

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 515 218**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/32** (2006.01)

**C12N 9/28** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.10.1998** **E 10180200 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014** **EP 2386568**

54 Título: **Mutantes de  $\alpha$ -amilasa**

30 Prioridad:

**30.10.1997 DK 124097**  
**14.07.1998 DK 93698**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**29.10.2014**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)**  
**Krogshøjvej 36**  
**2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**BORCHERT, TORBEN VEDEL;**  
**SVENDSEN, ALLAN;**  
**ANDERSEN, CARSTEN;**  
**NIELSEN, BJARNE RØNFELDT;**  
**NISSSEN, TORBEN LAUESGAARD y**  
**KJÆRULFF, SØREN**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 515 218 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**

Mutantes de  $\alpha$ -amilasa

**CAMPO DE LA INVENCIÓN**

[0001] La presente invención se refiere a variantes (mutantes) de  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl progenitora con actividad más alta a temperaturas medias y/o pH alto.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

[0002] Las  $\alpha$ -amilasas ( $\alpha$ -1,4-glucan-4-glucanohidrolasas, EC 3.2.1.1) constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de almidón y otros oligo y polisacáridos 1.4-glucosídicos lineales y ramificados.

[0003] Hay un cuerpo muy extenso de patentes y bibliografía científica acerca de esta clase de enzimas muy importantes a nivel industrial. Un número de  $\alpha$ -amilasas como las variantes (mutantes) de  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl se conocen a partir de, por ejemplo, WO 90/11352, WO 95/10603, WO 95/26397, WO 96/23873 y WO 96/23874. Particularmente, WO 95/10603 divulga una variante de *B.licheniformis* o una amilasa que tiene un 60% de homología con esta y con una modificación en al menos uno de los residuos de aminoácidos localizados en la región 142-182, en particular una eliminación de todos los residuos de aminoácidos en la dicha región, o una parte sustancial de los mismos.

[0004] Entre descripciones más recientes acerca de las  $\alpha$ -amilasas, WO 96/23874 proporciona datos de estructuras cristalinas tridimensionales en rayos X para una  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl que consiste del 300 residuos de aminoácidos de N-terminal de la  $\alpha$ -amilasa *B. amyloliquefaciens* (BAN<sup>TM</sup>) y los aminoácidos 301-483 del extremo C-terminal de la  $\alpha$ -amilasa *B. licheniformis* que comprende la secuencia de aminoácidos (estando este último disponible comercialmente con el nombre comercial Termamyl<sup>TM</sup>), y que está así cercanamente relacionada con las  $\alpha$ -amilasas de *Bacillus* industrialmente importantes (que en el presente contexto están incluidas dentro del significado del término " $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl", y que incluyen, entre otras cosas, las  $\alpha$ -amilasas de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* (BAN<sup>TM</sup>) y *B. stearothermophilus* (BSG<sup>TM</sup>)). WO 96/23874 también describe la metodología para diseñar, sobre la base de un análisis de la estructura de una  $\alpha$ -amilasa progenitora tipo Termamyl, variantes de la  $\alpha$ -amilasa progenitora tipo Termamyl que presentan propiedades alteradas con respecto a la progenitora.

**DIVULGACIÓN BREVE DE LA INVENCIÓN**

[0005] La presente invención se refiere a nuevas variantes  $\alpha$ -amilolíticas (mutantes) de una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl, en particular variantes que exhiben mejor rendimiento de lavado (en relación a la  $\alpha$ -amilasa progenitora) con pH alto y a temperatura media.

[0006] El término "temperatura media" significa, en el contexto de la invención, una temperatura de 10°C a 60°C, preferiblemente 20°C a 50°C, especialmente 30-40°C.

[0007] El término "pH alto" significa que el pH alcalino que hoy se usa para lavar, más específicamente de aproximadamente pH 8 a 10,5.

[0008] En el contexto de la invención una " $\alpha$ -amilasa de baja temperatura" significa una  $\alpha$ -amilasa que tiene una actividad óptima relativa en el rango de temperatura de 0 a 30 °C.

[0009] En el contexto de la invención " $\alpha$ -amilasa de temperatura media" significa una  $\alpha$ -amilasa que tiene una actividad óptima en el rango de temperatura de 30 a 60°C. Por ejemplo, las  $\alpha$ -amilasas SP690 y SP722, respectivamente, son " $\alpha$ -amilasas de temperatura media".

[0010] En el contexto de la invención de una " $\alpha$ -amilasa de alta temperatura" es una  $\alpha$ -amilasa con la actividad óptima en el rango de temperatura de 60 a 110°C. Por ejemplo, Termamyl es una " $\alpha$ -amilasa de alta temperatura".

[0011] Las alteraciones en las propiedades que se pueden conseguir en las variantes (mutantes) de la invención son alteraciones en:

La estabilidad de la  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl a un pH de 8 a 10,5, y/o la estabilidad de  $\text{Ca}^{2+}$  a pH 8 a 10,5, y/o la actividad específica a temperaturas de 10 a 60°C, preferiblemente de 20 a 50°C, especialmente de 30 a 40°C.

[0012] Debe observarse que la temperatura relativa óptima frecuentemente depende del pH específico usado. En otras palabras, la temperatura relativa óptima determinada a, por ejemplo pH 8, puede ser sustancialmente diferente de la temperatura relativa óptima determinada a, por ejemplo, pH 10.

## 5 La influencia de la temperatura en la actividad enzimática

[0013] La dinámica en el sitio activo y el medio ambiente dependen de la temperatura y la composición de aminoácido y de la marcada importancia para la temperatura relativa óptima de una enzima. Al comparar la dinámica de las  $\alpha$ -amilasas de temperatura media y alta, pueden determinarse las regiones de importancia para la función de las  $\alpha$ -amilasas de temperatura alta a temperaturas medias. El perfil de actividad de temperatura de la  $\alpha$ -amilasa SP722 (SEQ ID NO: 2) y la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* (disponible de Novo Nordisk como Termamyl®) (SEQ ID NO: 4) se muestran en la **Figura 2**.

[0014] La temperatura relativa óptima de SP722 en actividades absolutas demuestra ser más alta a temperaturas de rango medio (30 a 60°C) que la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*, que tiene una actividad óptima a alrededor de 60 a 100°C. Los perfiles dependen principalmente de la estabilidad de la temperatura y la dinámica de los residuos de sitio activo y su medio ambiente. Además, los perfiles de la actividad dependen del pH usado y el pKa de los residuos de sitio activo.

[0015] En el primer aspecto la invención se refiere a una variante de una  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl progenitora, cuya variante tiene actividad de  $\alpha$ -amilasa y muestra estabilidad mejorada a pH 8 a 10,5 en relación con la alfa amilasa progenitora. Dicha variante comprende solo una mutación de la  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl progenitora, donde la única mutación del progenitor es una de las siguientes sustituciones; G149Y, S, K, A, T, C, F, H, W, V (utilizando la SEQ ID NO: numeración 6) y donde la  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl progenitora tiene al menos 95% de homología con la SEQ ID NO: 6.

[0016] Las variantes de la invención mencionadas arriba muestran una alteración en al menos una de las siguientes propiedades relativas a la  $\alpha$ -amilasa progenitora:

- i) mejor estabilidad de pH con un pH de 8 a 10,5; y/o
- ii) mejor estabilidad de  $\text{Ca}^{2+}$  con pH 8 a 10,5, y/o
- iii) actividad específica aumentada a temperaturas de 10 a 60 °C,

preferiblemente 20 a 50°C, especialmente 30 a 40°C. Además, se describirán detalles más abajo.

[0017] La invención además se refiere a constructos de ADN que codifican las variantes de la invención y al uso de variantes de la invención, solas o en combinación con otras enzimas, en diferentes productos o procesos industriales, por ejemplo, en detergentes o para licuefacción de almidón.

## 40 Nomenclatura

[0018] En la presente descripción y reivindicaciones, se usan los códigos los códigos de una y tres letras convencionales para residuos de aminoácidos.

[0019] Para facilidad de referencia, las variantes de  $\alpha$ -amilasa de la invención están descritas usando la siguiente nomenclatura:

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

[0020] Según esta nomenclatura, y a modo de ejemplo, la sustitución de alanina por asparraguina en la posición 30 está mostrada como:

Ala30Asn o A30N

una eliminación de alanina en la misma posición está mostrada como:

Ala30\* o A30\*

y la inserción de un residuo de aminoácido adicional, tal como lisina, está mostrada como:

Ala30AlaLys o A30AK

[0021] Una eliminación de una extensión consecutiva de residuos de aminoácidos, ejemplificados por los residuos de aminoácidos 30-33, está indicada como (30-33)\* o  $\Delta$ (A30-N33).

[0022] Donde una  $\alpha$ -amilasa específica contiene una "eliminación" en comparación con otras  $\alpha$ -amilasas y se hace una inserción en tal posición, esto se indica como:

\*36Asp o \*36D

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

Las mutaciones múltiples están separadas por signos de más, es decir:

Ala30Asp + Glu34Ser o A30N+E34S

5 representando mutaciones en las posiciones 30 y 34 sustituyendo la alanina y el ácido glutámico por asparagina y serina, respectivamente.

[0023] Cuando uno o más residuos de aminoácidos alternativos se pueden insertar en una posición dada, se indican como

10 A30N,E o  
A30N o A30E

15 [0024] Además, cuando una posición adecuada para la modificación está identificada en la presente sin ninguna modificación específica sugerida, debe entenderse que cualquier otro residuo de aminoácido puede ser sustituido por el residuo de aminoácido presente en esta posición. Así, por ejemplo, cuando se menciona una modificación de una alanina en la posición 30, pero no se especifica, debe entenderse que la alanina puede eliminarse o sustituirse por otro aminoácido, es decir, cualquiera de:

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

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0025]

25 La **Figura 1** es un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de seis  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl progenitora. Los números en la izquierda extrema designan las secuencias de aminoácidos respectivas de la siguiente manera:

30 1: SEQ ID NO: 2  
2: Kaoamyl  
3: SEQ ID NO: 1  
4: SEQ ID NO: 5  
5: SEQ ID NO: 4  
35 6: SEQ ID NO: 3.

La **Figura 2** muestra el perfil de actividad de temperatura de SP722 (SEQ ID NO: 2) (a pH 9) y  $\alpha$ -amilasa *B. licheniformis* (SEQ ID NO: 4) (a pH 7,3).

40 La **Figura 3** muestra el perfil de temperatura para SP690 (SEQ ID NO: 1), SP722 (SEQ ID NO: 2),  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* (SEQ ID NO: 4) a pH 10.

La **Figura 4** es un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de cinco  $\alpha$ -amilasas. Los números en la izquierda extrema designan las secuencias de aminoácidos respectivas de la siguiente manera:

45 1: amyp\_ratón  
2: amyp\_rata  
3: amyp\_cerdo alfa-amilasa pancreática porcina (PPA)  
4: amyp\_humano  
50 5: amy\_altha alfa-amilasa de *A. haloplanctis* (AHA)

## DIVULGACIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### La $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl

55 [0026] Es bien conocido que varias  $\alpha$ -amilasas producidas por el *Bacillus* spp. son altamente homólogas en el nivel aminoácido. Por ejemplo, se ha determinado que la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 (disponible a nivel comercial como Termamyl™) es homóloga en aproximadamente un 89% a la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 y homóloga en aproximadamente un 79% a la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3. Otras  $\alpha$ -amilasas homólogas incluyen una  $\alpha$ -amilasa derivada de una cepa de *Bacillus* sp. NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 o DSM 9375, todo lo cual se describe detalladamente en WO 95/26397, y la  $\alpha$ -amilasa descrita por Tsukamoto et al., 1988, Biochemical and Biophysical Research Communications, 151 (1988), páginas 25-31, (véase SEQ ID NO: 6).

65 [0027] Otras  $\alpha$ -amilasas homólogas incluyen la  $\alpha$ -amilasa producida por la cepa *B. licheniformis* descrita en EP 0252666 (ATCC 27811), y las  $\alpha$ -amilasas identificadas en WO 91/00353 y WO 94/18314. Otras  $\alpha$ -amilasas de *B.*

*licheniformis* de tipo Termamyl comerciales están incluidas en los productos Optitherm™ y Takatherm™ (disponible de Solvay), Maxamyl™ (disponible de Gist-brocades/Genencor), Spezym AA™ y Spezyme Delta AA™ (disponible de Genencor) y Keistase™ (disponible de Daiwa).

- 5 [0028] Debido a la homología sustancial encontrada entre estas  $\alpha$ -amilasas, estas se consideran parte de la misma clase de  $\alpha$ -amilasas, es decir, la clase de las " $\alpha$ --amilasas de tipo Termamyl".

