



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 329 954**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 15/56 (2006.01)
C12N 9/28 (2006.01)
C11D 9/40 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **97924585 .9**
⑨6 Fecha de presentación : **06.05.1997**
⑨7 Número de publicación de la solicitud: **0927259**
⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **07.07.1999**

⑤4 Título: **α -amilasas modificadas que tienen alteradas las propiedades de unión al calcio.**

③0 Prioridad: **14.05.1996 US 645971**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.12.2009

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.12.2009

⑦3 Titular/es: **GENENCOR INTERNATIONAL, Inc.**
4 Cambridge Place, 1870 South Winton Road
Rochester, New York 14618, US

⑦2 Inventor/es: **Bott, Richard R. y**
Shaw, Andrew

⑦4 Agente: **Ungría López, Javier**

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

α -amilasas modificadas que tienen alteradas las propiedades de unión al calcio.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a α -amilasas que tienen alteradas las propiedades de unión al calcio. Particularmente, la presente invención se refiere a nuevas enzimas α -amilasas que tienen modificaciones en las mismas, por ejemplo mutaciones puntuales, que están destinadas a alterar la unión del calcio en un sitio de unión al calcio previamente desconocido en la molécula. Alterando las propiedades de unión al calcio en este sitio adicional, es posible mejorar la estabilidad de la α -amilasa modificada.

Antecedentes de la invención

Las α -amilasas (α -1,4-glucan-4-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1) hidrolizan enlaces α -1,4 glucosídicos internos del almidón, en gran medida de forma aleatoria, para producir maltodextrinas de menor peso molecular. Las α -amilasas tienen un valor comercial considerable, usándose en las etapas iniciales (licuefacción) del procesamiento del almidón; en la producción de alcohol; como agentes de limpieza en matrices detergentes, y en la industria textil para el desencolado del almidón. Las α -amilasas se producen por una amplia diversidad de microorganismos que incluyen *Bacillus* y *Aspergillus*, produciéndose las amilasas más comerciales a partir de fuentes bacterianas tales como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus stearothermophilus*. En los últimos años, las enzimas preferidas para uso comercial han sido las de *Bacillus licheniformis* debido a su estabilidad térmica y comportamiento, al menos a pH neutros y débilmente alcalinos.

En la patente de Estados Unidos N° 5.322.778, se logró la licuefacción entre pH 4,0 y 6,0 añadiendo a la suspensión de licuefacción un antioxidante tal como bisulfito o una sal del mismo, ácido ascórbico o una sal del mismo, ácido eritórlico o antioxidantes fenólicos tales como hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado o α -tocoferol. De acuerdo con esta patente, debe añadirse bisulfito sódico en una concentración superior a 5 mM.

En la patente de Estados Unidos N° 5.180.669, se logró la licuefacción entre un pH de 5,0 y 6,0 añadiendo ión carbonato en exceso de la cantidad necesaria para tamponar la solución a la suspensión de almidón molido. Debido a un efecto de pH aumentado que se produce con la adición de ión carbonato, la suspensión se neutraliza generalmente añadiendo una fuente de ión hidrógeno, por ejemplo, un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.

En la publicación PCT N° WO 95/10603, se describen variantes de α -amilasa que tienen un comportamiento en el lavado de ropa o vajilla mejorado y comprenden una mutación distinta de una sola mutación en la posición M197 en la α -amilasa de *Bacillus licheniformis*.

En la publicación PCT N° WO 94/02597, se describe una α -amilasa mutante que tiene una estabilidad oxidativa mejorada en la que una o más metioninas se reemplazan por cualquier aminoácido excepto cisteína o metionina.

En la publicación PCT N° WO 94/18314, se describe una α -amilasa mutante que tiene una estabilidad oxidativa mejorada en la que uno o más restos de metionina, triptófano, cisteína, histidina o tirosina están sustituidos por un aminoácido no oxidable.

En la publicación PCT N° WO 91/00353, las características y problemas de comportamiento asociados con la licuefacción con α -amilasa de *Bacillus licheniformis* de tipo silvestre se abordan modificando por ingeniería genética la α -amilasa para incluir las sustituciones específicas Ala-111-Thr, His-133-Tyr y/o Thr-149-Ile.

Diversos investigadores han realizado estudios que usan técnicas de ADN recombinante para explorar qué restos son importantes para la actividad catalítica de las amilasas y/o explorar el efecto de la modificación de determinados aminoácidos dentro del sitio activo de diversas amilasas y glicosilasas (Vihinen *et al.*, J. Biochem., vol. 107, págs. 267-272 (1990); Holm *et al.*, Protein Engineering, vol. 3, págs. 181-191 (1990); Takase *et al.*, Biochemica et Biophysica Acta, vol. 1120, págs. 281-288 (1992); Matsui *et al.*, Febs Letters, vol. 310, págs. 216-218 (1992); Matsui *et al.*, Biochemistry, vol. 33, págs. 451-458 (1992); Sogaard *et al.*, J. Biol. Chem., vol. 268, págs. 22480-22484 (1993); Sogaard *et al.*, Carbohydrate Polymers, vol. 21, págs. 137-146 (1993); Svensson, Plant Mol. Biol., vol. 25, págs. 141-157 (1994); Svensson *et al.*, J. Biotech. vol. 29, págs. 1-37 (1993)). Los investigadores también han estudiado qué restos son importantes para la estabilidad térmica (Suzuki *et al.*, J. Biol. Chem., vol. 264, págs. 18933-18938 (1989); Watanabe *et al.*, Eur. J. Biochem., vol. 226, págs. 277-283 (1994)); y un grupo ha usado tales métodos para introducir mutaciones en diversos restos de histidina en una amilasa de *Bacillus licheniformis*, siendo la razón que la amilasa de *Bacillus licheniformis*, que se sabe que es relativamente termoestable en comparación con otras amilasas de *Bacillus* similares, tiene un exceso de histidinas y, por lo tanto, se sugirió que reemplazar una histidina podría afectar a la termoestabilidad de la enzima. Este trabajo dio como resultado la identificación de mutaciones estabilizantes en el resto de histidina en la posición +133 y en el resto de alanina en la posición +209 (Declerck *et al.*, J. Biol. Chem., vol. 265, págs. 15481-15488 (1990); FR 2 665 178-A1; Joyet *et al.*, Bio/Technology, vol. 10, págs. 1579-1583 (1992)).

Se ha demostrado que las α -amilasas de diferentes organismos muestran una estructura tridimensional similar a pesar de las diferencias considerables en la estructura primaria. La Figura 1 ilustra la estructura de la α -amilasa de

Bacillus licheniformis. Aunque existirá alguna variación interespecie entre las diversas α -amilasas, se cree que los elementos estructurales principales de la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* son representativos de estructuras de α -amilasa en general (véase Brayer *et al.*, Protein Sci., vol. 4, págs. 1730-1742 (1995); Larson *et al.*, J. Mol. Biol., vol. 235, págs. 1560-1584 (1994); Qian *et al.*, J. Mol. Biol., vol. 231, págs. 785-799 (1993)). Por ejemplo, la mutagénesis específica de sitio ha identificado tres carboxilatos invariables y dos histidinas invariables (D231, E261, D328 y H104 y H327 en la α -amilasa de *Bacillus licheniformis*), importantes para la catálisis (Svensson, Plant Mol. Biol., vol. 25, p. 141 (1994)), y se ha propuesto un mecanismo general (Mazuret *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comm., vol. 204, p. 297 (1994)). Los restos encontrados que se cree que están implicados en la unión a calcio y cloruro se han caracterizado y se ha descubierto que están muy conservados entre las diferentes enzimas (véase por ejemplo, Kadziola *et al.*, J. Mol. Biol., vol. 239, p. 104 (1994); Qian *et al.*, anteriormente; Larson *et al.*, anteriormente; Brayer *et al.*, anteriormente; Machius *et al.*, J. Mol. Biol., vol. 246, págs. 545-559 (1995); y Boel *et al.*, Biochem., vol. 29, p. 6244 (1990)).

Además, se han encontrado homologías entre casi todas las endo-amilasas secuenciadas hasta ahora, que van desde plantas, mamíferos y bacterias (Nakajima *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 23, págs. 355-360 (1986); Rogers, Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 128, págs. 470-476 (1985); Janecek, Eur. J. Biochem., vol. 224, págs. 519-524 (1994)). Existen cuatro áreas de homología particularmente elevada en determinadas amilasas de *Bacillus*, como se muestra en la Figura 5, en la que las secciones subrayadas designan las áreas de elevada homología. También se han usado alineamientos de secuencias para cartografiar la relación entre endoamilasas de *Bacillus* (Feng *et al.*, J. Molec. Evol., vol. 35, págs. 351-360 (1987)). Como se determinó por Holm *et al.*, Protein Engineering, vol. 3, n° 3, págs. 181-191 (1990) la homología de secuencia relativa entre la amilasa de *Bacillus stearothermophilus* y *Bacillus licheniformis* es de aproximadamente el 66% y entre amilasas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens* es de aproximadamente el 81%. Aunque la homología de secuencia es importante, se reconoce generalmente que la homología estructural también es importante en la comparación de amilasas u otras enzimas.

