ADATEDVTAV	EVDPADNRNV	ISGEHLIKAW	THFHFPGRGS
6	ADVVFHDKGG	ADGTEWVDAV	EVNPSDRNQE	ISGTYQIQAW	TKFDFPGRGN
	<b>151</b>				<b>200</b>
1	TYSDFKWRWY	HFDGVDWDQS	RQFQNRYYKF	RGDGKAWDWE	VDSNGNYDY
2	THSNFKWRWY	HFDGVDWDQS	RKLNRYKYF	RGDGKAWDWE	VDTEGNYDY
3	NHSSFKWRWY	HFDGTDWDQS	RQLQNKYYKF	RGTGKAWDWE	VDTEGNYDY
4	TYSDFKWRWY	HFDGADWDES	RKI . SRIYKF	RGEGKAWDWE	VDSNGNYDY
5	TYSDFKWRWY	HFDGTDWDES	RKL . NRIYKF	. . QGKAWDWE	VSNENGYDY
6	TYSSFKWRWY	HFDGVDWDES	RKL . SRIYKF	RGIGKAWDWE	VDTEGNYDY

Fig. 1

	201				250
1	LMYADVDMDH	PEVVNELRRW	GEWYTNLNL	DGFRIDAVKH	IKYSFTRDHL
2	LMYADIDMDH	PEVVNELRNW	GVWYTNLGL	DGFRIDAVKH	IKYSFTRDWS
3	LMYADVDMDH	PEVIHELNRW	GVWYTNLNL	DGFRIDAVKH	IKYSFTRDNL
4	LMYADVVDYDH	PDVVAETKKW	GIWYANELSL	DGFRIDAARKH	IKFSFLRDWV
5	LMYADIDYDH	PDVAAEIKRW	GTWYANELQL	DGFRILDAVKH	IKFSFLRDWV
6	LMYADLDMDH	PEVVTELKNW	GKWYVNTTNI	DGFRILDAVKH	IKFSFFPDWL
	251				300
1	THVRNATGKE	MFAVAEFWKN	DLGAIENYLN	KTNWNHSVFD	VPLHYNLYNA
2	IHVRSATGKN	MFAVAEFWKN	DLGAIENYLN	KTNWNHSVFD	VPLHYNFYNA
3	THVRNTTGKP	MFAVAEFWKN	DLGAIENYLN	KTSWNHSAFD	VPLHYNLYNA
4	QAVRQATGKE	MFTVAEYWQN	NAGKLENYLN	KTSFNQSVFD	VPLHFNLOAA
5	NHVREKTGKE	MFTVAEYWQN	DLGAIENYLN	KTNFNHSVFD	VPLHYQFHA
6	SYVRQOTGKP	LFTVGEYWSY	DINKLENYIT	KTDGTMSLFD	APLHNKPYTA
	301				350
1	SNSGGNYDMA	KLLNGTVVQK	HPMHAUTFVD	NHDSQPGESL	ESFVQEFWFKP
2	SKSGGNYDMR	QIFNGTVVQR	HPMHAUTFVD	NHDSQPERAL	ESFVEEWFVKP
3	SNSGGYYDMR	NILNGSVVQK	HPTHAVTFVD	NHDSQPGCAL	ESFVQQWFVKP
4	SSQGGGYDMR	RLLDGTVVER	HPEKAVTFVE	NHDTQPGQSL	ESTVQTFWFKP
5	STQGGGYDMR	KLLNGTVVSK	HPLKSVTFVD	NHDTQPGQSL	ESTVQTFWFKP
6	SKSGGAFDMR	TLMTNTLMKD	QPTLAVTFVD	NHDTEPGQAL	QSWVDPWFVKP
	351				400
1	LAYALILTRE	QGYPVVFYGD	YGIPTHS..	.VPAMKAKID	PILEARQNTFA
2	LAYALTLTRE	QGYPVVFYGD	YGIPTHG..	.VPAMKSKID	PILEARQKYA
3	LAYALVLTRE	QGYPVVFYGD	YGIPTHG..	.VPAMKSKID	PLLOARQTFP
4	LAYAFILTRE	SGYPQVVFYGD	MYGTKGTSPK	EIPSLKDNIE	PILKARKEYA
5	LAYAFILTRE	SGYPQVVFYGD	MYGTKGDSOR	EIPALKEKIE	PILKARKOYA
6	LAYAFILTRQ	EGYPCVVFYGD	YGIPOXN..	.IPSLKSKID	PLLIARRDYA
	401				450
1	YGTQHDYFDH	HNIIGWTREG	NTHPNSGLA	TIMSDGPGGE	KWMYVGQNTKA
2	YGRON.....	.....	.....	.....	.....
3	YGTQHDYFDH	HDIIGWTREG	NSSHNSGLA	TIMSDGPGGN	KWMYVGKNTKA
4	YGPQHDYIDH	PDVIGWTREG	DSSAAKSGLA	ALITDGPGGS	KRMYAGLKNA
5	YGACHDYFDH	EDIVGWTREG	DSSVANSGLA	ALITDGPGGA	KRMYVGRONA
6	YGTQHDYLDH	SDIIGWTREG	GTEKPGSGLA	ALITDGPGGS	KWMYVGKQHA