[0029] Por consiguiente, en el contexto presente, el término " $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl" tiene el objetivo de indicar una  $\alpha$ -amilasa que, en el nivel aminoácido, muestra una homología sustancial con Termamyl™, es decir, la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* con una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 del presente. En otras palabras, todas las  $\alpha$ -amilasas siguientes que poseen las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 del presente, o las secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NO: 1 de WO 95/26397 (la misma secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 7 del presente) o en SEQ ID NO: 2 de WO 95/26397 (la misma secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8 del presente) o en Tsukamoto et al., 1988, (esta secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 6 del presente) se consideran " $\alpha$  amilasa de tipo Termamyl". Otras  $\alpha$ -amilasas de tipo Termamyl son  $\alpha$ -amilasas i) que muestra al menos un 60%, así como al menos un 70%, p. ej. al menos un 75%, o al menos un 80%, p. ej. al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de homología con al menos una de dichas secuencias de aminoácidos mostradas en SEQ ID NOS: 1-8 y/o ii) muestra reactividad cruzada inmunológica con un anticuerpo dirigido contra al menos una de dichas  $\alpha$ -amilasas, y/o iii) se codifica por una secuencia de ADN que se hibrida con las secuencias de ADN que codifican las  $\alpha$ -amilasas especificadas arriba, las cuales son evidentes a partir de las SEQ ID NOS: 9, 10, 11 o 12 de la solicitud presente (cuyas secuencias de codificación codifican las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID NOS: 1, 2, 3, 4 y 5 del presente, respectivamente), de la SEQ ID NO: 4 de WO 95/26397 (cuya secuencia de ADN, con el codón de terminación TAA, se muestra en SEQ ID NO: 13 del presente y codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8 del presente) y de SEQ ID NO: 5 de WO 95/26397 (mostrada en SEQ ID NO: 14 del presente), respectivamente.

[0030] Con relación a la propiedad i), la "homología" se puede determinar usando cualquier algoritmo convencional, preferiblemente usando el programa GAP de la versión 7.3 del paquete GCG (junio de 1993), usando valores predeterminados para las penalizaciones de GAP, que es una penalización por creación de GAP de 3.0 y penalización por extensión de GAP de 0.1 (Genetic Computer Group (1991) Programme Manual for the GCG Package, version 7, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711).

[0031] Un alineamiento estructural entre Termamyl (SEQ ID NO: 4) y una  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl pueden usarse para identificar posiciones equivalentes/correspondientes en otras alfa amilasas de tipo Termamyl. Un método de obtención de dicho alineamiento estructural es usar el programa Pile Up del paquete GCG utilizando los valores predeterminados de penalizaciones GAP, es decir, una penalización por creación de GAP de 3.0 y penalización por extensión de GAP de 0.1. Otros métodos de alineamiento estructural incluyen el análisis de agrupamientos hidrofóbicos (Gaboriaud et al., (1987), FEBS LETTERS 224, págs. 149-155 ) y enhebrado inverso (Huber, T; Torda, AE, PROTEIN SCIENCE Vol. 7, n.º 1 págs. 142-149 (1998)).

[0032] Propiedad ii) de la  $\alpha$ -amilasa, es decir, la reactividad cruzada inmunológica, se puede evaluar utilizando un anticuerpo dirigido contra, o reactivo con, al menos un epítipo de la  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl pertinente. El anticuerpo, que puede ser bien monoclonal o policlonal, se puede producir por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe por Hudson et al., Practical Immunology, Third edition (1989) , Blackwell Scientific Publications. La reactividad cruzada inmunológica se puede determinar utilizando ensayos conocidos en la técnica, ejemplos de los cuales son el análisis Western Blotting o el ensayo de inmunodifusión radial, por ejemplo, como se describe en Hudson et al., 1989. En este aspecto, se ha encontrado reactividad cruzada inmunológica entre las  $\alpha$ -amilasas que tienen las secuencias de aminoácidos SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, respectivamente.

[0033] La sonda de oligonucleótidos usada en la caracterización de la  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl conforme a la propiedad ii) anteriormente mencionada se puede preparar adecuadamente basándose en la secuencia total o parcial de nucleótidos o aminoácidos de la  $\alpha$ -amilasa en cuestión.

[0034] Condiciones adecuadas para probar la hibridación implican el empapado previo en 5xSSC y la prehibridación durante 1 hora a ~40 °C en una solución de formamida al 20%, solución del Denhardt 5x, fosfato sódico 50mM, pH 6,8 y 50mg de ADN de timo de ternero ultrasonificado desnaturalizado, seguido de hibridación en la misma solución suplementado con ATP 100mM durante 18 horas a ~40 °C, seguido de un lavado en tres veces del filtro en 2xSSC, SDS al 0,2% a 40 °C durante 30 minutos (baja astringencia) , preferido a 50 °C (astringencia media) , más preferiblemente a 65 °C (astringencia alta), incluso más preferiblemente a ~75 °C (astringencia altísima). Más detalles acerca del método de hibridación se pueden encontrar en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989 .

[0035] En el presente contexto, "derivado de" está destinado no solo 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 tal cepa y producida en un organismo huésped transformado con dicha secuencia de ADN. Finalmente, el término

se destina a indicar una  $\alpha$ -amilasa que se codifica 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 progenitora puede ser una variante de una  $\alpha$ -amilasa de origen natural, es decir, una variante que es el resultado de una modificación (inserción, sustitución, eliminación) de uno o más residuos de aminoácidos de la  $\alpha$ -amilasa de origen natural.  $\alpha$ -amilasas híbridas progenitoras

[0036] La  $\alpha$ -amilasa progenitora (es decir,  $\alpha$ -amilasa principal) 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.

[0037] La  $\alpha$ -amilasa híbrida progenitora puede ser una que, basándose en la homología de aminoácidos y/o reactividad cruzada inmunológica y/o hibridación de ADN (como se define anteriormente), se puede determinar que pertenece a la familia de  $\alpha$ -amilasa 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 una o varias otras  $\alpha$ -amilasas seleccionadas de  $\alpha$ -amilasas de tipo Termamyl o  $\alpha$ -amilasas de tipo no Termamyl de origen microbiano (fúngico o bacteriano) y/o mamífero.

[0038] Así, la  $\alpha$ -amilasa híbrida progenitora puede comprender una combinación de secuencias parciales de aminoácidos que derivan de al menos dos  $\alpha$ -amilasas de tipo Termamyl, o de al menos una 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 parcial de aminoácidos puede, *por ejemplo*, ser cualquiera de aquellas  $\alpha$ -amilasas de tipo Termamyl específicas a las que se hace referencia en este caso.

[0039] Por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa progenitora 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. amyloliquefaciens* o de una cepa de *B. stearothermophilus*. Por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa progenitora puede comprender al menos 430 residuos de aminoácidos de la parte C-terminal de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*, y puede, *por ejemplo*, comprender a) un segmento de aminoácidos correspondiente a los 37 residuos de aminoácidos N-terminales de la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 5 y un segmento de aminoácidos correspondiente a los 445 residuos de aminoácidos C-terminales de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada SEQ ID NO: 4 o una  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl híbrida que es idéntica a la secuencia de Termamyl, es decir, la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en la SEQ ID NO: 4, excepto 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  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO: 5; o b) un segmento de aminoácidos correspondiente a los 68 residuos de aminoácidos N-terminales de la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3 y un segmento de aminoácidos correspondiente a los 415 residuos de aminoácidos C-terminales de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4.

[0040] Otra  $\alpha$ -amilasa híbrida progenitora adecuada es la descrita previamente en WO 96/23874 (de Novo Nordisk) que constituye el N-término de BAN, la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (aminoácidos 1-300 de la proteína madura) y el C-término de Termamyl (aminoácidos 301-483 de la proteína madura).

[0041] Se logró actividad aumentada por sustitución de una o varias de las siguientes posiciones de la  $\alpha$ -amilasa híbrida anterior (BAN:1-300/Termamyl:301-483): Q360, F290 y N102. Sustituciones particularmente interesantes son una o varias de las siguientes sustituciones: Q360E, D; F290A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T; N102D, E;

[0042] Las posiciones correspondientes en la  $\alpha$ -amilasa SP722 mostrada en SEQ ID NO: 2 son uno o más de: S365, Y295, N106. Sustituciones correspondientes de interés particular en dicha  $\alpha$ -amilasa mostrada en SEQ ID NO: 2 son uno o más de: S365D, E; Y295 A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T y N106D, E.

[0043] Las posiciones correspondientes en la  $\alpha$ -amilasa SP690 mostrada en SEQ ID NO: 1 son uno o más de: S365, Y295, N106. Las sustituciones correspondientes de interés particular son uno o varios de: S365D, E; Y295 A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T; N106D, E.

[0044] La  $\alpha$ -amilasa tipo no Termamyl puede, por ejemplo, ser una  $\alpha$ -amilasa fúngica, una  $\alpha$ -amilasa de mamífero o vegetal o una  $\alpha$ -amilasa bacteriana (diferente de una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl). Entre los ejemplos específicos de tales  $\alpha$ -amilasas se incluyen la TAKA  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae*, la  $\alpha$ -amilasa ácida 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 dilucidadas que son marcadamente diferentes de la estructura de una  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl típica como se ha hecho referencia en este caso.

[0045] Las  $\alpha$ -amilasas fúngicas mencionadas más arriba, es decir, derivadas de *A. niger* y *A. oryzae*, son altamente homólogas a nivel de aminoácidos y se considera generalmente 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™.

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

[0047] En una forma de realización preferida de la invención, la  $\alpha$ -amilasa principal se deriva de *B. licheniformis* (como la  $\alpha$ -amilasa progenitora de tipo Termamyl), por ejemplo, una de aquellas a las que se hace referencia anteriormente, tales como la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4.

#### Propiedades alteradas de variantes de la invención

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

#### Estabilidad mejorada a pH 8-10,5

[0049] En el contexto de la presente invención, mutaciones (incluidas sustituciones de aminoácidos) de importancia respecto al logro de mejor estabilidad a pH alto (es decir, pH 8-10,5) incluyen mutaciones correspondientes a mutaciones en una o varias de las siguientes posiciones en  $\alpha$ -amilasa SP722 (con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2): T141, K142, F143, D144, F145, P146, G147, R148, G149, R181, A186, S193, N195, K269, N270, K311, K458, P459, T461.

[0050] La variante de la invención tiene una o varias de las siguientes sustituciones (utilizando el SEQ ID NO: numeración 2):

T141A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V;  
 K142A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 F143A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
 D144A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 F145A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
 P146A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y, V;  
 G147A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 R148A, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 G149A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K181A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 A186D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, P, K, M, F, S, T, W, Y, V;  
 S193A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, T, W, Y, V;  
 N195A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K269A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 N270A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K311A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 K458A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
 P459A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y, V;  
 T461A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V.

[0051] Las variantes de estabilidad de pH preferidas incluyen una o varias de las siguientes sustituciones en la  $\alpha$ -amilasa SP722 (con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2):

K142R, R181S, A186T, S193P, N195F, K269R, N270Y, K311R, K458R, P459T y T461P.

[0052] En formas de realización específicas la  $\alpha$ -amilasa de cepa *Bacillus* NCIB 12512 con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, o la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* con una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3, o la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* con una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4, la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* con una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 se usa como la estructura principal, es decir, la  $\alpha$ -amilasa progenitora de tipo Termamyl, para estas mutaciones.

[0053] Como puede verse a partir del alineamiento en la **Figura 1**, la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* ya tiene una tirosina en la posición correspondiente a N270 en SP722. Además, la  $\alpha$ -amilasa de cepa de *Bacillus* NCIB 12512, la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus*, la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* y la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* ya tienen arginina en la posición correspondiente a K458 en SP722. Además, la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* ya

tiene una prolina en la posición correspondiente a T461 en SP722. Por lo tanto, para dichas  $\alpha$ -amilasas, estas sustituciones no son pertinentes.

[0054] Las variantes de  $\alpha$ -amilasa con estabilidad mejorada a pH alto se pueden construir haciendo sustituciones en las regiones que se encuentran mediante la simulación de dinámica molecular mencionada en el ejemplo 2. La simulación representa la región/las regiones que tiene(n) una mayor flexibilidad o movilidad a pH alto (es decir, pH 8-10,5) cuando se comparan a un pH medio.

[0055] Mediante el uso de la estructura de cualquier alfa-amilasa bacteriana con homología (como se define a continuación) con la  $\alpha$ -amilasa de tipo (BA2), cuya estructura 3D se divulga en el Apéndice 1 de WO 96/23874 (de Novo Nordisk), es posible modelar la estructura de esas alfa-amilasas y someterlas a simulaciones de dinámica molecular. La homología de dicha  $\alpha$ -amilasa bacteriana puede ser al menos 60%, preferentemente ser más del 70%, más preferentemente más del 80%, más preferiblemente más de 90% homólogo a la  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl mencionada anteriormente (BA2), medida mediante el programa UWGCG GAP de la versión 7.3 del paquete GCG (junio de 1993) utilizando los valores predeterminados para las penalizaciones de GAP [Genetic Computer Group (1991) Programme Manual for the GCG Package, version 7, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711]. Podría corresponder la sustitución del residuo desfavorable por otro.

#### Estabilidad mejorada de $\text{Ca}^{2+}$ a pH 8-10.5

[0056] La estabilidad mejorada de  $\text{Ca}^{2+}$  significa que se ha mejorado la estabilidad de la enzima bajo disminución de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el contexto de la presente invención, las mutaciones (incluidas sustituciones de aminoácidos) de importancia respecto al logro de mejor estabilidad de  $\text{Ca}^{2+}$  a alto pH incluyen mutación o eliminación en una o más posiciones correspondientes a las siguientes posiciones en la  $\alpha$ -amilasa SP722 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2: R181, G182, D183, G184, K185, A186, W189, N195, N270, E346, K385, K458, P459.