A pesar de las diferencias en su estructura primaria, se han encontrado similitudes de estructura tridimensional entre diversas α -amilasas (y enzimas amilolíticas relacionadas como ciclodextrina glicosiltransferasas y α -glucosidasas) de organismos diferentes, en la presencia común de un barril- α/β que forma una parte central (dominio A), un motivo de llave griega como un dominio C separado y al menos un dominio adicional, dominio B (Machius *et al.*, anteriormente). Se cree que la unión al sustrato se localiza en una hendidura entre el barril- α/β y el dominio B, comprendiendo varias cadenas β de longitud variable, dependiendo de la especie (Machius *et al.*, anteriormente). También es común un requerimiento de calcio que se cree que mantiene la integridad estructural. Machius describe un sitio de unión al calcio que implica restos que corresponden a N104, D200 y H235 procedentes de la estructura cristalina de una α -amilasa con calcio reducido de *Bacillus licheniformis*. Además de la estructura para *Bacillus licheniformis*, se han determinado las estructuras para *Aspergillus niger* (Brady *et al.*, Acta Crystallog. B, vol. 47, p. 527 (1991)), páncreas de cerdo (Qian *et al.*, J. Mol. Biol., vol. 231, p. 758 (1993); Larson *et al.*, J. Mol. Biol., vol. 235, p. 1560 (1994)), y páncreas humano (Brayer *et al.*, Prot. Sci., vol. 4, p. 1730 (1995)).

A pesar de los avances realizados en la técnica anterior, existe la necesidad de una α -amilasa que tenga un comportamiento alterado, incluyendo la actividad y la estabilidad, para facilitar su uso en la licuefacción del almidón, detergentes para lavado de ropa y vajilla, horneado, desencolado textil y otros usos convencionales de la amilasa. Como las amilasas disponibles en el mercado no son aceptables en muchas condiciones debido a problemas de estabilidad y/o actividad, existe la necesidad de una amilasa que tenga perfiles de comportamiento alterados, y preferiblemente aumentados, en tales condiciones. Por ejemplo, altos niveles de alcalinidad y oxidantes (blanqueantes) asociados con detergentes o las condiciones extremas presentes durante la licuefacción del almidón pueden dar como resultado tanto la desestabilización como la ausencia de actividad de la α -amilasa. Por tanto, sería deseable que puedan lograrse características de comportamiento alteradas tales como termoestabilidad, estabilidad a pH, estabilidad oxidativa o estabilidad al calcio a la vez que también se altera, mantiene o aumenta la actividad enzimática en comparación con la enzima de tipo silvestre o precursora. De manera similar, se sabe que muchas α -amilasas requieren la adición de ión calcio para la estabilidad. Esto es indeseable en algunas aplicaciones debido a los costes de procesamiento aumentados.

Sumario de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar una α -amilasa que tenga perfiles de comportamiento alterados, por ejemplo estabilidad al pH, estabilidad alcalina, estabilidad oxidativa, estabilidad térmica o actividad enzimática alteradas.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una α -amilasa que tenga alteradas las propiedades de unión al calcio, por ejemplo, que tenga una necesidad reducida de calcio añadido para mantener los niveles de actividad.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una α -amilasa que tenga un comportamiento mejorado debido a una estabilidad o actividad a pH bajo aumentada, especialmente durante la licuefacción del almidón.

Otro objeto adicional más de la presente invención es proporcionar una α -amilasa que tenga un comportamiento mejorado en entornos de pH o temperatura elevados o en presencia de oxidantes o blanqueantes.

Otro objeto adicional más de la presente invención es proporcionar una α -amilasa que tenga un comportamiento mejorado en el desencolado u horneado textil debido a una estabilidad o actividad alteradas.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una α -amilasa que comprende un dominio A, un dominio C y un sitio de unión al calcio, en el que el sitio de unión al calcio está asociado con el dominio A y el dominio C y comprende restos de ligando en el dominio A y/o en el dominio C, en el que la α -amilasa tiene una secuencia de aminoácidos de la α -amilasa madura de *Bacillus licheniformis* como se muestra en la Figura 4, pero se modifica para alterar las características del sitio de unión al calcio y por lo tanto alterar el comportamiento de la α -amilasa sustituyendo un resto aminoacídico en una posición correspondiente a G474.

En una realización de composición, la presente invención comprende un ADN que codifica la α -amilasa de la invención. En una realización de composición adicional, la presente invención comprende un vector de expresión que incorpora un ADN que codifica la α -amilasa de acuerdo con la invención, así como una célula hospedadora en la que se ha transformado tal ADN y/o vector de expresión. Una realización de método comprende la expresión de un ADN que codifica la α -amilasa de la invención o un vector de expresión que incorpora tal ADN en una célula hospedadora.

En una realización de composición adicional, la presente invención comprende una composición de detergente de lavado de ropa o vajilla que incorpora la α -amilasa de acuerdo con la invención. En otra realización de la composición, la presente invención comprende una composición desencolante textil que incorpora la α -amilasa de acuerdo con la invención. En otra realización de composición más, la presente invención comprende una composición de licuefacción de almidón que incorpora la α -amilasa de acuerdo con la invención. En otra realización de composición más, la presente invención comprende un adyuvante de horneado que comprende la α -amilasa de acuerdo con la invención.

En una realización de proceso de la presente invención, se proporciona un método de lavado de ropa o vajilla con una composición de detergente lavavajillas que incorpora la α -amilasa de acuerdo con la invención. En otra realización de proceso de la presente invención, se proporciona un método de desencolado de tejidos con una composición que incorpora la α -amilasa de acuerdo con la invención. En otra realización de proceso más de la presente invención, se proporciona un método de licuefacción del almidón con una composición de licuefacción de almidón que incorpora la α -amilasa de acuerdo con la invención. En otra realización de proceso más de la presente invención, se proporciona un método de horneado que comprende añadir una composición que incorpora la α -amilasa de acuerdo con la invención.

Las α -amilasas modificadas de acuerdo con la presente invención proporcionarán varias ventajas importantes cuando se comparan con las α -amilasas de la técnica anterior. Por ejemplo, se encuentra una ventaja en variantes que tienen actividad aumentada a pH bajo y elevadas temperaturas típicas de los métodos habituales de licuefacción del almidón. Se encuentra otra ventaja en variantes que tienen una estabilidad oxidativa y a pH elevado aumentada que facilita su uso en detergentes. Se proporciona otra ventaja más en variantes que tienen una estabilidad mejorada en ausencia o baja concentración de ión calcio. Los objetos y ventajas relacionadas de la presente invención se aclararán más en la siguiente descripción detallada y ejemplos.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la estructura de la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrando el plegamiento de la cadena principal y la localización del sitio de unión al calcio asociado con el dominio A y el dominio B (CaA) y un segundo sitio de unión al calcio asociado con el dominio A y el dominio C (CaB).

La Figura 2 ilustra la vista estereoscópica del mapa de diferencia final 2fo-fc y el Fourier de diferencia anómala Sm en el sitio de unión al calcio asociado con el dominio A y el dominio C de α -amilasa procedente de *Bacillus licheniformis*.

Las Figuras 3A-C ilustran la secuencia de ADN del gen para la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (NCIB 8061) y la secuencia de aminoácidos deducida del producto de la traducción, como se describe por Gray *et al.*, J. Bacteriology, vol. 166, págs. 635-643 (1986).

La Figura 4 ilustra la secuencia de aminoácidos de la enzima α -amilasa madura de *Bacillus licheniformis*.

Las Figuras 5A-B ilustran un alineamiento de las estructuras primarias de tres α -amilasas de *Bacillus*. Gray *et al.*, J. Bacteriology, vol. 166, págs. 635-643 (1986) describen la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (Am-Lich); Takkinen *et al.*, J. Biol. Chem., vol. 258, págs. 1007-1013 (1983) describen la α -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (Am-Amylo) e Ihara *et al.*, J. Biochem., vol. 98, págs. 95-103 (1985) describen la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (Am-Stearo).

Descripción detallada de la invención

El término " α -amilasa" se refiere a una actividad enzimática que escinde o hidroliza el enlace glicosídico α (1-4), por ejemplo, en polímeros de almidón, amilopectina o amilasa. La α -amilasa como se usa en este documento incluye α -amilasas de origen natural así como α -amilasas recombinantes. Las α -amilasas de acuerdo con la presente

invención proceden de una amilasa precursora que tiene la secuencia de aminoácidos como se muestra en la Figura. Preferiblemente, la α -amilasa precursora se produce por un *Bacillus*. Más preferiblemente, la precursora se produce por *Bacillus licheniformis*.

Una α -amilasa “modificada” es una α -amilasa que se ha sometido a modificación genética o química para cambiar sus propiedades bioquímicas, estructurales o físico-químicas. Una “modificación genética” en α -amilasa significa que se ha modificado la secuencia de ADN que codifica una α -amilasa de origen natural o precursora para producir una secuencia de ADN mutante que codifica la sustitución, inserción o delección de uno o más aminoácidos en la secuencia de α -amilasa en comparación con la α -amilasa de origen natural o una α -amilasa precursora.