Fig. 1 (continuación)

	451				500
1	GQVWHDITGN	KPGTVTINAD	GWANFSVNGG	SVSIWKR..	.....
2	.....	.....	.....	.....	.....
3	GQVWRDITGN	RTGTVTINAD	GWGNFSVNGG	SVSVWVKQ..	.....
4	GETWYDITGN	RSDFVKIGSD	GWGEFHVNDG	SVSIYVQ..	.....
5	GETWHDITGN	RSEFVINSE	GWGEFHVNGG	SVSIYVQR..	.....
6	GKVFYDLTGN	RSDFVTINSD	GWGEFKVNGG	SVSVWVPRKT	TVSTIARPI
	501		519		
1	.....	.....	.....	.....	.....
2	.....	.....	.....	.....	.....
3	.....	.....	.....	.....	.....
4	.....	.....	.....	.....	.....
5	.....	.....	.....	.....	.....
6	TRPWTGEFVR	WTEPRLVAW			

Fig. 1 (continuación)

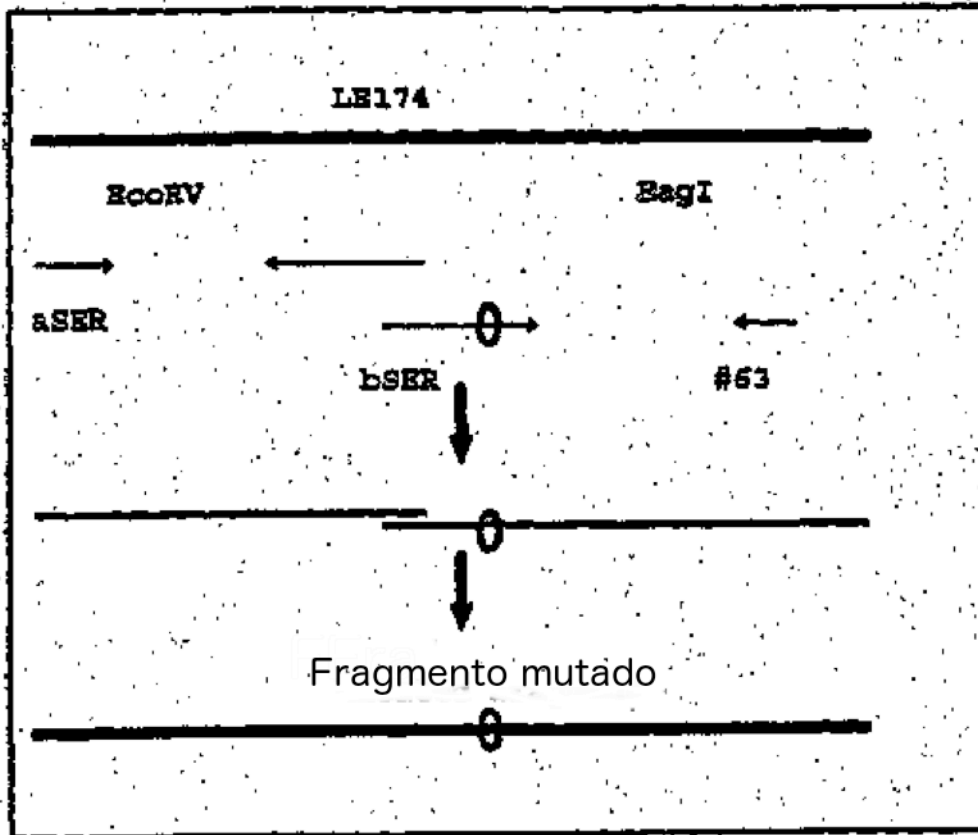


Fig. 2