[0057] Una variante de la invención tiene una o más de las siguientes sustituciones o eliminaciones:

R181\*, A, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
G182\*, A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
D183\*, A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
G184\*, A, R, D, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
K185A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
A18 6D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
W189A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, V;  
N195A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
N270A, R, D, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
E346A, R, D, N, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
K385A, R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
K458A, R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
P459A, R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y, V.

[0058] Se prefieren variantes con una o más de las siguientes sustituciones o eliminaciones:

R181Q,N; G182T,S,N; D183\*; G184\*;  
K185A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, M, N, F, P, S, T, W, Y, V; A18 6T, S, N, I, V;  
W189T,S,N,Q; N195F, N270R,D; E346Q; K385R; K458R; P459T.

[0059] En formas de realización específicas la  $\alpha$ -amilasa de cepa *Bacillus* NCIB 12512 con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, o la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5, o la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* con una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4 se usan como la estructura principal para estas mutaciones.

[0060] Como puede verse a partir del alineamiento en la **Figura 1** la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* no tiene las posiciones correspondientes a D183 y G184 en SP722. Por lo tanto, para dichas  $\alpha$ -amilasas estas eliminaciones no son pertinentes.

[0061] En una forma de realización preferida la variante es la  $\alpha$ -amilasa de cepa *Bacillus* NCIB 12512 con eliminaciones en D183 y G184 y además una de las siguientes sustituciones: R181Q, N y/o G182T, S, N y/o D183\*; G184\* y/o K185A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, M, N, F, P, S, T, W, Y, V y/o A186T, S, N, I, V y/o W189T,S,N,Q y/o N195F y/o N270R, D y/o E346Q y/o K385R y/o K458R y/o P459T.

#### Actividad específica aumentada a temperatura media

[0062] En otro aspecto de la presente invención, las mutaciones importantes respecto a la obtención de variantes que muestren actividad específica aumentada a temperaturas de 10 a 60°C, preferiblemente 20 a 50°C,



especialmente 30 a 40°C, incluyen mutaciones correspondientes con una o varias de las siguientes posiciones en el  $\alpha$ -amilasa SP722 con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2:

5 H107, K108, G109, D166, W167, D168, Q169, S170, R171, Q172, F173, Q174, D183, G184, N195, F267, W268, K269, N270, D271, L272, G273, A274, L275, G456, N457, K458, P459, G460, T461, V462, T463.

[0063] La variante de la invención tiene una o varias de las siguientes sustituciones:

10 H107A, D, R, N, C, E, Q, G, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
K108A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
G109A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
D166A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
W167A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, V;  
D168A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
15 Q169A, D, R, N, C, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
S170A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, T, W, Y, V;  
R171A, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
Q172A, D, R, N, C, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
F173A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
20 Q174\*, A, D, R, N, C, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
D183\*, A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V;  
G184\*, A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
N195A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
F267A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
25 W268A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, V;  
K269A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
N270A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
D271A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
L272A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
30 G273A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
A274D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
L275A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
G456A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
N457A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
35 K458A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
P459A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y, V;  
G460A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
T461A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V;  
V462A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y;  
40 T463A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V.

[0064] Las variantes preferidas tienen una o varias de las siguientes sustituciones o eliminaciones: Q174\*, D183\*, G184\*, K269S.

45 [0065] En una forma de realización específica el  $\alpha$ -amilasa *B. licheniformis* con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4 se usa como la estructura principal para estas mutaciones.

#### Mutaciones generales en variantes de la invención: actividad específica aumentada a temperaturas medias

50 [0066] Las sustituciones de aminoácidos particularmente interesantes son aquellas que aumentan la movilidad alrededor del sitio activo de la enzima. Este se realiza por cambios que interrumpen la interacción estabilizante en la proximidad del sitio activo, es decir, dentro de preferiblemente 10Å o 8Å o 6Å o 4Å de cualquiera de los residuos que constituyen el sitio activo.

55 [0067] Ejemplos son mutaciones que reducen el tamaño de cadenas laterales, tales como

60 Ala a Gly,  
Val a Ala o Gly,  
Ile o Leu to Val, Ala o Gly  
Thr a Ser

[0068] Se prevé que tales mutaciones causen flexibilidad aumentada en la región de sitio activo bien por la introducción de cavidades o por las reestructuraciones estructurales que rellenan el espacio que deja la mutación.

65 [0069] Se puede preferir que una variante de la invención comprenda una o varias modificaciones además de las descritas más arriba. De esta manera, puede ser ventajoso que uno o más residuos de prolina presentes en la parte

de la variante de  $\alpha$ -amilasa que se ha modificado se sustituya(n) por un residuo distinto de prolina el cual puede ser cualquiera de los residuos distintos de prolina de origen natural posibles, y el cual es preferiblemente una alanina, glicina, serina, treonina, valina o leucina.

5 [0070] Análogamente, puede ser preferible sustituir ese o más residuos de cisteína presentes en los residuos de aminoácidos, con los cuales se modifica la  $\alpha$ -amilasa parental, por unos residuos distintos de cisteína tales como serina, alanina, treonina, glicina, valina o leucina.

10 [0071] Además, una variante de la invención se puede modificar bien como única modificación o en combinación con cualquiera de las modificaciones descritas arriba de modo que se sustituya uno o más Asp y/o Glu presentes en un fragmento de aminoácidos correspondiente al fragmento de aminoácidos 185-209 de la SEQ ID NO: 4 por un Asn y/o Gln, respectivamente. También es de interés, en la  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl, la sustitución de uno o más de los residuos de Lys presentes en un fragmento de aminoácidos correspondiente al fragmento de aminoácidos 185-209 de la SEQ ID NO: 8 4 por un Arg.

15 [0072] Se entiende que la presente invención comprende variantes que incorporan dos o más de las modificaciones descritas más arriba.

20 [0073] Además, puede ser ventajoso introducir mutaciones puntuales en cualquiera de las variantes descritas aquí.

Variantes de  $\alpha$ -amilasas que tienen movilidad aumentada alrededor del sitio activo:

25 [0074] La movilidad de variantes de  $\alpha$ -amilasa de la invención se puede aumentar por sustitución de uno o varios residuos de aminoácido a una o más posiciones cerca del sitio de sustrato. Estas posiciones son (utilizando la  $\alpha$ -amilasa SP722 (SEQ ID NO: 2) numeración): V56, K108, D168, Q169, Q172, L201, K269, L272, L275, K446, P459.

[0075] Por lo tanto, en un aspecto, la invención se refiere a variantes que mutan en unas o más de las posiciones anteriormente mencionadas.

30 [0076] Las sustituciones preferidas son una o más de las siguientes: V56A, G, S, T;

K108A, D, E, Q, G, H, I, L, M, N, S, T, V;  
D168A, G, I, V, N, S, T;  
Q169A, D, G, H, I, L, M, N, S, T, V;  
35 Q172A, D, G, H, I, L, M, N, S, T, V;  
L201A, G, I, V, S, T;  
K269A, D, E, Q, G, H, I, L, M, N, S, T, V;  
L272A, G, I, V, S, T;  
L275A, G, I, V, S, T;  
40 Y295A, D, E, Q, G, H, I, L, M, N, F, S, T, V;  
K44 6A, D, E, Q, G, H, I, L, M, N, S, T, V;  
P459A, G, I, L, S, T, V.

45 [0077] En formas de realización específicas de la invención la  $\alpha$ -amilasa de cepa Bacillus NCIB 12512 con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, o la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* con una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3, o la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4, la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* con una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5 se usan como la estructura principal para estas mutaciones.

50 [0078] Como puede verse a partir del alineamiento en la **Figura 1** la  $\alpha$ -amilasa *B. licheniformis* y el  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* tienen un glutamina en la posición correspondiente a K269 en SP722. Además, la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* tiene una serina en la posición correspondiente a K269 en SP722. Por lo tanto, para dichas  $\alpha$ -amilasas, estas sustituciones no son pertinentes.

55 [0079] Además, como puede verse a partir del alineamiento en la **Figura 1** de la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* tiene una alanina en la posición correspondiente a L272 en SP722, y la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* tiene una isoleucina en la posición correspondiente a L272 en SP722. Por lo tanto, para dichas  $\alpha$ -amilasas, estas sustituciones no son pertinentes.

60 [0080] Como puede verse a partir del alineamiento en la **Figura 1**, la  $\alpha$ -amilasa de cepa de *Bacillus* 12512 tiene una isoleucina en la posición correspondiente a L275 en SP722. Por lo tanto para dicha  $\alpha$ -amilasa esta sustitución no es pertinente.

65 [0081] Como puede verse a partir del alineamiento en la **Figura 1** la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* tiene una fenilalanina en la posición correspondiente a Y295 en SP722. Además, la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* tiene

una asparagina en la posición correspondiente a Y295 en SP722. Por lo tanto, para dichas  $\alpha$ -amilasas, estas sustituciones no son pertinentes.

[0082] Como puede verse a partir del alineamiento en la **Figura 1** la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* y la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* tener una asparagina en la posición correspondiente a K446 en SP722. Además, la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* tiene una histidina en la posición correspondiente a K446 en SP722. Por lo tanto, para dichas  $\alpha$ -amilasas, estas sustituciones no son pertinentes.

[0083] Como puede verse a partir del alineamiento en la **Figura 1** la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*, la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* y la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* tienen una serina en la posición correspondiente a P459 en SP722. Además, la  $\alpha$ -amilasa de cepa *Bacillus* 12512 tiene una treonina en la posición correspondiente a P459 en SP722. Por lo tanto, para dichas  $\alpha$ -amilasas, estas sustituciones no son pertinentes.

#### Estabilización de enzimas con alta actividad a temperaturas de medio

[0084] En otra forma de realización la invención se refiere a mejorar la estabilidad de  $\alpha$ -amilasas de temperatura baja (p. ej. *Alteromonas haloplanctis* (Feller et al., (1994), Eur. J. Biochem 222:441-447), y  $\alpha$ -amilasas de temperatura media (por ejemplo, SP722 y SP690) que poseen actividad de temperatura media, es decir, comúnmente conocidas como enzimas psicrófilas y enzimas mesófilas. Para esta clase de enzima particular, la estabilidad puede entenderse bien como termoestabilidad o la estabilidad con condiciones de disminución de calcio.

[0085] Típicamente, las enzimas que muestran actividad alta a temperaturas medias también muestran problemas severos bajo condiciones que estresan la enzima, tal como temperatura o disminución de calcio.

[0086] Por consiguiente, el objetivo es proporcionar enzimas que al mismo tiempo muestren la actividad alta deseada a temperaturas medias sin perder su actividad bajo condiciones ligeramente estresadas.

[0087] La actividad de la variante estabilizada medida a temperaturas medias debería preferiblemente estar entre 100 % o más y 50 %, y de forma más preferible entre 100 % o más y 70 %, y de la forma más preferible entre 100% o más y 85 % de actividad original a temperatura específica antes de la estabilización de la enzima y la enzima resultante debería resistir la incubación más prolongada a condición estresada que la enzima de tipo salvaje.

[0088] Las enzimas contempladas incluyen  $\alpha$ -amilasas de, por ejemplo, origen bacteriano o fúngico.

[0089] Un ejemplo de tal  $\alpha$ -amilasa de temperatura baja es la aislada de *Alteromonas haloplanctis* (Feller et al., (1994), Eur. J. Biochem 222:441-447 ). La estructura cristalina de esta alfa-amilasa ha sido resuelta (Aghajari et al., (1998), Protein Science 7:564-572 ).

[0090] La alfa-amilasa de *A. haloplanctis* (5 en el alineamiento mostrado en la **Fig. 4**) tiene una homología de aproximadamente 66% con la alfa-amilasa pancreática porcina (PPA) (3 en el alineamiento mostrado en la **Fig. 4**). La estructura 3D de la PPA es conocida, y puede obtenerse de la base de datos de Brookhaven bajo el nombre 10SE o 1DHK. Sobre la base de la homología con otras alfa amilasas más estables, la estabilización de "enzima altamente activa a baja temperatura" de alfa-amilasa *Alteromonas haloplanctis* puede obtenerse y al mismo tiempo mantener la actividad alta deseada a temperaturas medias.

[0091] La **Figura 4** muestra alineamientos de secuencia múltiple de cinco  $\alpha$ -amilasas, incluidas las  $\alpha$ -amilasas de AHA y PPA. Mutaciones específicas que dan estabilidad aumentada en alfa-amilasa de *Alteromonas haloplanctis*:

T66P, Q69P, R155P, Q177R, A205P, A232P, L243R, V295P, S315R.

#### Métodos para preparar variantes de $\alpha$ -amilasa

[0092] Diferentes métodos para introducir mutaciones en genes se conocen en la técnica. Después de una breve discusión de la clonación de secuencias de ADN que codifican  $\alpha$ -amilasa, se discutirán métodos para generar mutaciones en sitios específicos en la secuencia codificante de  $\alpha$ -amilasa.