La expresión “vector de expresión” se refiere a una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que es capaz de efectuar la expresión de dicho ADN en un hospedador adecuado, estando generalmente unida operativamente a una secuencia de control adecuada. Tales secuencias de control pueden incluir un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar tal transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión al ribosoma de ARNm adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y traducción. Un promotor preferido es el promotor *aprE* de *Bacillus subtilis*. El vector puede ser un plásmido, una partícula fago o un ADN destinado a efectuar la inserción genómica, es decir, la integración. Una vez transformado en un hospedador adecuado, el vector puede replicarse y funcionar de forma independiente del genoma hospedador o, en algunos casos, puede integrarse en el propio genoma. Los términos plásmido y vector se usan a veces indistintamente ya que el plásmido es la forma de vector usada más habitualmente en la actualidad. Sin embargo, la invención pretende incluir otras formas de tales vectores de expresión que desempeñan funciones equivalentes y, que son, o pasan a ser, conocidas en la técnica, incluyendo particularmente la presentación de fagos.

Las expresiones “cepa hospedadora” o “célula hospedadora” se refieren a un hospedador adecuado para, por ejemplo, un vector de expresión que comprende un ADN que codifica la α -amilasa de acuerdo con la presente invención. Las células hospedadoras útiles en la presente invención generalmente son hospedadoras procariotas o eucariotas, incluyendo cualquier microorganismo transformable en el que se pueda lograr la expresión de la α -amilasa de acuerdo con la presente invención. Específicamente, son adecuadas las cepas hospedadoras de la misma especie o género del que procede la α -amilasa, tal como una cepa de *Bacillus*. Preferiblemente, se usa una cepa de *Bacillus* negativa para α -amilasa (genes deletados) y/o una cepa de *Bacillus* con α -amilasa y proteasa deletadas (por ejemplo, $\Delta amyE$, Δapr , Δnpr). Las células hospedadoras se transforman o se transfectan con vectores contruidos usando técnicas de ADN recombinante. Tales células hospedadoras transformadas son capaces de replicar vectores que codifican la α -amilasa y sus variantes (mutantes) o de expresar la α -amilasa deseada.

Los términos “licuefacción” o “licuar” se refieren a un proceso por el cual el almidón se convierte en dextrinas de cadena más corta y menos viscosas. Generalmente, este proceso implica la gelatinización del almidón de manera simultánea con o seguida de la adición de α -amilasa.

La expresión “sitio de unión al calcio” se refiere a una región dentro de la α -amilasa que es adecuada para y actúa uniendo un ión calcio en presencia de calcio libre. Generalmente se piensa que se requiere calcio para mantener la integridad estructural de la α -amilasa en muchas condiciones y se ha demostrado que los restos aminoácidos implicados en la unión al calcio están muy conservados entre las diferentes enzimas (Machius *et al.*, J. Mol. Biol., vol. 246, págs. 545-559 (1995)). De acuerdo con la presente invención, las características del sitio de unión al calcio están alteradas en comparación con una α -amilasa de tipo silvestre o precursora para alterar el comportamiento de la α -amilasa. La alteración del sitio de unión al calcio puede incluir disminuir o aumentar la afinidad del sitio para unir ión calcio. Por alteración del comportamiento pretende referirse a la estabilidad (por ejemplo, oxidativa o térmica) o a la actividad (por ejemplo, la velocidad o eficacia con la que la α -amilasa hidroliza un sustrato de almidón) de la enzima en sus diversas aplicaciones.

Las expresiones “restos de ligando” o “ligando de calcio” se refieren a un resto o restos aminoácidos dentro de una enzima α -amilasa que forman un ligando con ión calcio unido dentro de un sitio de unión al calcio. Con respecto al sitio de unión al calcio dentro de la α -amilasa descubierto por los Solicitantes, se han identificado cinco ligandos aminoácidos que se piensa que actúan como ligandos de calcio. Los restos de ligando de calcio comprenden restos aminoácidos equivalentes a G300, Y302, H406, D407 y D430 en la α -amilasa de *Bacillus licheniformis*. Específicamente con respecto a estos ligandos de calcio identificados, se piensa que los oxígenos carbonilo de G300, Y302 y H406 y las cadenas laterales de D407 y D430 están implicados en la unión al calcio.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una α -amilasa que comprende un dominio A, un dominio C y un sitio de unión al calcio, en la que el sitio de unión al calcio está asociado con el dominio A y el dominio C y comprende restos de ligando en el dominio A y/o el dominio C, en la que la α -amilasa tiene una secuencia de aminoácidos de la α -amilasa madura de *Bacillus licheniformis* como se muestra en la Figura 4, pero modificada para alterar las características del sitio de unión al calcio y por lo tanto alterar el comportamiento de la α -amilasa sustituyendo un resto aminoácido en una posición que corresponde a G474.

También se proporciona una molécula de ácido nucleico (ADN) que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende al menos una parte de la α -amilasa proporcionada por la presente invención, sistemas de expresión que incorporan tal ADN incluyendo vectores y fagos, células hospedadoras transformadas con tal ADN y cadenas antisentido de ADN correspondientes a la molécula de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos. De manera similar, la

presente invención incluye un método para producir una α -amilasa mediante la expresión del ADN incorporado en un sistema de expresión que se ha usado para transformar una célula hospedadora.

Las secuencias de ADN pueden expresarse uniéndolas operativamente a una secuencia de control de la expresión en un vector de expresión apropiado y empleando ese vector de expresión para transformar un hospedador apropiado de acuerdo con técnicas bien conocidas. En la expresión de las secuencias de ADN de esta invención puede emplearse una amplia diversidad de combinaciones de vectores de expresión/hospedador. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, incluyen segmentos de secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, tales como los diversos plásmidos y fagos conocidos útiles para este fin. Además, en estos vectores se usa generalmente cualquiera de una amplia diversidad de secuencias de control de la expresión. Por ejemplo, los Solicitantes han descubierto que una secuencia de control de la expresión preferida para transformantes de *Bacillus* es el péptido señal *aprE* procedente de *Bacillus subtilis*. Además, los sistemas de presentación en fagos son útiles para la invención de este documento.

También son útiles en la expresión de las secuencias de ADN de esta invención una amplia diversidad de células hospedadoras y se contemplan en este documento. Estas hospedadoras pueden incluir hospedadoras eucariotas y procariotas bien conocidas, tales como cepas de *E. Coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, diversos hongos, por ejemplo, *Trichoderma* o *Aspergillus*, levaduras y células animales. Preferiblemente, el hospedador expresa extracelularmente la α -amilasa de la presente invención para facilitar la purificación y procesamiento aguas abajo. La expresión y purificación de la α -amilasa mutante de la invención puede efectuarse a través de medios reconocidos en la técnica para realizar tales procesos.

Las α -amilasas de acuerdo con la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos que procede de la secuencia de aminoácidos de una α -amilasa precursora que tiene la secuencia de aminoácidos de la Figura 4. Las α -amilasas precursoras incluyen α -amilasas de origen natural y α -amilasas recombinantes. La secuencia de aminoácidos de la α -amilasa mutante procede de la secuencia de aminoácidos de la α -amilasa precursora por sustitución de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos precursora. Tal modificación es generalmente de la secuencia de ADN precursora que codifica la secuencia de aminoácidos de la α -amilasa precursora en lugar de la manipulación de la propia enzima α -amilasa precursora. En la técnica anterior se han descrito métodos para modificar genes de α -amilasa (es decir, por mutagénesis dirigida de oligonucleótidos) y transformar, expresar y secretar productos enzimáticos producidos de acuerdo con el gen mutagenizado, incluyendo la publicación PCT N° WO95/10603 (Novo Nordisk), publicación PCT N° WO94/02597 (Novo Nordisk), publicación PCT N° WO94/18314 (Genencor International, Inc) y publicación PCT N° WO 91/00353 (Gist Brocades), incorporándose tales descripciones como referencia. Los métodos adicionales adecuados para la manipulación de la secuencia de ADN precursora incluyen métodos descritos en este documento y en las patentes de Estados Unidos N° 4.760.025 y 5.185.258 del mismo solicitante, incorporadas como referencia en este documento.

A continuación se describen en términos generales como aplicables a la mayoría de las α -amilasas los elementos estructurales principales, incluyendo el sitio CalB recién descubierto que se describe en este documento, y cambios en los mismos para alterar el comportamiento de una α -amilasa. Como se muestra en la Figura 1, se definen tres dominios principales, el dominio A, el dominio B y el dominio C, así como dos sitios de unión al calcio, CalA y CalB. El dominio A comprende la parte central de la molécula y se ha identificado como un barril α/β o TIM. El barril α/β está constituido por una serie de cadenas β paralelas que están interconectadas por hélices- α . En el extremo carboxilo de la enzima en un lado del dominio A hay una región que comprende un barril β antiparalelo conocido como motivo de "llave griega" (véase, por ejemplo Richardson *et al.*, Advan. Protein Chem., vol. 34, 167-339 (1981); Braden *et al.*, Introduction to Protein Structure, Garland Publishing Inc., Nueva York (1981)). Este dominio se ha identificado como dominio C. En el lado opuesto del dominio A desde el dominio C (el N-terminal) hay un dominio adicional que comprende varias cadenas β de longitud variable dependiendo de las especies, conocidas como dominio B. Se ha reconocido que el dominio B es muy variable entre las α -amilasas de especies diferentes y a menudo comprende bucles extendidos. Se cree que la unión al sustrato se localiza en una hendidura entre el dominio A y el dominio B y que el sitio activo está adicionalmente asociado con esta región de la molécula. El sitio de unión CalA se localiza dentro de una hendidura separando el dominio A y el dominio B y se piensa que proporciona estabilidad a esta región. El sitio de unión CalB descrito en este documento se localiza en la región en la que conectan el dominio A y el dominio C.

El descubrimiento por los Solicitantes del sitio de unión CalB en una α -amilasa de *Bacillus* ha permitido a los Solicitantes desarrollar una α -amilasa mutante que tiene un comportamiento alterado, y particularmente una estabilidad alterada. Para desarrollar adicionalmente tales mutantes, pueden aplicarse principios generales para la estabilización de la estructura de la proteína en la región alrededor del sitio CalB. Adicionalmente, pueden aplicarse estrategias diseñadas específicamente para mejorar la unión al calcio en el sitio CalB para aumentar la estabilidad de la enzima. Preferiblemente, tales modificaciones están en un intervalo de 15 angstroms del centro de masa del calcio unido al sitio de unión CalB, más preferiblemente en un intervalo de 10 angstroms del centro de masa del calcio unido al sitio de unión CalB.

En este documento se identifican restos para delección o sustitución en α -amilasa. Por tanto, el resto específico analizado en este documento se refiere a un número de posición de aminoácido que hace referencia al número asignado en la secuencia de la α -amilasa madura de *Bacillus licheniformis* ilustrada en la Figura 4. Sin embargo, la mutación de la α -amilasa madura particular de *Bacillus licheniformis* puede ampliarse a las α -amilasas no precursoras de *Bacillus licheniformis* que contienen restos aminoacídicos en posiciones que son equivalentes al resto particular identificado en

la α -amilasa de *Bacillus licheniformis*. Un resto de una α -amilasa precursora es equivalente a un resto de α -amilasa de *Bacillus licheniformis* si es homólogo (es decir, se corresponde en posición para la estructura primaria o terciaria) o análogo a un resto específico o parte de ese resto en la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (es decir, que tiene la misma o similar capacidad funcional para combinarse, reaccionar o interactuar químicamente o estructuralmente).

Para establecer la homología con la estructura primaria, la secuencia de aminoácidos de una α -amilasa precursora se compara directamente con la secuencia primaria de la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* y particularmente con un conjunto de restos que se sabe que son invariables en todas las α -amilasas cuyas secuencias se conocen (véase por ejemplo, la Figura 7). También es posible determinar restos equivalentes por análisis de la estructura terciaria de las estructuras cristalinas descritas para la α -amilasa pancreática porcina (Buisson *et al.*, EMBO Journal, vol. 6, págs. 3909-3916 (1987); Qian *et al.*, Biochemistry, vol. 33, págs. 6284-6294 (1984); Larson *et al.*, J. Mol. Biol., vol. 235, págs. 1560-1584 (1994)); Taka-amilasa A de *Aspergillus oryzae* (Matsuura *et al.*, J. Biochem. (Tokyo), vol. 95, págs. 697-702 (1984)); y una α -amilasa ácida de *A. niger* (Boel *et al.*, Biochemistry, vol. 29, págs. 6244-6249 (1990)), siendo similares las dos estructuras anteriores, y para la α -amilasa de cebada (Vallee *et al.*, J. Mol. Biol., vol. 236, págs. 368-371 (1984); Kadziola, J. Mol. Biol., vol. 239, págs. 104-121 (1994)). Aunque se han publicado algunos estudios preliminares (Suzuki *et al.*, J. Biochem., vol. 108, págs. 379-381 (1990); Lee *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., vol. 291, págs. 255-257 (1991); Chang *et al.*, J. Mol. Biol., vol. 229, págs. 235-238 (1993); Mizuno *et al.*, J. Mol. Biol., vol. 234, págs. 1282-1283 (1993)), sólo hay una estructura publicada para la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (Machius *et al.*, J. Mol. Biol. vol. 246, págs. 545-549 (1995)). Sin embargo, varios investigadores han predicho estructuras supersecundarias comunes entre glucanasas (MacGregor *et al.*, Biochem. J., vol. 259, págs. 145-152 (1989)) y dentro de α -amilasas y otras enzimas que metabolizan el almidón (Jaspersen, J. Prot. Chem. vol. 12, págs. 791-805 (1993); MacGregor, Starke, vol. 45, págs. 232-237 (1993)); y similitudes de secuencia entre enzimas con estructuras supersecundarias similares a las α -amilasas (Janecek, FEBS Letters, vol. 316, págs. 23-26 (1993); Janecek *et al.*, J. Prot. Chem., vol. 12, págs. 509-514 (1993)). Se ha modelado una estructura para la enzima de *Bacillus stearothermophilus* sobre la de la Taka-amilasa A (Holm *et al.*, Protein Engineering, vol. 3, págs. 181-191 (1990)). Las cuatro regiones muy conservadas mostradas en la Figura 7 contienen muchos restos que se cree que son parte del sitio activo (Matsuura *et al.*, J. Biochem. (Tokyo), vol. 95, págs. 697-702 (1984); Buisson *et al.*, EMBO Journal, vol. 6, págs. 3909-3916 (1987); Vihinen *et al.*, J. Biochem., vol. 107, págs. 267-272 (1990)) que incluyen His +105; Arg +229; Asp +231; His +235; Glu +261 y Asp +328 según el sistema de numeración de *Bacillus licheniformis*.

Los segmentos de la cadena polipeptídica de la α -amilasa que comprende el sitio de unión CalB incluyen los restos 290-309, 339-347, 402-411, 426-436 y 472-477. Estos segmentos polipeptídicos comprenden el sitio de unión CalB. Por consiguiente, se esperaría que mutaciones aleatorias específicas de región en estas regiones las produjeran variantes que modulen la estabilidad de la α -amilasa mediante la modulación de la afinidad del calcio en este sitio.

A continuación se proporcionan estrategias adicionales más específicas:

(1) Aumentar la entropía del desplegamiento de la cadena principal puede introducir estabilidad en la enzima. Por ejemplo, la introducción de restos de prolina en la posición 2 de giros inversos en los extremos N-terminales de las hélices α y en las estructuras de bucle puede estabilizar de manera significativa la proteína aumentando la entropía del desplegamiento (véase, por ejemplo Watanabe *et al.*, Eur. J. Biochem, vol. 226, págs. 277-283 (1994)). De manera similar, los restos de glicina no tienen carbono β y por tanto tienen una libertad conformacional de la cadena principal considerablemente mayor que muchos otros restos. Esto puede conducir a mayor flexibilidad con resultados de estabilidad ligeros. Esto puede conducir a elevada flexibilidad con estabilidad débil resultante. La sustitución de glicinas en uno o más restos equivalentes a G299, G410, G433, G474, G475 en *Bacillus licheniformis*, preferiblemente con una alanina, puede reducir la flexibilidad y mejorar la estabilidad. Adicionalmente, acortando bucles externos puede ser posible mejorar la estabilidad. Se ha observado que las proteínas producidas por hipertermófilos tienen bucles externos más cortos que sus homólogas mesófilas (véase, por ejemplo Russel *et al.*, Current Opinions in Biotechnology, vol. 6, págs. 370-374 (1995)). La introducción de enlaces disulfuro también puede ser eficaz para estabilizar distintas estructuras terciarias unas con respecto a otras. La modificación en G301 alteraría la estabilidad del segmento en 290-309 limitando o mejorando la variabilidad conformacional de la glicina. Específicamente en este resto se contemplan sustituciones de ácido aspártico o prolina. La modificación en G474 por sustitución con otro resto puede aumentar la estabilidad introduciendo un C β , disminuyendo de esta manera su libertad conformacional.

(2) Disminuir las cavidades internas aumentando la hidrofobicidad de la cadena lateral puede alterar la estabilidad de una enzima. Reducir el número y volumen de cavidades internas aumenta la estabilidad de la enzima maximizando las interacciones hidrófobas y reduciendo defectos de empaquetamiento (véase, por ejemplo, Matthews, Ann. Rev. Biochem., vol. 62, págs. 139-160 (1993); Burley *et al.*, Science, vol. 229, págs. 23-29 (1985); Zuber. Biophys. Chem., vol. 29, págs. 171-179 (1988); Kellis *et al.*, Nature, vol. 333, págs. 784-786 (1988)). Se sabe que las proteínas multiméricas de termófilos a menudo tienen más superficies de contacto subunitarias hidrófobas con mayor complementariedad de superficie que sus homólogas mesófilas (Russel *et al.*, anteriormente). Los Solicitantes creen que este principio es aplicable a superficies de contacto de dominios de proteínas monoméricas. Las sustituciones específicas que pueden mejorar la estabilidad aumentando la hidrofobicidad incluyen lisina por arginina, serina por alanina y treonina por alanina (Russel *et al.*, anteriormente). La modificación en G301 por sustitución por alanina o prolina puede aumentar el tamaño de la cadena lateral dando como resultado una reducción de las cavidades, un mejor empaquetamiento e hidrofobicidad aumentada. Además, Y302, M304, L307, F343, L427 e I428 bordean una cavidad en la interfaz entre el dominio A y el dominio C en la región de unión CalB. Las sustituciones para reducir el tamaño de la cavidad, aumentar la hidrofobicidad y mejorar la complementariedad de la superficie de contacto dominio A-dominio

C pueden mejorar la estabilidad de la enzima. Específicamente, la modificación del resto específico en estas posiciones con un resto diferente seleccionado de cualquiera de fenilalanina, triptófano, tirosina, leucina e isoleucina puede mejorar el comportamiento. Son sustituciones adicionales que pueden ser útiles en V409 y F403, preferiblemente las sustituciones en V409 comprenden isoleucina o leucina, y en F403 comprenden tirosina o triptófano.