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

[0093] La secuencia de ADN que codifica una  $\alpha$ -amilasa parental se puede aislar a partir de cualquier célula o microorganismo que produzca la  $\alpha$ -amilasa en cuestión, usando diferentes métodos bien conocidos en la técnica. En primer lugar, se debería construir un ADN genómico y/o biblioteca de ADNc usando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la  $\alpha$ -amilasa objeto de estudio. Después, si se conoce la secuencia de aminoácidos de la  $\alpha$ -amilasa, se pueden sintetizar sondas oligonucleótidas homólogas y marcadas y usarlas para identificar clones que codifiquen  $\alpha$ -amilasas a partir de una biblioteca genómica preparada 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 se podría usar como sonda para identificar clones que codifiquen  $\alpha$ -amilasas, usando unas condiciones de hibridación y de lavado de menor astringencia.

[0094] Otro método para identificar clones que codifican  $\alpha$ -amilasa implicaría la inserción de fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformando bacterias  $\alpha$ -amilasa negativas con la biblioteca de ADN genómico resultante, y luego disponer en placas las bacterias transformadas sobre agar con un sustrato para  $\alpha$ -amilasa, de ese modo permitiendo que los clones que expresan la  $\alpha$ -amilasa sean identificados.

[0095] Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la enzima se puede preparar sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de fosforamidita descrito por S.L. Beaucage and M.H. Caruthers (1981) o el método ha descrito por Matthes et al. (1984). En el método de fosforamidita, se sintetizan oligonucleótidos, p. ej., en un sintetizador de ADN automático, se purifican, anillan, ligan y clonan en vectores apropiados.

[0096] Finalmente, la secuencia de ADN puede ser de origen mezclado genómico y sintético, mezclado sintético y de ADN o mezclado genómico y de ADNc, preparado mediante la ligadura de fragmentos de origen sintético genómico o de ADN (según convenga, los fragmentos correspondientes a diferentes partes de la secuencia completa de ADN), conforme a técnicas estándar. La secuencia de ADN también se puede preparar mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo según se describe en US 4,683,202 or R.K. Saiki et al. (1988 ).

#### Expresión de las variantes de $\alpha$ -amilasa

[0097] Según la invención, una secuencia de ADN que codifica la variante producida por 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 las secuencias de control que codifican un promotor, operador, sitio de unión al ribosoma, señal de iniciación de la traducción, y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores.

[0098] El vector de expresión recombinante que lleva la secuencia de ADN que codifica una variante de  $\alpha$ -amilasa de la variante de la invención puede ser cualquier vector que pueda ser sometido convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que debe ser introducido. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido, un bacteriófago o un elemento extracromosómico, minicromosoma o un cromosoma artificial. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el (los) cromosoma(s) en el (los) que ha sido integrado.

[0099] En el vector, la secuencia de ADN debería estar operativamente conectada a una secuencia del promotor adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede ser derivada de genes que codifican proteínas bien homólogas 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 operón *lac* de *E. coli*, los promotores del gen *dagA* de agarasa 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 la  $\alpha$ -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 aquellos derivados del gen que codifica la TAKA amilasa de *A. oryzae*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la  $\alpha$ -amilasa neutra de *A. niger*, la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido de *A. niger*, la glucoamilasa de *A. niger*, la lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteasa alcalina de *A. oryzae*, la triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae* o la acetamidasa de *A. nidulans*.

[0100] El vector de expresión de la invención puede también comprender un terminador de transcripción adecuado y, en eucariotas, las secuencias de poliadenilación conectadas operativamente a la secuencia de ADN que codifica la variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención. Las secuencias de terminación y poliadenilación pueden adecuadamente derivar de las mismas fuentes que el promotor.

[0101] 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 plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

[0102] El vector puede también comprender un marcador seleccionable, p. ej., un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped, tal como los genes *dal* de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, o uno que confiere resistencia antibiótica tal como resistencia a la ampicilina, la canamicina, el cloranfenicol o la tetraciclina. Además, el vector puede incluir marcadores *Aspergillus* de selección tales como *amdS*, *argB*, *niaD* y *sC*, un marcador que da lugar a resistencia a higromicina, o la selección se puede realizar por co-transformación, por ejemplo como se describe en WO 91/17243.

[0103] Mientras que la expresión intracelular puede ser ventajosa en algunos aspectos, por ejemplo, cuando se usan bacterias determinadas como células huésped, generalmente se prefiere que la expresión sea extracelular. En

general, las  $\alpha$ -amilasas de *Bacillus* mencionadas aquí 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, convenientemente realizada por sustitución de las secuencias de ADN que codifican las prerregiones respectivas.

[0104] Los procedimientos usados para enlazar 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 vectores adecuados conteniendo la información necesaria para la replicación, son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2.<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor, 1989 ).

[0105] 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, se utiliza ventajosamente como célula huésped en la producción recombinante de una variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención. La célula se puede transformar 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 se considera generalmente una ventaja ya que la secuencia de ADN es más propensa a ser mantenida de forma estable en la célula. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped se puede realizar según métodos convencionales, p. ej., por recombinación homóloga o heteróloga. Alternativamente, la célula se puede transformar con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en relación con los diferentes tipos de células huésped.

[0106] La célula de la invención puede ser una célula de un organismo superior tal como un mamífero o un insecto, pero es preferiblemente una célula microbiana, por ejemplo, una célula bacteriana o fúngica (incluida la levadura).

[0107] Ejemplos de bacterias adecuadas son las bacterias Gram positivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, or *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus* o bacterias gram negativas tal como *E.coli*. La transformación de las bacterias puede, por ejemplo, efectuarse por transformación de protoplastos o usando células competentes de una manera conocida per se.

[0108] El organismo de levadura puede ser seleccionado favorablemente de unas especies de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. El hongo filamentoso puede ventajosamente pertenecer a unas especies de *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*. Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguida de la regeneración de la pared celular en cierto modo conocido *per se*. Un procedimiento adecuado para la transformación de células huésped de *Aspergillus* se describe en EP 238 023.

[0109] En aún otro aspecto, 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 como se ha descrito anteriormente bajo condiciones propicias para la producción de la variante y a la recuperación de la variante de las células y/o medio de cultivo.

[0110] El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de la célula huésped en cuestión y la obtención de la expresión de la variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas (p. ej., como se describe en catálogos de the American Type Culture Collection).

[0111] La variante de  $\alpha$ -amilasa segregada de las células huésped pueden convenientemente ser recuperadas del medio de cultivo por procedimientos bien conocidos, incluida la separación de las células del medio por centrifugado o filtración, y la precipitación de los componentes proteináceos del medio mediante una sal tal como sulfato de amonio, seguido del uso de procedimientos cromatográficos tales como cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de afinidad, o similar.

#### Aplicaciones industriales

[0112] Las variantes de  $\alpha$ -amilasa de esta invención poseen propiedades valiosas que permiten una variedad de aplicaciones industriales. En particular, las variantes enzimáticas de la invención son aplicables como componente en el lavado, el lavado de la vajilla y composiciones de detergentes de limpieza de superficies rígidas.

[0113] Numerosas variantes son particularmente útiles en la producción de edulcorantes y etanol a partir de almidón, y/o para el desencolado textil. Condiciones para los procesos de conversión de almidón convencional, incluidos licuefacción de almidón y/o procesos de sacarificación, se describen en, por ejemplo, US 3,912,590 y en publicaciones de patentes EP n.º 252,730 y 63,909.

#### Composiciones detergentes

[0114] Como se ha mencionado anteriormente, variantes de la invención pueden ser incorporadas adecuadamente en composiciones detergentes. Se hace referencia, por ejemplo, a WO 96/23874 y WO 97/07202 para detalles adicionales en lo que se refiere a ingredientes pertinentes de composiciones de detergentes (tales como detergentes para lavar la ropa o la vajilla), métodos apropiados de formulación de las variantes en tales composiciones de detergentes, y a ejemplos de tipos pertinentes de composiciones de detergentes.

[0115] Composiciones de detergentes que comprenden una variante de la invención pueden adicionalmente comprender una o más enzimas adicionales, tales como una lipasa, cutinasa, proteasa, celulasa, peroxidasa o lacasa, y/u otra  $\alpha$ -amilasa.

[0116] Las variantes de  $\alpha$ -amilasa de la invención pueden ser incorporadas en detergentes a las concentraciones empleadas de forma convencional. Actualmente se contempla que una variante de la invención se puede incorporar en una cantidad correspondiente a 0,00001-1 mg (calculada como proteína enzimática pura activa) de  $\alpha$ -amilasa por litro de solución de detergente para lavar la ropa/la vajilla usando niveles de dosificación convencionales de detergente.

[0117] La invención también se refiere a un método de provisión de  $\alpha$ -amilasas con 1) pH óptimo alterado, y/o 2) temperatura óptima alterada y/o 3) estabilidad mejorada, comprendiendo los pasos siguientes:

i) identificación de (una) posición (posiciones) objetivo y/o región (regiones) para la mutación de la  $\alpha$ -amilasa comparando la dinámica molecular de dos o más estructuras 3D de  $\alpha$ -amilasas que tienen perfiles de pH, temperatura y/o estabilidad sustancialmente diferentes,  
ii) sustitución, adición y/o eliminación de uno o más aminoácidos en la posición/posiciones y/o región (regiones) identificada(s).

[0118] En la forma de realización de la invención, una  $\alpha$ -amilasa de temperatura media se compara con una  $\alpha$ -amilasa de alta temperatura. En otra forma de realización, una  $\alpha$ -amilasa de temperatura baja se compara con una  $\alpha$ -amilasa de temperatura media o alta.

[0119] Las  $\alpha$ -amilasas comparadas deberían preferiblemente ser como mínimo 70 %, preferiblemente 80%, hasta 90 %, tal como hasta 95 %, especialmente 95% homólogas entre sí.

[0120] Las  $\alpha$ -amilasas comparadas pueden ser  $\alpha$ -amilasas de tipo Termamyl tal como se ha definido anteriormente. En la forma de realización específica las  $\alpha$ -amilasas comparadas son las  $\alpha$ -amilasas mostradas en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 8.

[0121] En otra forma de realización, el perfil de estabilidad de las  $\alpha$ -amilasas en cuestión comparado es el perfil de dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Enzimas:

#### [0122]

SP722: (SEQ ID NO: 2, disponible de Novo Nordisk)  
Termamyl<sup>TM</sup> (SEQ ID NO: 4, disponible de Novo Nordisk)  
SP690: (SEQ ID NO: 1, disponible de Novo Nordisk)

*Bacillus subtilis* SHA273: véase WO 95/10603

### Plásmidos

[0123] pJE1 contiene el gen que codifica una variante de  $\alpha$ -amilasa SP722 (SEQ ID NO: 2): es decir, eliminación de 6 nucleótidos correspondientes a los aminoácidos D183-G184 en la proteína madura. La transcripción del gen JE1 es dirigida desde el promotor *amyL*. El plásmido además contiene el origen de replicación y el gen cat que confieren resistencia hacia canamicina obtenida de plásmido pUB110 (Gryczan, TJ et al. (1978), J. Bact. 134:318-329).

### **Métodos:**

#### Construcción de vector de biblioteca pDorK101

[0124] El vector transportador *E.coli/Bacillus* pDorK101 (descrito más abajo) puede utilizarse para introducir mutaciones sin expresión de  $\alpha$ -amilasa *E. coli* y luego ser modificadas de manera tal que la  $\alpha$ -amilasa es activa en *Bacillus*. El vector fue construido de la siguiente manera: El gen de codificación JE1 (SP722 con la eliminación de

D183-G184) fue inactivado en pJE1 por interrupción de gen en el sitio PstI en la región de codificación 5' de SEQ ID NO: 2: SP722 por un fragmento de 1,2 kb que contiene un origen de replicación de *E. coli*. Este fragmento fue amplificado por PCR a partir del pUC19 (GenBank Accession #:X02514) utilizando el cebador directo: 5'-gacctgcagtcaggcaacta-3' y el cebador inverso: 5'-tagagtcgacctgcaggcat-3'. El amplicon PCR y el vector pJE1 fueron digeridos con PstI a 37°C durante 2 horas. El fragmento del vector pJE1 y el fragmento de PCR fueron ligados a temperatura ambiente durante 1 hora y transformados en el *E. coli* por electrotransformación. El vector resultante es designado pDorK101.

#### Ensayos de selección de filtro

[0125] El ensayo puede utilizarse para selección de variantes de  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl con una estabilidad mejorada a pH alto en comparación con la enzima progenitora y variantes de pH-amilasa de tipo Termamyl con una estabilidad mejorada a pH alto y temperaturas medias en comparación con la enzima progenitora dependiendo de la preparación de temperatura de selección.

#### Ensayo de filtro con pH alto

[0126] Bibliotecas de *Bacillus* se colocan en un sándwich de acetato de celulosa (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) - y filtros de nitrocelulosa (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) en placas de agar TY con 10  $\mu$ g/ml de kanamicina a 37 °C durante al menos 21 horas. La capa de acetato de celulosa se encuentra en la placa de agar TY.

[0127] Cada sándwich de filtro se marca específicamente con una aguja después de la colocarse en placa, pero antes de la incubación con el fin de poder localizar variantes positivas en el filtro y el filtro de nitrocelulosa con variantes enlazadas se transfiere a un recipiente con tampón de glicina-NaOH, pH 8,6-10,6 y se incubó a temperatura ambiente (puede alterarse de 10° a 60°C) durante 15 min. Los filtros de acetato de celulosa con colonias se almacenan en las placas TY a temperatura ambiente hasta su uso. Después de la incubación, se detecta actividad residual en placas que contenían agarosa al 1%, almidón al 0,2% en tampón de glicina-NaOH, pH 8,6-10,6. Las placas de ensayo con filtros de nitrocelulosa se marcan de la misma manera que el sándwich de filtro y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la eliminación de los filtros, las placas de ensayo se tiñeron con una solución de Lugol al 10%. Variantes degradantes del almidón son detectadas como puntos blancos sobre un fondo azul oscuro y luego se identifican en las placas de almacenamiento. Variantes positivas se volvieron a seleccionar dos veces bajo las mismas condiciones que la primera selección.

#### Ensayo de filtro de bajo nivel de calcio

[0128] La Biblioteca de *Bacillus* se coloca en placas en un sándwich de acetato de celulosa (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) - y filtros de nitrocelulosa (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) en placas de agar TY con un antibiótico pertinente, por ejemplo, canamicina o cloranfenicol, a 37°C durante 21 horas como mínimo. La capa de acetato de celulosa se encuentra en la placa de agar TY.

[0129] Cada sándwich de filtro se marca específicamente con una aguja después de la colocarse en placa, pero antes de la incubación con el fin de poder localizar variantes positivas en el filtro y el filtro de nitrocelulosa con variantes enlazadas se transfiere a un recipiente con tampón de carbonato/bicarbonato, pH 8,5-10 y con diferentes concentraciones de EDTA (0,001 mM - 100 mM). Los filtros se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. Los filtros de acetato de celulosa con colonias se almacenan en las placas TY a temperatura ambiente hasta su uso. Después de la incubación, se detecta actividad residual en placas que contenían 1% de agarosa, 0,2% de almidón en tampón de carbonato/bicarbonato, pH 8,5-10. Las placas de ensayo con filtros de nitrocelulosa se marcan de la misma manera que el sándwich de filtro y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la eliminación de los filtros, las placas de ensayo se tiñeron con una solución de Lugol al 10%. Variantes degradantes del almidón son detectadas como puntos blancos sobre un fondo azul oscuro y luego se identifican en las placas de almacenamiento. Variantes positivas se volvieron a seleccionar dos veces bajo las mismas condiciones que la primera selección.

#### Método para obtener las regiones de interés:

[0130] Hay tres estructuras 3D conocidas de  $\alpha$ -amilasas bacterianas. Dos de  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*, base de datos de Brookhaven 1BPL (Machius et al. (1995), J. Mol. Biol. 246, p. 545-559 ) y 1VJS (Song et al. (1996), Enzymes for Carbohydrate 163 Engineering (Prog. Biotechnol. V 12 ). Estas dos estructuras carecen de una pieza importante de la estructura del denominado dominio B, en la región alrededor del dos iones de calcio y unos sitios de unión iónica de sodio. Por lo tanto, hemos usado una estructura tridimensional de una  $\alpha$ -amilasa BA2 (WO 96/23874 que son un híbrido entre BAN™ (SEQ ID NO. 5) y  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* (SEQ ID NO. 4). Sobre la base de la estructura se ha construido un modelo de alfa-amilasa *B. licheniformis* y alfa-amilasa SP722.

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

[0131] La fermentación y la purificación se pueden realizar mediante métodos bien conocidos en la técnica.

#### Determinación de la estabilidad

5 [0132] Todos los ensayos de estabilidad se hacen utilizando la misma configuración. El método es:

La enzima se incubó bajo las condiciones pertinentes (1-4). Las muestras se tomaron en diferentes puntos temporales; por ejemplo, después de 0, 5, 10, 15 y 30 minutos y se diluyeron 25 veces (la misma dilución para todas las muestras tomadas) en el tampón de ensayo (0,1M 50mM Tampón de Britton pH 7,3) y la actividad se midió utilizando el ensayo Phadebas (Pharmacia) bajo condiciones estándar pH 7,3, 37°C.

[0133] La actividad medida antes de la incubación (0 minutos) se utilizó como referencia (100%). El descenso en el porcentaje se calculó como función del periodo de incubación. La tabla muestra la actividad residual después de, por ejemplo, 30 minutos de incubación.

#### Determinación de actividad específica

[0134] La actividad específica se determinó utilizando el ensayo Phadebas (Pharmacia) como actividad/mg de enzima. Se siguen las instrucciones del fabricante (ver también a continuación en "Ensayo para la actividad  $\alpha$ -amilasa").

#### Ensayos para actividad de $\alpha$ -amilasa

##### 1. Ensayo Phadebas

[0135] La actividad de  $\alpha$ -amilasa se determina por un método utilizando comprimidos Phadebas® como sustrato. Los comprimidos de Phadebas (ensayo de amilasa de Phadebas®, suministrado por Pharmacia Diagnostic) contienen un polímero de almidón coloreado de azul insoluble entrecruzado que se ha mezclado con albúmina de suero bovino y una sustancia de tampón y se ha dispuesto en comprimidos.

[0136] Para cada medida se suspende un comprimido en un tubo que contiene 5 mL de tampón Britton-Robinson 50 mM (ácido acético 50 mM, ácido fosfórico 50 mM, ácido bórico 50 mM,  $\text{CaCl}_2$  0,1 mM, el pH se ajusta al valor de interés con NaOH). La prueba se realiza en un baño maría a la temperatura de interés. La  $\alpha$ -amilasa que debe ser evaluada se diluye en x mL de tampón Britton-Robinson 50 mM. 1 mL de esta solución de  $\alpha$ -amilasa se añade a 5 mL del tampón Britton-Robinson 50 mM. El almidón se hidroliza por la  $\alpha$ -amilasa dando fragmentos azules solubles. La absorbancia de la solución azul resultante, medida espectrofotométricamente a 620 nm, está en función de la actividad de  $\alpha$ -amilasa.

[0137] Es importante que la absorbancia medida a 620 nm después de 10 o 15 minutos de incubación (tiempo de prueba) esté en el rango de 0,2 a 2,0 unidades de absorbancia a 620 nm. En este rango de absorbancia hay linealidad entre la actividad y la absorbancia (ley de Lambert-Beer). La dilución de la enzima debe por lo tanto ajustarse en base a este criterio. Bajo un conjunto específico de condiciones (temp., pH, tiempo de reacción, condiciones de tampón) 1 mg de una  $\alpha$ -amilasa dada hidrolizará una cantidad determinada de sustrato y se producirá un color azul. La intensidad del color se mide a 620 nm. La absorbancia medida es directamente proporcional a la actividad específica (actividad/mg de proteína de  $\alpha$ -amilasa pura) de la  $\alpha$ -amilasa en cuestión bajo el conjunto de condiciones dadas).

##### 2. Método alternativo

[0138] La actividad de  $\alpha$ -amilasa se determina por medio de un método que utiliza el sustrato PNP-G7. PNP-G7, que es una abreviatura de p-nitrofenil-alfa, D-maltoheptaósido, es un oligosacárido bloqueado que puede ser dividido por una endoamilasa. Después de la escisión, la alfa-glucosidasa incluida en el kit asimila el sustrato para liberar una molécula de PNP libre que tiene un color amarillo y, de este modo, se puede medir por espectrofotometría visible en  $\lambda=405\text{nm}$ . (400-420 nm.). Los kits que contienen el sustrato PNP-G7 y  $\alpha$ -glucosidasa son fabricados por Boehringer-Mannheim (n.º de catálogo: 1054635).

[0139] Para preparar el sustrato, se añade una botella de sustrato (BM 1442309) a 5 ml de tampón (BM1442309). Para preparar la alfa-glucosidasa, se añade una botella de alfa-glucosidasa (BM 1462309) a 45 ml de tampón (BM1442309). La solución de trabajo se hace mediante la mezcla de 5 ml de solución de  $\alpha$ -glucosidasa con 0, 5 ml de sustrato).

[0140] El ensayo se realiza por transformación de 20 micro  $\mu\text{l}$  de solución enzimática en una placa de microtitulación de 96 pocillos e incubación a 25°C. Se añaden 200  $\mu\text{l}$  de solución de trabajo, 25°C. La solución se mezcla y se preincuba 1 minuto y se mide la absorción cada 15 seg. durante 3 minutos a OD 405 nm.

[0141] La pendiente de la curva de absorción en función del tiempo es directamente proporcional a la actividad específica (actividad por mg de enzima) de la  $\alpha$ -amilasa en cuestión bajo el conjunto de condiciones dado.



Método general para mutagénesis aleatoria usando el programa DOPE

[0142] La mutagénesis aleatoria se puede llevar a cabo por los siguientes pasos:

1. Seleccionar las regiones de interés para su modificación en la enzima progenitora.
2. Elegir los sitios de mutación y los sitios no mutados en la región seleccionada
3. Elegir qué especie de mutaciones deberían llevarse a cabo, por ejemplo, con respecto a la estabilidad deseada y/o al rendimiento de la variante que se va a construir.
4. Seleccionar las mutaciones estructuralmente razonables.
5. Ajustar los residuos seleccionados por el paso 3 con respecto al paso 4.
6. Analizar usando un algoritmo DOPE adecuado la distribución de nucleótidos.
7. Si es necesario, ajustar los residuos deseados a la realidad del código genético (por ejemplo, teniendo en cuenta las limitaciones derivadas del código genético, por ejemplo, para evitar la introducción de codones de parada); (el experto en la materia será consciente de que algunas combinaciones de codón no se pueden usar en la práctica y tendrán que ser adaptadas).
8. Hacer cebadores
9. Realizar la mutagénesis aleatoria usando los cebadores.
10. Seleccionar las variantes de  $\alpha$ -amilasa resultantes mediante la detección de las propiedades mejoradas deseadas.

[0143] Algoritmos dope adecuados para su uso en el paso 6 son bien conocidos en la técnica. Un algoritmo es descrito por Tomandl, D. et al., 1997, Journal of Computer-Aided Molecular Design 11 (1997), pp. 29-38 ). Otro algoritmo, DOPE, se describe en lo siguiente:

El programa DOPE

[0144] El programa "DOPE" es un algoritmo informático útil para optimizar la composición de nucleótidos de un codón triplete de tal manera que codifica una distribución de aminoácidos que se asemeja más a la distribución de aminoácidos deseada. Con el fin de evaluar cuál de las distribuciones posibles es la más similar a la distribución de aminoácidos deseada, se necesita una función de puntuación. En el programa "Dope" se encontró la siguiente función que se adapta:

$$S \equiv \prod_{i=1}^N \left( \frac{x_i^{y_i} (1-x_i)^{1-y_i}}{y_i^{y_i} (1-y_i)^{1-y_i}} \right)^{w_i},$$

donde las  $x_i$  son las cantidades obtenidas de aminoácidos y grupos de aminoácidos, calculada por el programa de aminoácidos, las  $y_i$  son las cantidades deseadas de aminoácidos y grupos de aminoácidos definidos por el usuario del programa (por ejemplo, especificar cuáles de los 20 aminoácidos o codones de parada se quieren introducir, por ejemplo, con un cierto porcentaje (por ejemplo 90 % Ala, 3 % Ile, 7 % Val), a las  $w_i$  se asignan factores de peso tal como define el usuario del programa (por ejemplo, en función de la importancia de tener un residuo de aminoácido específico insertado en la posición en cuestión). N es 21 más el número de grupos de aminoácidos tal como define el usuario del programa. Para los propósitos de esta función 0 se define como 1.

[0145] Un algoritmo de Monte-Carlo (un ejemplo es el descrito por Valleau, J.P. & Whittington, S.G. (1977) A guide to Monte Carlo for statistical mechanics: 1 Highways. In "statistical Mechanics, Part A" Equilibrium Techniques ed. B.J. Berne, New York: Plenum) se utiliza para encontrar el valor máximo de esta función. En cada iteración se realizan los siguientes pasos:

1. Una nueva composición de nucleótidos aleatoria se elige para cada base, donde la diferencia absoluta entre la composición actual y la nueva composición es menor que o igual a  $d$  para cada uno de los cuatro nucleótidos G, A, T, C en las tres posiciones del codón (véase la definición de  $d$ ).
2. Las puntuaciones de la nueva composición y la composición actual se comparan mediante el uso de la función  $s$  como se describe anteriormente. Si la nueva puntuación es superior o igual a la puntuación de la composición actual, la nueva composición se mantiene y la composición actual se cambia a la nueva. Si la nueva puntuación es más pequeña, la probabilidad de mantener la nueva composición es  $\exp(1000(\text{new\_score} - \text{current\_score}))$ .

[0146] Un ciclo consiste normalmente en 1000 iteraciones como se describió anteriormente en donde  $d$  va decreciendo linealmente de 1 a 0. Cien o más ciclos se llevan a cabo en un proceso de optimización. La composición de nucleótidos que resulta en la puntuación más alta se presenta finalmente.

[0147] Otra divulgación

1. Una variante de una  $\alpha$ -amilasa progenitora de tipo Termamyl, cuya variante tiene actividad de  $\alpha$ -amilasa, dicha variante comprende una o varios correspondientes a las siguientes mutaciones en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2:

5 T141, K142, F143, D144, F145, P146, G147, R148, G149,  
Q174, R181, G182, D183, G184, K185, A186, W189, S193, N195  
H107, K108, G109, D166, W167, D168, Q169, S170, R171, Q172, F173,  
F267, W268, K269, N270, D271, L272, G273, A274, L275, K311, E346,  
K385, G456, N457, K458, P459, G460, T461, V462, T463.