(3) Equilibrar la carga de la estructura secundaria rígida, es decir, hélices α y giros β , puede mejorar la estabilidad. Por ejemplo, neutralizar cargas positivas parciales en un extremo N de la hélice con carga negativa en ácido aspártico puede mejorar la estabilidad de la estructura (véase, por ejemplo, Eriksson *et al.*, Science, vol. 255, págs. 178-183 (1992)). De manera similar, neutralizar cargas negativas parciales en el extremo C de la hélice con carga positiva puede mejorar la estabilidad. Eliminar la interacción de la carga positiva con el extremo N del péptido en giros β debería ser eficaz para conferir estabilidad a la estructura terciaria. La sustitución de H405 con un resto no cargado positivamente podría eliminar la interacción de una carga positiva desfavorable con el nitrógeno amida de D407 en el giro 405-408.

(4) Introducir puentes salinos y enlaces de hidrógeno para estabilizar estructuras terciarias puede ser eficaz. Por ejemplo, las interacciones de pares iónicos, por ejemplo, entre ácido aspártico o ácido glutámico y lisina, arginina o histidina, pueden introducir fuertes efectos de estabilización y pueden usarse para unir elementos de diferente estructura terciaria con una mejora resultante de la termoestabilidad. Además, aumentos en el número de enlaces hidrógeno de restos cargados/restos no cargados, y en general del número de enlaces hidrógeno, pueden mejorar la termoestabilidad (véase, por ejemplo Tanner *et al.*, Biochemistry, vol. 35, págs. 2597-2609). La sustitución de H405 con ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico o glutamina puede introducir un enlace hidrógeno con la amida de la cadena principal de D407, estabilizando de esta manera el giro 405-408. La sustitución en K436 con arginina puede mejorar el puente salino con D404 e introducir un enlace H en el carbonilo de la cadena principal de I408.

(5) Evitar restos termolábiles en general puede aumentar la estabilidad térmica. Por ejemplo, la asparagina y la glutamina son susceptibles a la desamidación y la cisteína es susceptible a la oxidación a temperatura elevada. Reducir el número de estos restos en posiciones sensibles puede dar como resultado una termoestabilidad mejorada (Russell *et al.*, anteriormente). La sustitución o delección de Q291, Q298, N309, Q340 o N473 por cualquier resto distinto de glutamina o cisteína puede aumentar la estabilidad evitando un resto termolábil.

(6) Introducir un sexto ligando de la proteína con el ión calcio puede mejorar la estabilidad del calcio unido y, por tanto, de la enzima. La sustitución de H406 con ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico o glutamina puede aumentar la afinidad del calcio.

(7) La estabilización de los ligandos existentes para el calcio en CalB también puede mejorar la estabilidad del calcio unido y, por tanto, de la enzima. Por ejemplo, el M304 puede sustituirse con fenilalanina o tirosina para introducir estabilización de cadena lateral aromática/cadena lateral de ácido aspártico donde el oxígeno del carboxilato puede interaccionar favorablemente con la carga positiva parcial asociada con anillos bencilo, aumentando la estabilidad de D407 y D430. La sustitución de H405 con fenilalanina o tirosina para introducir un grupo hidrófobo próximo a D407, puede aumentar la estabilidad de D407 mediante la formación de interacciones de van der Waals favorables con átomos C-b y C-g de la cadena lateral de D407. La sustitución de G300 con fenilalanina puede eliminar el enlace H de la cadena lateral con Q291.

(8) Aumentar la electronegatividad de cualquiera de los ligandos de calcio puede mejorar la unión al calcio. Por ejemplo, la sustitución de M304 con fenilalanina o tirosina puede aumentar la electronegatividad de D407 y D430 por una protección mejorada del disolvente, mejorando por lo tanto la unión al calcio.

(9) Eliminar las cargas positivas en los alrededores del ión calcio que pueden interferir con la unión al calcio debería mejorar de manera similar la estabilidad del sitio de unión al calcio. Por ejemplo, sustituir H405 o H406, que están en los alrededores inmediatos del calcio unido, puede tener carga positiva que podría producir interacciones carga-carga desfavorables con el ión calcio cargado positivamente y puede tener interacciones carga-carga opuestas con ligandos de calcio cargados negativamente. Por lo tanto, la sustitución con un resto adecuado no cargado positivamente puede aumentar la afinidad del calcio y la estabilidad de la proteína.

(10) La estabilización del sitio de unión CalB introduciendo restos cargados negativamente cerca del mismo también pueden mejorar la unión del ión calcio en el sitio (véase, por ejemplo, Pantoliano *et al.*, Biochemistry, vol. 27, págs. 8311-8317 (1988); Bryan, Stability of Protein Pharmaceuticals Part B: *In vitro* Pathways for Degradation and Strategies for Protein Stabilization (Ahern & Manning, Eds.), págs. 147-181 (1992); Fagain, Biochim. Biophys. Acta, vol. 1252, págs. 1-14 (1995)). Por ejemplo, la sustitución de Q291, Q298, N309, Q304, H405, H406, N473 y/o G474 con ácido aspártico o ácido glutámico cargados negativamente aumentará la carga neta negativa en el área del calcio y puede aumentar la afinidad del calcio y, por tanto, la estabilidad enzimática.

Las α -amilasas de acuerdo con la presente invención pueden presentar características de comportamiento alteradas que proporcionen resultados deseables e inesperados que sean útiles en las diversas aplicaciones para las que se usan habitualmente las α -amilasas. Por ejemplo, las α -amilasas de acuerdo con la presente invención que presentan características de comportamiento alteradas a pH bajo, incluyendo termoestabilidad mejorada, estabilidad de pH mejorada y/o estabilidad oxidativa mejorada, son útiles en la licuefacción del almidón a pH bajo. La termoestabilidad mejorada será útil para prolongar la vida útil de los productos que las incorporen. Una estabilidad oxidativa mejorada o un com-

portamiento mejorado son particularmente deseables en productos de limpieza y para prolongar la vida útil de la α -amilasa en presencia de blanqueante, perborato, percarbonato o perácidos usados en tales productos de limpieza.

La α -amilasa de la presente invención es especialmente útil en el procesado de almidón y particularmente en la licuefacción de almidón. Las condiciones presentes durante los procesos de licuefacción deseables en el mercado incluyen característicamente condiciones de pH bajo, temperatura elevada y oxidación potencial que requieren α -amilasas que presenten un comportamiento mejorado a pH bajo, estabilidad térmica mejorada y estabilidad oxidativa mejorada. Por consiguiente, las α -amilasas de acuerdo con la presente invención que son particularmente útiles en la licuefacción presentan un comportamiento mejorado a un pH menor de aproximadamente 6, preferiblemente menor de aproximadamente 5,5 y más preferiblemente de entre aproximadamente 5,0 y 5,5. Además, serán particularmente útiles las α -amilasas de acuerdo con la presente invención que presentan una estabilidad térmica aumentada a temperaturas de entre aproximadamente 80-120°C y preferiblemente de entre aproximadamente 100-110°C y una estabilidad aumentada en presencia de oxidantes. Preferiblemente, la α -amilasa de acuerdo con la presente invención que se usa en licuefacción comprende adicionalmente una delección o sustitución en una o más de las posiciones M15, V128, H133, W138, N188, A209 y/o M197.

En otra realización de la presente invención se proporcionan composiciones detergentes en forma líquida, de gel o granular, que comprenden la α -amilasa de acuerdo con la presente invención. Tales composiciones detergentes se beneficiarán particularmente de la adición de una α -amilasa de acuerdo con la presente invención que tenga una estabilidad térmica aumentada para mejorar la vida útil o una estabilidad oxidativa aumentada de manera que la α -amilasa tenga una resistencia mejorada a compuestos blanqueantes o perácidos habitualmente presentes en detergentes. Por tanto, la α -amilasa de acuerdo con la presente invención puede formularse ventajosamente en detergentes conocidos en polvo, líquido o gel, que tienen un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 12,0. Una realización preferida de la presente invención comprende además una delección o sustitución en una o más de las posiciones M15, V128, H133, W138, N188, A209 y/o M197. Las composiciones detergentes que comprenden la α -amilasa de acuerdo con la presente invención pueden incluir adicionalmente otras enzimas tales como endoglicosidasas, celulasas, proteasas, lipasas u otras enzimas amilasa, por ejemplo amilasa procedente de *Bacillus stearotheophilus*, como se conoce generalmente en la técnica.

Las realizaciones de la presente invención que comprenden una combinación de la α -amilasa de acuerdo con la presente invención con enzimas proteasas incluyen preferiblemente proteasas oxidativamente estables tales como las descritas en el documento U.S. Re 34.606, incorporado en este documento por referencia, así como enzimas disponibles en el mercado tales como DURAZYM (Novo Nordisk), MAXAPEM (Gist-brocades) y PURAFECT® OxP (Genencor International, Inc.). En el documento U.S. Re 34.606 se describen métodos para fabricar tales mutantes de proteasas (proteasas oxidativamente estables) y particularmente tales mutantes que tienen una sustitución para la metionina en una posición equivalente a N222 en *Bacillus amyloliquefaciens*.