10 2. La variante según forma de realización 1, cuya variante tiene una o varias de las siguientes sustituciones o delecciones:

15 T141A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V;  
K142A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
F143A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
D144A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
F145A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
P146A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y, V;  
20 G147A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
R148A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
G149A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
R181 \*, A, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
G182\*, A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
25 D183\*, A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
G184 \*, A, R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
K185A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
A186D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
W189A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, V;  
30 S193A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, T, W, Y, V;  
N195A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
H107A, D, R, N, C, E, Q, G, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
K108A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
G109A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
35 D166A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
W167A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, V;  
D168A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
Q169A, D, R, N, C, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
S170A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, T, W, Y, V;  
40 R171A, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
Q172A, D, R, N, C, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
F173A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
Q174 \*, A, D, R, N, C, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
F267A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
45 W268A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, V;  
K269A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
N270A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
D271A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
L272A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
50 G273A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
A274D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
L275A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
K311A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
E346A, D, R, N, C, Q, G, H, I, K, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
55 K385A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
G456A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
N457A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
K458A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
P459A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y, V;  
60 G460A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
T461A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V;  
V462A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y;  
T463A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V.

65 3. La variante según forma de realización 2, donde la variante tiene una o varias de las siguientes sustituciones o delecciones:

K142R; S193P; N195F; K269R,Q; N270Y,R,D; K311R; E346Q; K385R;  
K458R; P459T; T461P; Q174\*; R181Q,N,S; G182T,S,N; D183\*; G184\*;  
K185A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, M, N, F, P, S, T, W, Y, V; A186T, S, N, I, V, R;  
W189T,S,N,Q.

4. La variante según las formas de realización 1-3, donde la variante tiene una eliminación en la posición D183 + G184, y además una o varias de las siguientes sustituciones o deleciones: K142R; S193P; N195F; K269R,Q; N270Y,R,D; K311R; E346Q; K385R; K458R; P459T; T461P; Q174\*; R181Q,N,S; G182T,S,N; D183\*; G184\*;  
K185A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, M, N, F, P, S, T, W, Y, V; A186T, S, N, I, V, R; W189T, S, N, Q .

5. La variante según cualquiera de formas de realización 1-4, donde las variantes muestran una alteración en al menos una de las siguientes propiedades relativas a la  $\alpha$ -amilasa progenitora:

- i) mejor estabilidad de pH con un pH de 8 a 10,5; y/o
- ii) mejor estabilidad de  $\text{Ca}^{2+}$  con pH 8 a 10,5, y/o
- iii) actividad específica aumentada a temperaturas de 10 a 60°C, preferiblemente 20-50°C, especialmente 30-40°C.

6. La variante según cualquiera de formas de realización 1-5, que muestran estabilidad mejorada a pH 8 a 10,5, con mutaciones en una o más de las posiciones correspondientes a las siguientes posiciones (usando SEQ ID NO: numeración 2): T141, K142, F143, D144, F145, P146, G147, R148, G149, R181, A186, S193, N195, K269, N270, K311, K458, P459, T461.

7. La variante según la forma de realización 6, cuya variante tiene una o varias de las siguientes sustituciones:

T141A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V;  
K142A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
F143A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
D144A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
F145A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
P146A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y, V;  
G147A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
R148A, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
G149A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
K181A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
A186D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, P, K, M, F, S, T, W, Y, V;  
S193A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, T, W, Y, V;  
N195A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
K269A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
N270A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
K311A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
K458A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
P459A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y, V;  
T461A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V.

8. La variante según la forma de realización 7, donde la variante tiene una o más de las siguientes sustituciones: K142R, R181S, A186T, S193P, N195F, K269R, N270Y, K311R, K458R, P459T and T461P.

9. La variante según las formas de realización 1-5, que muestra estabilidad mejorada de  $\text{Ca}^{2+}$  a pH 8 a 10,5, con mutaciones en una o varias de las siguientes posiciones (utilizando el SEQ ID NO: numeración 2): R181, G182, D183, G184, K185, A186, W189, N195, N270, E346, K385, K458, P459.

10. La variante según formas de realización 9, cuya variante tiene una o más de las siguientes sustituciones o deleciones:

R181\*, A, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
G182\*, A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
D183\*, A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
G184\*, A, R, D, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
K185A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
A186D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
W189A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, V;  
N195A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
N270A, R, D, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
E346A, R, D, N, C, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
K385A, R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;

K458A, R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
P459A, R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y, V.

11. La variante según las formas de realización 10, donde la variante tiene una o varias de las siguientes sustituciones o deleciones:

R181Q,N; G182T,S,N; D183\*; G184\*;  
K185A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, M, N, F, P, S, T, W, Y, V; A186T,S,N,I,V;  
W189T, S, N, Q; N195F; N270R,D; E346Q; K385R; K458R; P459T.

12. Una variante según las formas de realización 1-11, donde la  $\alpha$ -amilasa progenitora de tipo Termamyl, es seleccionada de:

la  $\alpha$ -amilasa de cepa *Bacillus* NCIB 12512 con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1;  
la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 5;  
la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4.

13. La variante según las formas de realización 1-5, que muestra actividad específica aumentada a temperaturas de 10 a 60°C, preferiblemente 20-50°C, especialmente 30-40°C, con mutación/mutaciones en una o varios de las siguientes posiciones (utilizando el SEQ ID NO: numeración 2): H107, K108, G109, D166, W167, D168, Q169, S170, R171, Q172, F173, Q174, D183, G184, N195, F267, W268, K269,N270, D271, L272, G273, A274, L275, G456, N457, K458, P459, G460, T461, V462, T463.

14. La variante según la forma de realización 13, cuya variante tiene una o varias de las siguientes sustituciones:

H107A, D, R, N, C, E, Q, G, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
K108A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
G109A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
D166A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
W167A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, V;  
D168A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
Q169A, D, R, N, C, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
S170A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, T, W, Y, V;  
R171A, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
Q172A, D, R, N, C, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
F173A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
Q174 \*, A, D, R, N, C, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
D183\*, A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V;  
G184\*, A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
N195A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
F267A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;  
W268A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, Y, V;  
K269A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
N270A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
D271A, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
L272A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
G273A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
A274D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
L275A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
G456A, D, R,N,C,E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T,W, Y, V;  
N457A, D, R, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
K458A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
P459A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, S, T, W, Y, V;  
G460A, D, R, N, C, E, Q, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
T461A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V;  
V462A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V;  
T463A, D, R, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, W, Y, V.

15. La variante según forma de realización 14, donde la variante tiene una o varias de las siguientes sustituciones o deleciones:

Q174\*, D183\*, G184\*, N195F, K269S.

16. La variante según forma de realización 13-15, donde la  $\alpha$ -amilasa progenitora de tipo Termamyl es la  $\alpha$ -amilasa *B. licheniformis* con la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4.

17. Una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una variante de  $\alpha$ -amilasa según cualquiera de formas de realización 1-16.
- 5 18. Un vector de expresión recombinante que lleva una construcción de ADN según la forma de realización 17.
19. Una célula que se transforma con una construcción de ADN según la forma de realización 17 o un vector según forma de realización 18.
20. Una célula según la forma de realización 19, que es un microorganismo.
- 10 21. Una célula según la forma de realización 20, que es una bacteria o un hongo.
22. La célula según la forma de realización 21, 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*.
- 15 23. Uso de una variante de  $\alpha$ -amilasa según cualquier de formas de realización 1-16 para lavado y/o lavado de la vajilla.
- 20 24. Un aditivo de detergente que incluye una variante de  $\alpha$ -amilasa según cualquiera de las formas de realización 1-16, opcionalmente en forma de un granulado no polvoriento, líquido estabilizado o enzima protegida.
- 25 25. Un aditivo de detergente según la forma de realización 24 que contiene 0,02-200 mg de enzima proteína/g del aditivo.
26. Un aditivo de detergente según la formas de realización 24 o 25, que adicionalmente comprende otra enzima tal como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, otra enzima amilolítica y/o una celulasa.
27. Una composición de detergente que incluye una variante de  $\alpha$ -amilasa según cualquiera de las formas de realización 1-16.
- 30 28. Una composición de detergente según la forma de realización 27 que adicionalmente comprende otra enzima tal como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, otra enzima amilolítica y/o una celulasa.
- 35 29. Una composición de detergente de lavado de la vajilla manual o automático que incluye una variante de  $\alpha$ -amilasa según cualquiera de las formas de realización 1-16.
30. Una composición de detergente de lavado de la vajilla según la forma de realización 29 que adicionalmente comprende otra enzima tal como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, otra enzima amilolítica y/o una celulasa.
- 40 31. Una composición de lavado de ropa manual o automático que incluye una variante de  $\alpha$ -amilasa según cualquiera de las formas de realización 1-16.
32. Una composición de lavado de ropa según la forma de realización 31, que adicionalmente comprende otra enzima tal como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, una enzima amilolítica y/o una celulasa.
- 45 33. Método para suministrar  $\alpha$ -amilasas con
- 1) pH óptimo alterado, y/o
- 50 2) temperatura óptima alterada, y/o
- 3) estabilidad mejorada,
- que comprende los pasos siguientes:
- 55 i) identificación de (una) posición (posiciones) objetivo para la mutación de la  $\alpha$ -amilasa comparando la dinámica molecular de dos o más estructuras 3D de  $\alpha$ -amilasas que tienen perfiles de pH, temperatura y/o estabilidad sustancialmente diferentes,
- ii) sustitución, adición y/o eliminación de uno o más aminoácidos en la posición/posiciones y/o región (regiones) identificada(s).
- 60 34. El método según la forma de realización 33, donde una  $\alpha$ -amilasa de temperatura media se compara con una  $\alpha$ -amilasa de temperatura alta.
35. El método según la forma de realización 33, donde una  $\alpha$ -amilasa de temperatura baja se compara con una  $\alpha$ -amilasa de temperatura media o alta.
- 65

36. El método según las formas de realización 33-35, donde las  $\alpha$ -amilasas son al menos 70%, preferiblemente 80%, hasta 90%, tal como hasta 95%, especialmente 95% homólogas.

37. El método según la forma de realización 36, donde las  $\alpha$ -amilasas comparadas son  $\alpha$ -amilasas de tipo Termamyl.

38. El método según la forma de realización 28, donde las  $\alpha$ -amilasas comparadas son cualquiera de las  $\alpha$ -amilasas mostradas en SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 8.

39. El método según cualquiera de las formas de realización 33 a 38, donde el perfil de estabilidad de las  $\alpha$ -amilasas comparadas son el perfil de dependencia de  $\text{Ca}^{2+}$ .

## EJEMPLOS

### EJEMPLO 1

#### Ejemplo de la construcción de homología de Termamyl™

[0148] La homología global de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* (en lo sucesivo referida como Termamyl™) con otras  $\alpha$ -amilasas de tipo Termamyl es alta y la similitud del porcentaje es extremadamente alta. La similitud calculada entre Termamyl™ y BSG (la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* con la SEQ ID NO: 3) y BAN (la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* con la SEQ ID NO: 5) usando el programa GCG del University of Wisconsin Genetics Computer Group resultó en un 89% y un 78%, respectivamente. TERM tiene una delección de 2 residuos entre el residuo G180 y el K181 en comparación con BAN™ y BSG. BSG tiene una delección de 3 residuos entre el G371 y el 1372 en comparación con BAN™ y Termamyl™. Además BSG tiene una extensión C-terminal de más de 20 residuos en comparación con BAN™ y Termamyl™. BAN™ tiene 2 residuos menos y Termamyl tiene un residuo menos en el N-terminal en comparación con BSG.

[0149] La estructura de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* (Termamyl™) y de la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* (BAN™) respectivamente, se modeló en la estructura descrita en el Apéndice 1 de WO 96/23974. La estructura de otras  $\alpha$ -amilasas de tipo Termamyl (p. ej. las descritas aquí) se pueden construir de forma análoga.

[0150] En comparación con la  $\alpha$ -amilasa usada para elucidar la presente estructura, Termamyl™ difiere en que le faltan dos residuos más o menos entre 178-182. Con el fin de compensar esto en la estructura modelo, se usó el programa HOMOLOGY de BIOSYM para sustituir los residuos en posiciones equivalentes en la estructura (no sólo regiones estructuralmente conservadas) salvo por el punto de delección. Se estableció un enlace peptídico entre G17 (G177) y K180 (K180) en Termamyl™ (BAN™). La estrecha relación estructural entre la estructura resuelta y la estructura modelo (y de este modo la validez de la última) está indicada mediante la presencia de tan solo muy pocos átomos encontrados demasiado juntos en el modelo.

[0151] A esta estructura muy irregular de Termamyl™ se le añadieron después todas las aguas (605) e iones (4 de calcio y 1 de sodio) de la estructura resuelta (Véase Apéndice 1 de WO 96/23874) en las mismas coordenadas que para dicha estructura resuelta usando el programa INSIGHT. Esto se podría hacer con tan solo pocas superposiciones, en otras palabras con un pequeño ajuste. Después se minimizó esta estructura modelo usando 200 fases de Steepest Descent y 600 fases de gradiente conjugado (véase Brooks et al 1983, J. Computational Chemistry 4, págs.187-217). La estructura minimizada se sometió después a dinámica molecular, 5ps de calentamiento seguido de un máximo de 200ps pero más de 35ps de equilibrado. La dinámica según funciona con el algoritmo de Verlet y la temperatura de equilibrado de 300K se mantuvieron usando el acoplamiento Berendsen en un baño maría (Berendsen et. al., 1984, J. Chemical Physics 81, p. 3684-3690). Se eliminaron las rotaciones y traducciones a cada picosegundo.