Lo siguiente se presenta a modo de ejemplo y no debe interpretarse como una limitación al alcance de las reivindicaciones. Las abreviaturas usadas en este documento, particularmente las notaciones de tres letras o de una letra para los aminoácidos, se describen en Dale, J. W., Molecular Genetics of Bacteria, John Wiley & Sons, (1989) Apéndice B.

Parte experimental

Ejemplo

*Preparación de Cristales de α -Amilasa de *Bacillus licheniformis**

Se desarrollaron cristales en gotas colgantes de 10 μ l, a partir de Li₂SO₄ 1,6-1,8 M, CaCl₂ 1 mM, NaCl 50 mM, tamponado a pH 6,5 con bistrispropano 200 mM. Los cristales crecieron como prismas alargados, hasta una dimensión máxima de aproximadamente 1,5 mm, en 7-14 días. El grupo espacial es P2₁2₁2₁, con a = 118,3 Å, b = 119,0 Å, c = 84,9 Å. El N° Matthews (véase Matthews, J., Mol. Biol., vol. 33, pág. 409 (1968)) es 3,01, suponiendo 2 moléculas en la unidad asimétrica, que está dentro del intervalo normal. Los datos se registraron usando un sistema de placa de imagen RAXISII, montado en un generador de rayos X de ánodo rotatorio RU-200B, que produce radiación CuK α monocromada con grafito. Los datos se procesaron y se redujeron a amplitudes usando un programa informático distribuido con el sistema por Molecular Structures Corp. (The Woodlands, Tejas). La información de fase se determinó usando reemplazo isomorfo múltiple (MIR) complementado con datos de dispersión anómala (MIRAS) y posterior modificación de densidad. Los derivados de átomos pesados se prepararon por métodos de inmersión convencionales, excepto por el derivado SmCl₃, que se preparó por co-cristalización. Las posiciones de los átomos pesados se localizaron usando Patterson diferenciales y Fourier diferenciales de fase cruzada. Se obtuvieron excelentes datos de dispersión anómala para un derivado SmCl₃, que se usaron para encontrar la mano correcta, y poner todos los átomos pesados en un origen común. Se refinaron las posiciones de los átomos pesados y se calcularon las fases MIRAS, usando Xheavy (Zhang *et al.*, Acta Crystallog. A, vol. 46, pág. 377 (1990)). Las fases se mejoraron nivelando el disolvente, con SQUASH (McRee, J., Mol. Graph., vol. 10, pág. 44 (1992)), dando como resultado un mapa de 3,0 Å en el que podían identificarse la mayoría de los elementos estructurales secundarios de ambas moléculas. La construcción de modelos, el refinado de espacio real y el cálculo del promedio de simetría se realizaron usando Xfit (Zhang, anteriormente). Se identificaron las posiciones de C α de las cadenas β y hélices α del dominio de barril α/β y el C terminal de todos los dominios β de ambas moléculas. El barril TIM de la α -amilasa de *Aspergillus* (entrada PDB 6TAA) (Swift

et al., Acta Crystallog. B, vol. 47, pág. 535 (1991)) se superpuso aproximadamente a la señal C_α de ambas moléculas de la unidad asimétrica y se colocaron con exactitud usando refinado de espacio real de todo el dominio sin modificar. Esto permitió la determinación exacta del operador de simetría local, que se usó para calcular el promedio de simetría no cristalográfica del mapa. Esto dio como resultado una mejora significativa del mapa, excepto para el dominio B.

En este punto, se construyó únicamente una molécula para el mapa de simetría promediado, generándose la segunda usando el operador de simetría local. Se identificaron las posiciones de C_α y la cadena principal se construyó usando pentámeros solapantes, extraídos de una base de datos de estructuras bien refinadas (Zhang, anteriormente; Jones *et al.*, EMBO, vol. 5, pág. 819 (1986)). En el dominio B gran parte del mapa no podía interpretarse y únicamente pudieron construirse los restos 105-116 y 133-169. Se construyeron falsas alaninas para los restos en los que no era evidente densidad de cadena lateral. Este modelo inicial se refinó usando un protocolo atemperado de enfriamiento lento simulado (temperatura inicial = 3000 K), seguido refinado convencional por mínimos cuadrados, usando Xplor (Brunger *et al.*, Acta Crystallog. A, vol. 45, pág. 50 (1989)) para datos entre 15-3,0 Å ($F \geq 3s$), con restricciones de simetría no cristalográfica aplicadas. Este modelo convergía a un factor R de 0,28. Se combinaron fases MIRAS y de modelo usando sigmaA (Read, Acta Crystallog. A, vol. 42, pág. 140 (1986)), para producir un mapa de 2,2 Å. Se construyeron los restos que faltaban, junto con un ajuste manual considerable del resto de la estructura, y después se refinó usando atemperado simulado (temperatura inicial = 1000 K), usando datos de entre 8,2 y 2,2 Å ($F \geq 3s$). El modelo convergía a un factor R de 0,245. El refinado posterior del factor B isotrópico restringido dio un factor R de 0,225. Se calcularon los mapas 2fo-fc y fo-fc ponderados de Sigma A usando fases calculadas y se usaron para identificar errores y para localizar los iones de calcio. Después de obtener datos nativos a 1,9 Å, se usaron mapas diferenciales fo-fc y 2fo-fc para localizar los errores que quedaban e identificar moléculas de agua ordenadas, seguido por minimización de Powell y refinado del factor B restringido estereoquímicamente.

El factor R del presente modelo es de 0,19, (15-1,9 Å, $F \geq 3sF$). El modelo contiene 7914 átomos no de hidrógeno e incluye 630 átomos de oxígeno de agua y tres átomos de calcio. Esto presenta una buena geometría, con desviaciones r.m.s. de 0,012 Å y 1,35° de las longitudes y ángulos de enlace ideales, respectivamente. La representación de Ramachandron de los ángulos ϕ y φ muestra que el resto 150 es el único resto no glicina que se desvía significativamente de las regiones permitidas.

La α -amilasa de *B. licheniformis* contiene 483 restos. En el presente modelo faltan los primeros tres restos del extremo N y el resto C-terminal. También faltan los restos 181-195 de la molécula 1 y 181-193 de la molécula 2. En la Tabla 1 se proporcionan los datos procedentes de este ejemplo.

TABLA 1

Conjunto de datos	Resolución	Rfusión	R-deriv	Sitios N	Energía de ajuste de fase	Dispersión anómala
Nativo	50-1,8 Å	0,09	-	-	-	-
SmCl ₃	50-2,2 Å		0,073	4	1,45	Y
PtI ₆	50-3,0 Å		0,259	5	1,22	N
PtCl ₄	50-3,0 Å		0,249	5	1,29	N
Hg(Ac) ₂	50-3,0 Å		0,124	4	1,33	N
IrCl ₆	50-3,0 Å		0,226	4	1,01	N
HgI ₃	50-2,2 Å		0,133	12 ¹	1,48	Y
Me ₃ PbI	50-2,2 Å		0,186	2	1,29	Y

REIVINDICACIONES

1. Una α -amilasa que comprende un dominio A, un dominio C y un sitio de unión al calcio, en la que dicho sitio de unión al calcio está asociado con dicho dominio A y dicho dominio C y que comprende restos de ligando en dicho dominio A y/o dicho dominio C, en la que dicha α -amilasa tiene una secuencia de aminoácidos de la α -amilasa madura de *Bacillus licheniformis*, como se muestra en la Figura 4, pero modificada para alterar las características de dicho sitio de unión al calcio y por lo tanto alterar el comportamiento de dicha α -amilasa sustituyendo un resto aminoacídico en una posición correspondiente a G474.

2. La α -amilasa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la α -amilasa comprende adicionalmente una sustitución o delección en uno o más restos equivalentes a M15, V128, H133, W138, N188, A209 y/o M197.

3. Un detergente que comprende la α -amilasa de acuerdo con la reivindicación 1.

4. Una composición de licuefacción de almidón que comprende la α -amilasa de acuerdo con la reivindicación 1.

5. Un método para la licuefacción de almidón que comprende la etapa de añadir a una solución acuosa de almidón una α -amilasa de acuerdo con la reivindicación 1, e incubarla durante un tiempo adecuado y en condiciones adecuadas para licuar la solución acuosa de almidón.

6. Un ADN que codifica la α -amilasa de acuerdo con la reivindicación 1.

7. Un vector de expresión en el que el ADN de la reivindicación 6 está unido operativamente a una secuencia de control de expresión que puede emplearse en la expresión de dicho ADN.

8. Una célula hospedadora transformada con el vector de expresión de la reivindicación 7.

9. Un método de expresión del ADN que codifica la α -amilasa que comprende un dominio A, un dominio C y un sitio de unión al calcio, en el que dicho sitio de unión al calcio está asociado a dicho dominio A y dicho dominio C y que comprende restos de ligando en dicho dominio A y/o dicho dominio C, en el que dicha α -amilasa tiene una secuencia de aminoácidos de la α -amilasa madura de *Bacillus licheniformis* como se muestra en la Figura 4, pero se modifica para alterar las características de dicho sitio de unión al calcio y por lo tanto alterar el comportamiento de dicha α -amilasa por sustitución de un resto aminoacídico en una posición correspondiente a G474, que comprende las etapas de transformar una célula hospedadora y expresar y secretar dicha α -amilasa a partir de dicha célula hospedadora.

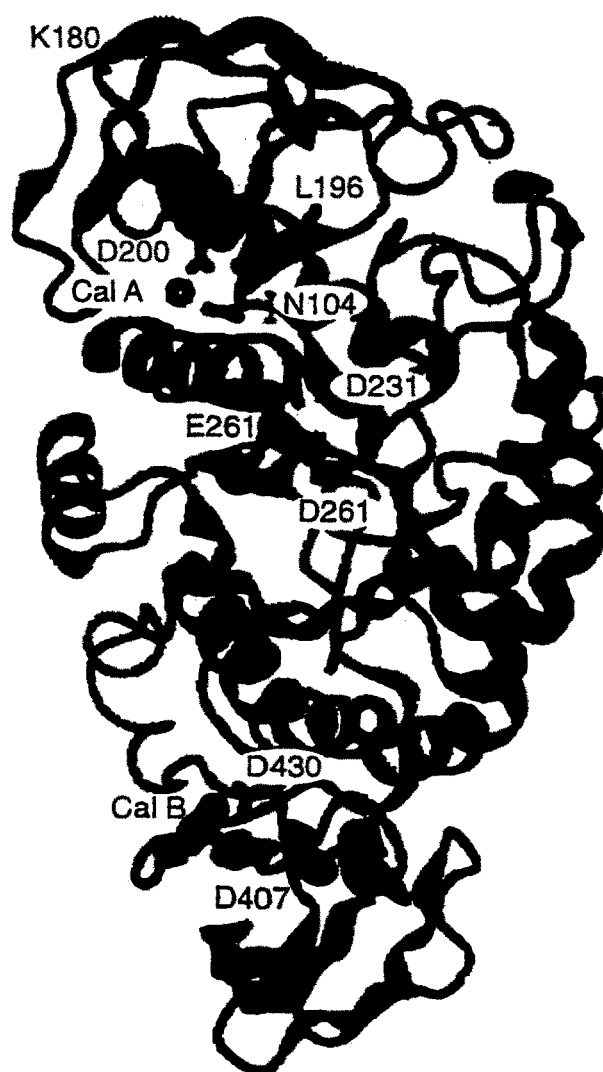


FIG. 1

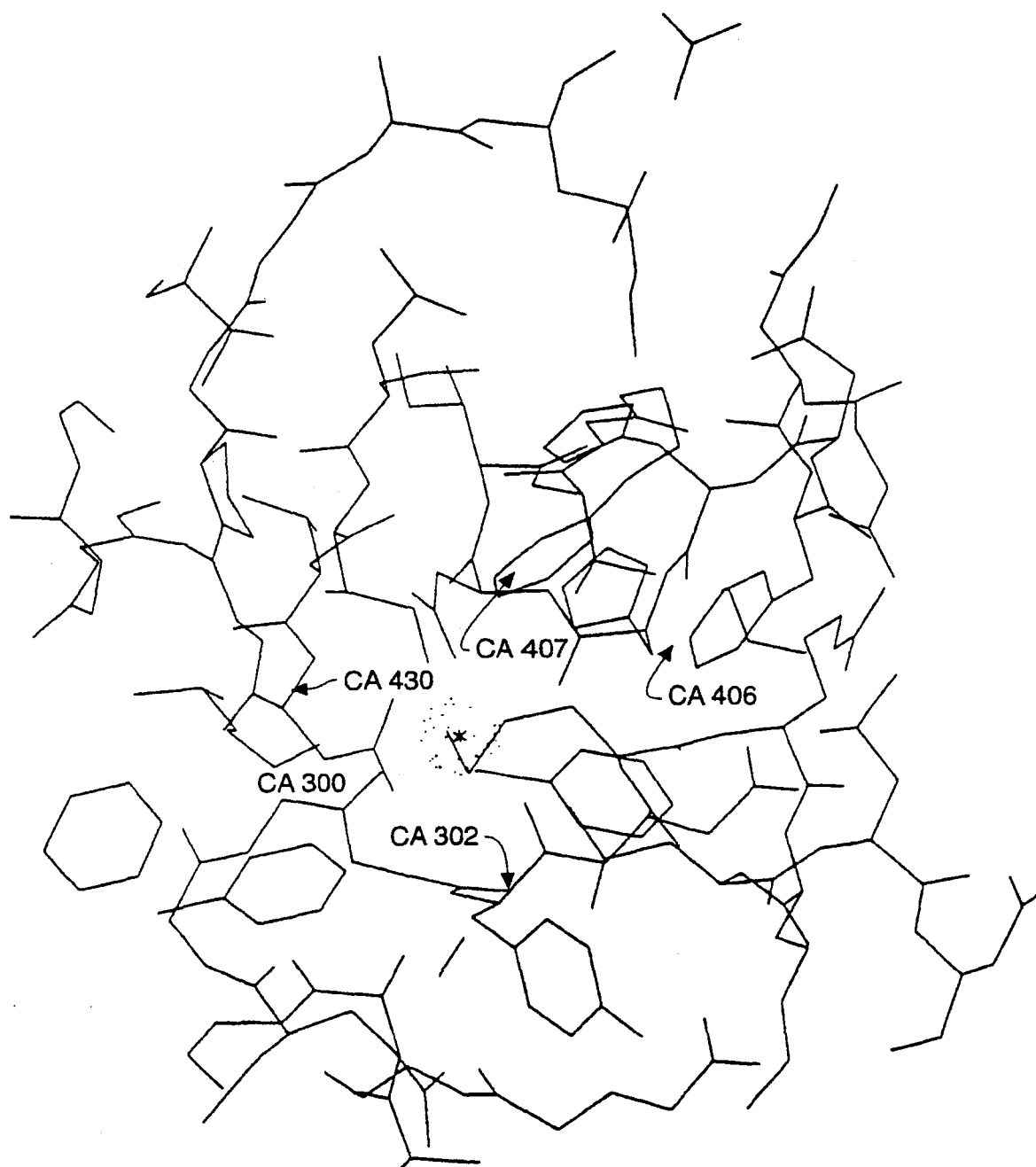


FIG._2

10 30 50
 AGCTTGAAGAAGTGAAGAAGCAGAGAGGCTATTGAATAAATGAGTAGAAAGCGCCATATC
 70 90 110
 GGCGCTTTTCTTTTGAAGAAAATATAGGGAAAATGGTACTTGTTAAAAATTTCGGAATAT
 130 150 170
 TTATACAACATCATATGTTTCACATTGAAAGGGGAGGAGAATCATGAAACAACAAAAACG
 M K Q Q K R
 190 210 230
 GCTTTACGCCCATTGCTGACGCTGTTATTTGCGCTCATCTTCTTGCTGCCTCATTCTGC
 L Y A R L L T L L F A L I F L L P H S A
 250 270 290
 AGCAGCGGCGGCAAATCTTAATGGGACGCTGATGCAGTATTTTGAATGGTACATGCCCAA
 A A A A N L N G T L M Q Y F E W Y M P N
 310 330 350
 TGACGGCCAACATTGGAAGCGTTTGCAAAACGACTCGGCATATTTGGCTGAACACGGTAT
 D G Q H W K R L Q N D S A Y L A E H G I
 370 390 410
 TACTGCCGTCTGGATTCCCCCGGCATATAAGGGAACGAGCCAAGCGGATGTGGGCTACGG
 T A V W I P P A Y K G T S Q A D V G Y G
 430 450 470
 TGCTTACGACCTTTATGATTTAGGGGAGTTTCATCAAAAAGGGACGGTTCGGACAAAGTA
 A Y D L Y D L G E F H Q K G T V R T K Y
 490 510 530
 CGGCACAAAAGGAGAGCTGCAATCTGCGATCAAAAGTCTTCATTCCCGCGACATTAACGT
 G T K G E L Q S A I K S L H S R D I N V
 550 570 590
 TTACGGGGATGTGGTCATCAACCACAAAGGCGGCGCTGATGCGACCGAAGATGTAACCGC
 Y G D V V I N H K G G A D A T E D V T A
 610 630 650
 GGTTGAAGTCGATCCCGCTGACCGCAACCGCGTAATTTAGGAGAACACCTAATTAAAGC
 V E V D P A D R N R V I S G E H L I K A
 670 690 710
 CTGGACACATTTTCATTTTCCGGGGCGCGGCAGCACATACAGCGATTTTAAATGGCATTG
 W T H F H F P G R G S T Y S D F K W H W
 730 750 770
 GTACCATTTTGACGGAACCGATTGGGACGAGTCCCGAAAGCTGAACCGCATCTATAAGTT
 Y H F D G T D W D E S R K L N R I Y K F
 790 810 830
 TCAAGGAAAGGCTTGGGATTGGGAAGTTTCCAATGAAAACGGCAACTATGATTATTTGAT
 Q G K A W D W E V S N E N G N Y D Y L M