### EJEMPLO 2

#### Método de extracción de regiones importantes para la identificación de variantes de $\alpha$ -amilasa con estabilidad mejorada de pH y actividad de temperatura alterada.

[0152] La estructura de rayos X y/o la estructura de construcción de modelo de la enzima de interés, aquí SP722 y Termamyl™, se someten a simulaciones de dinámica molecular. La simulación de dinámica molecular se hace utilizando el programa CHARMM (de Molecular simulations (MSI)) u otro programa adecuado como, por ejemplo, DISCOVER (from MSI). El análisis dinámico molecular se hace en vacío, o de forma más preferida, incluyendo aguas de cristal, o con la enzima introducida en agua, por ejemplo, una esfera de agua o una caja de agua. La simulación se ejecuta por 300 picosegundos (ps) o más, por ejemplo, 300-1200 ps. Las fluctuaciones isotrópicas se extraen para los carbonos de CA de las estructuras y se comparan entre las estructuras. Donde la secuencia tiene delecciones y/o inserciones, se insertan las fluctuaciones isotrópicas de la otra estructura dando así 0 como diferencia en la fluctuación isotrópica. Para obtener una explicación de las fluctuaciones isotrópicas, véase el manual CHARMM (obtenible de MSI).

[0153] La simulación de dinámica molecular puede hacerse utilizando cargas estándar en los aminoácidos cargables. Esto es Asp y Glu se cargan negativamente y Lys y Arg se cargan positivamente. Esta condición se asemeja el pH medio de aproximadamente 7. Para analizar un pH más alto o más bajo, puede hacerse la titulación de la molécula para obtener el pKa alterado de los residuos valorables estándar que normalmente están dentro de pH 2-10; Lys, Arg, Asp, Glu, Tyr y His. También Ser, Thr y Cys son valorables pero no se tienen en cuenta aquí. Aquí las cargas alteradas debido al pH se han descrito como Asp y Glu son negativas a alto pH, y Arg y Lys son sin carga. Esto imita un pH alrededor de 10 a 11 donde la titulación de Lys y Arg comienza, como el pKa normal de estos residuos es de alrededor de 9-11.

1. El método usado para extraer regiones importantes para la identificación de variantes de  $\alpha$ -amilasa con pH de alta estabilidad:

Las regiones importantes para construir variantes con estabilidad mejorada del pH son las regiones que en el pH extremo muestran la máxima movilidad, es decir, regiones con las máximas fluctuaciones isotrópicas. Tales regiones se identifican por realización de dos simulaciones de dinámicas moleculares: i) una serie de pH alto en la que los aminoácidos básicos, Lys y Arg, son vistos como neutros (es decir, no protonados) y los aminoácidos ácidos, Asp y Glu, tienen la carga (-1) y ii) una serie de pH neutro con los aminoácidos básicos, Lys y Arg, con la carga neta de (+1) y los aminoácidos ácidos con una carga de (-1). Las dos series se comparan y se identificaron las regiones que mostraron la movilidad relativamente más alta a alto pH en comparación con el análisis de pH neutro. La introducción de residuos que mejoran la estabilidad general, por ejemplo, unión de hidrógeno, que hace que la región sea más rígida (por mutaciones tales como sustituciones de prolina o sustitución de residuos de glicina), o que mejora las cargas o su interacción, mejora la estabilidad de pH alto de la enzima.

2. El método usado para extraer regiones para la identificación de variantes de  $\alpha$ -amilasa con actividad aumentada a temperaturas medias:

Las regiones importantes para construir variantes con actividad aumentada a temperatura media se determinó como la diferencia entre las fluctuaciones isotrópicas en SP722 y Termamyl, es decir, SP722 menos fluctuaciones isotrópicas de Termamyl de CA. Se seleccionaron las regiones con la máxima movilidad en las fluctuaciones isotrópicas. Se esperaba que regiones y estos residuos aumentaran la actividad a temperaturas medias. La actividad de una alfa-amilasa solo es expresada si está presente la movilidad correcta de ciertos residuos. Si la movilidad de los residuos es demasiado baja, la actividad es disminuida o abandonada.

### EJEMPLO 3

Construcción, por mutagénesis aleatoria, mutagénesis dopada, de variantes de  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl con una estabilidad de  $\text{Ca}^{2+}$  mejorada a temperaturas medias en comparación con la enzima progenitora

[0154] Para mejorar la estabilidad a baja concentración de calcio de  $\alpha$ -amilasas, se realizó la mutagénesis aleatoria en la región preseleccionada.

Región:	Residuo:
SAI:	R181-W189

[0155] El software de DOPE (ver Materiales y Métodos) se utilizó para determinar los codones enriquecidos para cada cambio sugerido en región SA1 minimizando la cantidad de codones de parada (véase la tabla 1). La distribución exacta de nucleótidos se calculó en las tres posiciones del codón para dar la población sugerida de cambios de aminoácidos. Las regiones dopadas fueron dopados específicamente en las posiciones indicadas para tener una alta probabilidad de tener los residuos deseados, pero todavía permitir otras posibilidades.

Tabla 1:

Distribución de residuos de aminoácidos para cada posición

R181:	72% R, 2% N, 7% Q, 4% H, 4%K, 11%S
G182:	73% G, 13% A, 12% S, 2% T
K185:	95% K, 5% R
A186:	50% A, 4% N, 6% D, 1%E, 1% G, 1% K, 5% S, 31% T
W187:	100% W
D188:	100% D

W189: 92% W, 8% S

[0156] La cadena de oligonucleótidos dopados resultante se muestra en tabla 2 como cadena homosentido: con las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de tipo salvaje y la distribución de nucleótidos para cada posición dopada.

5

Tabla 2:

Posición	181 182 185 186 187 188 189
Sec. de aminoácidos	Arg Gly Lys Ala Thr Asp Thr
Sec. de nucleótidos de peso	cga ggt aaa gct tgg gat tgg

Cebador directo (SEQ ID NO: 15):

10

FSA:

```
5'-caa aat cgt atc tac aaa ttc 123 456 a7g 8910 tgg
gat tllg gaa gta gat tgg gaa aat-3'
```

Distribución de nucleótidos para cada posición dopada

15

20

25

1: 35% A, 65% C  
 2: 83% G, 17% A  
 3: 63% G, 37% T  
 4: 86% G, 14% A  
 5: 85% G, 15% C  
 6: 50% T, 50% C  
 7: 95% A, 5% G  
 8: 58% G, 37% A, 5% T  
 9: 86% C, 13% A, 1% G  
 10: 83% T, 17% G  
 11: 92% G, 8% C

Cebador inverso (SEQ ID NO: 16):

RSA: 5'-gaa ttt gta gat acg att ttg-3'

30

Mutagénesis aleatoria

35

40

[0157] Los oligonucleótidos enriquecidos evidentes de la Tabla 2 (que por un término común es designada FSA) y cebadores inversos RSA para la región SA1 región y SEQ ID específica NO: 2: cebadores SP722 que cubren los sitios SacII y el DraIII sitios se utilizan para generar fragmentos de la biblioteca de PCR por el método de extensión de superposición (Horton et al., Gene, 77 (1989), pp. 61-68) con una superposición de 21 pares de bases. El plásmido pJE1 es el modelo para la Reacción en Cadena de la Polimerasa. Los fragmentos de la PCR se clonan en el vector transportador de *E. coli/Bacillus* pDork101 (ver Materiales y Métodos) que permiten la mutagénesis en *E. coli* y la expresión inmediata en *Bacillus subtilis* que previene la acumulación letal de amilasas en el *E. coli*. Después de del establecer los fragmentos de la PCR clonados en *E. coli*, un fragmento UC19 modificado se digiere fuera del plásmido y el promotor y el gen de Termamyl mutado es físicamente conectado y la expresión puede tener lugar en *Bacillus*.

#### Selección

45

[0158] La biblioteca se puede seleccionar en los ensayos de filtros de calcio bajo que se describen en la sección "Materiales y Métodos" anterior.

#### **EJEMPLO 4**

50

Construcción de variantes de amilasa SEQ ID NO: 1 (SP690)

[0159] El gen que codifica la amilasa de SEQ ID NO: 1 está ubicado en un plásmido pTVB106 descrito en WO96/23873. La amilasa se expresa a partir del promotor amyL en este constructo en *Bacillus subtilis*.



[0160] Una variante de la proteína es delta(T183-G184) +Y243F+Q391E+K444Q. La construcción de esta variante es describe en WO96/23873.

[0161] Construcción de delta(T183-G184) + N195F por el método de megacebador como se describe en Sarkar and Sommer, (1990), BioTechniques 8: 404-407 .

[0162] El cebador específico de gen B1 (SEQ ID NO: 17) y el cebador mutagénico 101458 (SEQ ID NO: 19) fueron usados para amplificar por PCR un fragmento de ADN de aproximadamente 645 par de bases de un plásmido similar al pTVB106 (con las mutaciones delta(T183-G184) en el gen que codifica la amilasa de SEQ ID NO: 1).

[0163] El fragmento de 645 pares de bases fue purificado de un gel de agarosa y usado como un megacebador junto con el cebador Y2 (SEQ ID NO: 18) en una segunda PCR realizada en el mismo modelo.

[0164] El fragmento resultante de aproximadamente 1080 pares de bases fue digerido con enzimas de restricción BstEII y AflIII y el fragmento de ADN resultante de aproximadamente 510 pares de bases fue purificado y ligado con el plásmido similar a pTVB106 (con las mutaciones delta(T183-G184) en el gen que codifica la amilasa de SEQ ID NO: 1) digerido con las mismas enzimas. Células competentes de SHA273 (amilasa y proteasa bajas) de *Bacillus subtilis* fueron transformadas con el ligamiento y transformantes resistentes de cloranfenicol y se controlaron por secuenciación del ADN para verificar la presencia de las mutaciones correctas en el plásmido.

cebador B1: (SEQ ID NO: 17)  
5' CGA TTG CTG ACG CTG TTA TTT GCG 3'  
cebador Y2: (SEQ ID NO: 18)  
5' CTT GTT CCC TTG TCA GAA CCA ATG 3'  
cebador 101458 (SEQ ID NO: 19):  
5' GT CAT AGT TGC CGA AAT CTG TAT CGA CTT C 3'

[0165] La construcción de la variante: delta(T183-G184) + K185R+A186T fue realizada de una manera similar excepto que se usó el cebador mutagénico 101638.

cebador 101638: (SEQ ID NO: 20)  
5' CC CAG TCC CAC GTA CGT CCC CTG AAT TTA TAT ATT TTG 3'

[0166] Las variantes: delta(T183-G184) +A186T, delta(T183-G184) +A186I, delta(T183-G184) +A186S, delta(T183-G184) +A186N se construyen por medio de un método similar excepto que el plásmido similar a pTVB106 (que lleva la variante delta(T183-G184) + K185R+A186T) se usa como modelo y como el vector para el fin de clonación. El oligonucleótido mutagénico (Oligo 1) es:

5' CC CAG TCC CAG NTCTTT CCC CTG AAT TTA TAT ATT TTG 3' (SEQ ID NO: 21)

[0167] N representa una mezcla de las cuatro bases: A, C, G, y T usadas en la síntesis del oligonucleótido mutagénico. La secuenciación de transformantes identifica el codón correcto para posición del aminoácido 186 en la amilasa madura.

[0168] La variante: delta(T183-G184) + K185R+A186T+N195F es construida de la siguiente manera:

la PCR se realiza con cebador x2 (SEQ ID NO: 22) y cebador 101458 (SEQ ID NO: 19) en el plásmido similar a pTVB106 (con mutaciones delta(T183-G184) + K185R+A186T). El fragmento de ADN resultante se usa como un megacebador junto con cebador Y2 (SEQ ID NO: 18) en una PCR en el plásmido similar a pTVB106 (con mutaciones delta(T183-G184) + N195). El producto de la segunda PCR se digiere con endonucleasas de restricción Acc65I y AflIII y es clonado en el plásmido similar a pTVB106 (delta(T183-G184)+N195F) digerido con las mismas enzimas.  
cebador x2: (SEQ ID NO: 22)  
5' GCG TGG ACA AAG TTT GAT TTT CCT G 3'

[0169] La variante: delta (T183-G184) + K185R+A186T+N195F+Y243F+ Q391E+K444Q es construida de la siguiente manera:

La PCR se realiza con cebador x2 y cebador 101458 en el plásmido similar a pTVB106 (con mutaciones delta(T183- G184) + K185R+A186T). El fragmento de ADN resultante se usa como un megacebador junto con cebador Y2 en una PCR en el plásmido similar a pTVB106 (con mutaciones delta(T183-G184) +Y243F+Q391E+K444Q). El producto de la segunda PCR se digiere con endonucleasas de restricción Acc65I y AflIII y es clonado en el plásmido similar a pTVB106 (delta(T183-G184) +Y243F+Q391E+K444Q) digerido con las mismas enzimas.