FIG..3A

850 870 890
 GTATGCCGACATCGATTATGACCATCCTGATGTCGCAGCAGAAATTAAGAGATGGGGCAC
 Y A D I D Y D H P D V A A E I K R W G T
 910 930 950
 TTGGTATGCCAATGAACTGCAATTGGACGGTTTCCGTCTTGATGCTGTCAAACACATTAA
 W Y A N E L Q L D G F R L D A V K H I K
 970 990 1010
 ATTTTCTTTTTTTCGCGGATTGGGTTAATCATGTGTCAGGGAAAAACGGGGAAGGAAATGTT
 F S F L R D W V N H V R E K T G K E M F
 1030 1050 1070
 TACGGTAGCTGAATATTGGCAGAATGACTTGGGCGCGCTGGAAAACCTATTTGAACAAAAC
 T V A E Y W Q N D L G A L E N Y L N K T
 1090 1110 1130
 AAATTTTAATCATTGAGTGTGACGTGCCGCTTCATTATCAGTTCCATGCTGCATCGAC
 N F N H S V F D V P L H Y Q F H A A S T
 1150 1170 1190
 ACAGGGAGGCGGCTATGATATGAGGAAATTGCTGAACGGTACGGTCGTTTCCAAGCATCC
 Q G G G Y D M R K L L N G T V V S K H P
 1210 1230 1250
 GTTGAAATCGGTTACATTTGTCGATAACCATGATACACAGCCGGGGCAATCGCTTGAGTC
 L K S V T F V D N H D T Q P G Q S L E S
 1270 1290 1310
 GACTGTCCAAACATGGTTTAAGCCGCTTGCTTACGCTTTTATTCTCACAAGGGAATCTGG
 T V Q T W F K P L A Y A F I L T R E S G
 1330 1350 1370
 ATACCCTCAGGTTTTCTACGGGGATATGTACGGGACGAAAGGAGACTCCAGCGCGGAAAT
 Y P Q V F Y G D M Y G T K G D S Q R E I
 1390 1410 1430
 TCCTGCCTTGAAACACAAAATTGAACCGATCTTAAAAGCGAGAAAACAGTATGCGTACGG
 P A L K H K I E P I L K A R K Q Y A Y G
 1450 1470 1490
 AGCACAGCATGATTATTTGACACCACATGACATTGTCGGCTGGACAAGGGAAGGCGACAG
 A Q H D Y F D H H D I V G W T R E G D S
 1510 1530 1550
 CTCGGTTGCAAATTCAGGTTTGGCGGCATTAATAACAGACGGACCGGTGGGGCAAAGCG
 S V A N S G L A A L I T D G P G G A K R
 1570 1590 1610
 AATGTATGTCGGCCGGCAAACGCGGTTGAGACATGGCATGACATTACCGGAAACCGTTC
 M Y V G R Q N A G E T W H D I T G N R S
 1630 1650 1670
 GGAGCCGGTTGTCATCAATTCGGAAGGCTGGGGAGAGTTTCACGTAAACGGCGGGTCCGT
 E P V V I N S E G W G E F H V N G G S V

FIG._3B

1690 1710 1730
 TTCAATTTATGTTCAAAGATAGAAGAGCAGAGAGGACGGATTCCTGAAGGAAATCCGTT
 S I Y V Q R *
 1750 1770 1790
 TTTTATTTTGCCCGTCTTATAAATTTCTTTGATTACATTTTATAATTAATTTTAACAAA
 1810 1830 1850
 GTGTCATCAGCCCTCAGGAAGGACTTGCTGACAGTTTGAATCGCATAGGTAAGGCGGGGA
 1870 1890 1910
 TGAAATGGCAACGTTATCTGATGTAGCAAAGAAAGCAAATGTGTCGAAAATGACGGTATC
 1930 1950
 GCGGGTGATCAATCATCCTGAGACTGTGACGGATGAATTGAAAAAGCT

FIG._3C

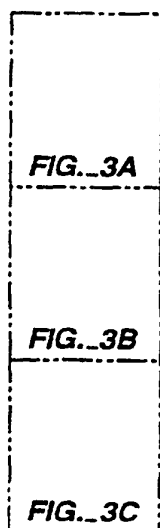


FIG._3

10 30 50
 ANLNGTLMQYFEWYMPNDGQHWKRLQND SAYLAEHGITAVWIPPAYKGTSQADVGYGAYD
 70 90 110
 LYDLGEFHQKGTVRTKYGTKGELQSAIKSLHSRDINVYGDVVINHKG GADATEDVTAVEV
 130 150 170
 DPADRNRVISGEHLIKAWTHFHFPGRGSTYSDFKWHWYHFDGTDWDESRKLNRIYKFQ GK
 190 210 230
 AWDWEVSNENGNYDYLMYADIDYDHPDVAAEIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSF
 250 270 290
 LRDWVNHVREKTGKEMFTVAEYWQNDLGALENYLNKTNFNHVSF DVPLHYQFHAASTQGG
 310 330 350
 GYDMRKLLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTQPGQSLESTVQTWFKPLAYAFILTRESGY PQ
 370 390 410
 VFYGD MYGTKGDSQREIPALKHKIEPILKARKQYAYGAQH DYFDHHDIVGWTREGDSSVA
 430 450 470
 NSGLAALITDGP GGAKRMYVGRQNAGETWHDITGNRSEPVVINSEGWGEFHVNGG SVSIY
 VQR

FIG._4

Am-Lich = <i>B. Licheniformis</i>	Am-Amylo = <i>B. amyloliquefaciens</i>	Am-Stearo = <i>B. stearothermophilus</i>
1	1	19
Am-Lich	MKQQ KRLYARLLTL LFALIFLLPH	SAAA AANLNGTLMQ YFEWYMPNDG
Am-Amylo	MRGRGNMIQK RKRTVSFRLV LMCTLLFVSL	PITK TSAVNGTLMQ YFEWYTPNDG
Am-Stearo	VLTF HRIIRKGWMF LLAFLLTASL	FCPTGRHAKA AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG
61	61	79
Am-Lich	QHWKRLQND S AYLAEHGITA VWIPPAYKGT SQADVGYGAY DLYDLGEFHQ KGTVRTKYGT	120
Am-Amylo	QHWKRLQND A EHLSDIGITA VWIPPAYKGL SQSDNGYGPY DLYDLGEFQQ KGTVRTKYGT	
Am-Stearo	TLWTKVANE A NNLSL GITA LSLPPAYKGT SRSDVGYGVY DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT	
121	121	139
Am-Lich	KGELQSAIK S LHSRDINVY G DVVINHKGGA DATEDVTAVE VDPADRNRVI SGEHLIKAWT	180
Am-Amylo	KSELQDAIG S LHSRNVQVY G DVVLNHKAGA DATEDVTAVE VNPANRNQET SEEYQIKAWT	
Am-Stearo	KAQYLQAIQ A AHAAAGMQVY A <u>DVVF</u> DHKGGA DGTEWVDAVE VNPSDRNQEI SGTYQIQAWT	
181	181	197
Am-Lich	HFHFPGRG S YSDFKWHWYH FDGTDWDESR KLNRIYKF....	240
Am-Amylo	DFRFPGRG S YSDFKWHWYH FDGADWDESR KISRIFKFRG	
Am-Stearo	KFDFPGRG S YSSFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG	
241	241	257
Am-Lich	YADIDYDHP D VAAEIKRWGT WYANELQLDG FRLDVAKHIK	300
Am-Amylo	YADVVDYDHP D VVAETKKWGI WYANELSLDG FRIDAAKHIK	
Am-Stearo	YADLDMDHPE VVTELKNWGK WYVNTTNIDG <u>FRLDGLKHIK</u>	
301	301	317
Am-Lich	TVAEYWQND L GALENYLNKT NFNHVSFVDP LHYQFHAAS T QGGGYDMRKL	360
Am-Amylo	TVAEYWQNN A GKLENYLNKT SFNQSVFVDP LHFNLQAAS S QGGGYDMRRL	
Am-Stearo	<u>TVGEYWSYDI</u> NKLHNYITKT NGTMSLFDA P LHNKFYASK SGGA FDMRTL MTNTLMKDQP	

FIG. 5A

Am-Lich	361	LKSVTFVDNH	DTQPGQSLES	TVQTWFKPLA	YAFILTRESG	YPQVIFYGDMY	GTKGDSQREI	377
Am-Amylo		EKAVTFVENH	DTQPGQSLES	TVQTWFKPLA	YAFILTRESG	YPQVIFYGDMY	GTKGTSPKEI	420
Am-Stearo		<u>TLAVTFVDNH</u>	<u>DTNPAKR..CS</u>	HGRPWFKPLA	YAFILTRQEG	YPCVIFYGDYY	GI.....PQYNI	
Am-Lich	421	PALKHKIEPI	LKARKQYAYG	AQHDYFDHHD	IVGWTREGDS	SVANSGLAAL	ITDGPGGAKR	437
Am-Amylo		PSLKDNIEPI	LKARKEYAYG	PQHDYIDHPD	VIGWTREGDS	SAAKSGLAAL	ITDGPGGSKR	480
Am-Stearo		PSLKSIDPL	LIARRDYAYG	TQHDYLDHSD	IIGWTREGVT	EKPGSGLAAL	ITDGAGRSKW	
Am-Lich	481	MYVGRQNAGE	TWHDITGNRS	EPVVINSEGW	GEFHVNGGSV	SIYVQR.....		540
Am-Amylo		MYAGLKNAGE	TWYDITGNRS	DTVIGSDGW	GEFHVNDGSV	SIYVQK.....		
Am-Stearo		MYVGKQHAGK	VFYDLTGNRS	DTVTINSDGW	GEFKVNGGSV	SWVVPKTTV	STIARPIITR	
Am-Lich	541							
Am-Amylo								
Am-Stearo		PWTGEFVRWH	EPRLVAWP*					

FIG._5B

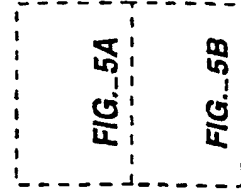


FIG._5