## Ejemplo 5

Construcción de variantes de  $\alpha$ -amilasa dirigidas en la  $\alpha$ -amilasa progenitora SP722 (SEQ ID NO: 2)

[0170] La construcción de variantes de amilasa SEQ ID NO: 2 (SP722) se realiza como se describe más abajo.

5 [0171] El gen que codifica la amilasa de SEQ ID NO: 2 está ubicado en un plásmido pTVB106 descrito en WO96/23873. La amilasa se expresa a partir del promotor amyL en este constructo en *Bacillus subtilis*.

[0172] Construcción de delta(D183-G184) + V56I por el método de megacebador como se describe por Sarkar and Sommer, 1990 (BioTechniques 8: 404-407 ).

10 [0173] El cebador específico del gen DA03 y el cebador mutagénico DA07 se usan para amplificar por PCR un fragmento de ADN de aproximadamente 820 pares de bases de un plásmido similar a pTVB112 (con las mutaciones delta(D183-G184) en el gen que codifica la  $\alpha$ -amilasa mostrada en SEQ ID NO: 2.

15 [0174] El fragmento de 820 par de bases es purificado de un gel de agarosa y usado como un megacebador junto con el cebador DA01 en una segunda PCR realizada en lo mismo modelo.

20 [0175] El fragmento resultante de aproximadamente 920 pares de bases se digiere con enzimas de restricción NgoM I y Aat II y el fragmento de ADN resultante de aproximadamente 170 pares de bases es purificado y ligado con el plásmido similar a pTVB112 (con las mutaciones delta(D183- G184) en el gen que codifica la amilasa mostrado en SEQ ID NO: 2) digerido con las mismas enzimas. Células competentes SHA273 (amilasa y proteasa bajas) de *Bacillus subtilis* se transforman con el ligamiento y transformantes resistentes de cloramfenicol se controlan por secuenciación del ADN para verificar la presencia de las mutaciones correctas en el plásmido.

25 cebador DA01: (SEQ ID NO: 23)  
5' CCTAATGATGGGAATCACTGG 3'

cebador DA03: (SEQ ID NO:24)  
5' GCATTGGATGCTTTTGAACAACCG 3'

30 cebador DA07 (SEQ ID NO:25):  
5' CGCAAAATGATATCGGGTATGGAGCC 3'

Variantes: delta(D183-G184) + K108L, delta(D183-G184) + K108Q, delta(D183-G184) + K108E, delta(D183-G184) + K108V, fueron construidas por el método de megacebador como se describe por Sarkar and Sommer ,1990 (BioTechniques 8: 404-407 ):

35 La PCR se realiza con cebador DA03 y cebador de mutagénesis DA20 en el plásmido similar a pTVB112 (con mutaciones delta(D183-G184)). El fragmento de ADN resultante se usa como un megacebador junto con cebador DA01 en una PCR en el plásmido similar a pTVB112 (con mutaciones delta(D183-G184)). El producto de aproximadamente 920 pares de bases de la segunda PCR se digiere con endonucleasas de restricción Aat II y Mlu I y clonadas en el plásmido similar a pTVB112 (delta(D183-G184)) digeridas con las mismas enzimas.

40 cebador DA20 (SQ ID NO:26):  
5' GTGATGAACCAACSWAGGTGGAGCTGATGC 3'

45 [0176] S representa una mezcla de las dos bases: C y G usadas en la síntesis del oligonucleótido mutagénico y W representa una mezcla de las dos bases: A y T usadas en la síntesis del oligonucleótido mutagénico.

[0177] La secuenciación de transformantes identifica el codón correcto para la posición del aminoácido 108 en la amilasa madura.

50 [0178] La construcción de las variantes: delta(D183-G184) + D168A, delta(D183-G184) + D168I, delta(D183-G184) + D168V, delta(D183-G184) + D168T se realiza de una manera similar excepto que se usa el cebador mutagénico DA14.

cebador DA14 (SEQ ID NO:27):

55 5' GATGGTGTATGGRYCAATCACGACAATTCC 3'

[0179] R representa una mezcla de las dos bases: A y G usadas en la síntesis del oligonucleótido mutagénico y Y representa una mezcla de las dos bases: C y T usadas en la síntesis del oligonucleótido mutagénico.

60 [0180] La secuenciación de transformantes identifica el codón correcto para la posición del aminoácido 168 en la amilasa madura.

65 [0181] La construcción de la variante: delta(D183-G184) + Q169N se realiza de una manera similar excepto que se usa el cebador mutagénico DA15.  
cebador DA15 (SEQ ID NO:28):

5' GGTGTATGGGATAACTCACGACAATTCC 3'

5 [0182] La construcción de la variante: delta(D183-G184) + Q169L se realiza de una manera similar excepto que se usa el cebador mutagénico DA16.  
cebador DA16 (SEC ID NO:29):

5' GGTGTATGGGATCTCTCACGACAATTCC 3'

10 [0183] La construcción de la variante: delta(D183-G184) + Q172N se realiza de una manera similar excepto que se usa el cebador mutagénico DA17.  
cebador DA17 (SEQ ID NO:30):

5' GGGATCAATCACGAAATTTCCAAAATCGTATC 3'

15 [0184] La construcción de la variante: delta(D183-G184) + Q172L se realiza de una manera similar excepto que se usa el cebador mutagénico DA18.  
cebador DA18 (SEQ ID NO:31):

20 5' GGGATCAATCACGACTCTTCCAAAATCGTATC 3'

[0185] La construcción de la variante: delta(D183-G184) + L201I se realiza de una manera similar excepto que se usa el cebador mutagénico DA06.  
cebador DA06 (SEQ ID NO:32):

25 5' GGAAATTATGATTATATCATGTATGCAGATGTAG 3'

[0186] La construcción de la variante: delta(D183-G184) + K269S se realiza de una manera similar excepto que se usa el cebador mutagénico DA09 .  
cebador DA09 (SEQ ID NO:33):

5' GCTGAATTTTGGTCTGAATGATTTAGGTGCC 3'

35 [0187] La construcción de la variante: delta(D183-G184) + K269Q se realiza de una manera similar excepto que se usa el cebador mutagénico DA11.  
cebador DA11 (SEQ ID NO:34):

5' GCTGAATTTTGGTCTGAATGATTTAGGTGCC 3'

40 [0188] La construcción de la variante: delta(D183-G184) + N270Y se realiza de una manera similar excepto que se usa el cebador mutagénico DA21.  
cebador DA21 (SEQ ID NO:35):

5' GAATTTTGAAGTACGATTTAGGTCCG 3'

45 [0189] La construcción de las variantes: delta(D183-G184) + L272A, delta(D183-G184) + L272I, delta(D183-G184) + L272V, delta(D183-G184) + L272T se realiza de una manera similar excepto que se usa el cebador mutagénico DA12.  
cebador DA12 (SEQ ID NO:36):

50 5' GGAAAACGATRYCGGTGCCTTGGAGAAC 3'

[0190] R representa una mezcla de las dos bases: A y G usadas en la síntesis del oligonucleótido mutagénico y Y representa una mezcla de las dos bases: C y T usadas en la síntesis del oligonucleótido mutagénico.

55 [0191] La secuenciación de transformantes identifica el codón correcto para la posición de aminoácido 272 en la amilasa madura.

[0192] La construcción de las variantes: delta(D183-G184) + L275A, delta(D183-G184) + L275I, delta(D183-G184) + L275V, delta(D183-G184) + L275T se realiza de una manera similar excepto que se usa el cebador mutagénico DA13.  
cebador DA13 (SEQ ID NO:37):

5' GATTTAGGTGCCTRYCAGAACTATTTA 3'

65 R representa una mezcla de las dos bases: A y G usadas en la síntesis del oligonucleótido mutagénico y Y representa una mezcla de las dos bases: C y T usadas en la síntesis del oligonucleótido mutagénico.

La secuenciación de transformantes identifica el codón correcto para posición del aminoácido 275 en la amilasa madura.

[0193] La construcción de la variante: delta(D183-G184) + Y295E se realiza de una manera similar excepto que se usa el cebador mutagénico DA08.  
cebador DA08 (SEQ ID NO:38):

5' CCCCCTTCATGAGAATCTTTATAACG 3'

[0194] La construcción de delta(D183-G184) + K446Q por el método de megacebador como se describe por Sarkar and Sommer.1990 (Biotechniques 8: 404-407 ):

se usó el cebador específico del gen DA04, templando 214-231 par de bases relativamente al codón de PARADA y el cebador mutagénico DA10 fueron usados para amplificar por PCR un fragmento de ADN de aproximadamente 350 pares de bases de un plásmido similar a pTVB112 (con las mutaciones delta(D183-G184) en el gen que codifica la amilasa representado en SEQ ID NO: 2).

[0195] El fragmento de ADN resultante se usa como un megacebador junto con cebador DA05 en una PCR en plásmido similar a pTVB112 (con mutaciones delta(D183-G184)). El producto de aproximadamente 460 pares de bases de la segunda PCR se digiere con endonucleasas de restricción SnaB I y Not I y es clonado en plásmido similar a pTVB112 (delta(D183-G184)) digerido con las mismas enzimas.  
cebador DA04 (SEQ ID NO:39):

5' GAATCCGAACCTCATTACACATTTCG 3'

cebador DA05 (SEQ ID NO:40):

5' CGGATGGACTCGAGAAGGAAATACCACG 3'

cebador DA10 (SEQ ID NO:41):

5' CGTAGGGCAAATCAGGCCGGTCAAGTTTGG 3'

[0196] La construcción de las variantes: delta(D183-G184) + K458R se realiza de una manera similar excepto que se usa el cebador mutagénico DA22.  
cebador DA22 (SEQ ID NO:42):

5' CATAACTGGAAATCGCCCGGGAACAGTTACG 3'

[0197] La construcción de las variantes: delta(D183-G184) + P459S y delta(D183-G184) + P459T se realiza de una manera similar excepto que se usa el cebador mutagénico DA19.  
cebador DA19 (SEQ ID NO:43):

5' CTGGAAATAAAWCCGGAACAGTTACG 3'

W representa una mezcla de las dos bases: A y T usadas en la síntesis del oligonucleótido mutagénico.  
La secuenciación de transformantes identifica el codón correcto para posición del aminoácido 459 en la amilasa madura.

[0198] La construcción de las variantes: delta(D183-G184) + T461P se realiza de una manera similar excepto que se usa el cebador mutagénico DA23.  
cebador DA23 (SEQ ID NO:44):

5' GGAAATAAACAGGACCCGTTACGATCAATGC 3'

[0199] La construcción de la variante: delta(D183-G184) + K142R se realiza de una manera similar excepto que se usa el cebador mutagénico DA32.  
cebador DA32 (SEQ ID NO: 45):

5' GAGGCTTGGACTAGGTTTGATTTTCCAG 3'

[0200] La construcción de la variante: delta(D183-G184) + K269R se realiza de una manera similar excepto que se usa el cebador mutagénico DA31.  
cebador DA31 (SEQ ID NO: 46):

5' GCTGAATTTTGGCGCAATGATTTAGGTGCC 3'

**Ejemplo 6**Construcción de variantes de  $\alpha$ -amilasa dirigidas en la  $\alpha$ -amilasa progenitora de Termamyl (SEQ ID NO: 4)

5 [0201] El gen amyL, que codifica la  $\alpha$ -amilasa de Termamyl se localiza en el plásmido pDN1528 descrito en WO 95/10603 (Novo Nordisk). Las variantes con sustituciones N265R y N265D, respectivamente, de dicha  $\alpha$ -amilasa progenitora se construyen por métodos descritos en WO 97/41213 o por el método "megacebador" anteriormente descrito.

10 [0202] Los oligonucleótidos mutagénicos son:

cebador b11 para la sustitución de N265R:

5' PCC AGC GCG CCT AGG TCA CGC TGC CAA TAT TCA G (SEQ ID NO: 56)

15

cebador b12 para la sustitución de N265D:

5' PCC AGC GCG CCT AGG TCA TCC TGC CAA TAT TCA G (SEQ ID NO: 57)

20 [0203] P representa un grupo de fosfato.

**Ejemplo 7**

25 Determinación de la estabilidad del pH a pH alcalino de variantes de la  $\alpha$ -amilasa progenitora con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO:2.

[0204] En esta serie de análisis se utilizaron muestras enzimáticas purificadas. Las mediciones se realizaron usando soluciones de las variantes respectivas en tampón de CAPS 100 mM ajustado a pH 10,5. Las soluciones se incubaron a 75°C.

30

[0205] Tras la incubación durante 20 y 30 min se midió la actividad residual utilizando el ensayo PNP-G7 (descrito en la sección "Materiales y Métodos" de más arriba). La actividad residual en las muestras se midió utilizando tampón de Britton Robinson pH 7,3. El descenso en la actividad residual se midió con respecto a una solución de referencia correspondiente de la misma enzima a 0 minutos, que no ha sido incubada a alto pH y 75°C.

35

[0206] El porcentaje de la actividad inicial como función se muestra en la tabla a continuación para la enzima progenitora (SEQ ID NO: 2) y para las variantes en cuestión.

Variante:	Actividad residual después de 20 min	Actividad residual después de 30 min
$\Delta$ (D183-G184)+M323L	56 %	44 %
$\Delta$ (D183-G184)+M323L+R181S	67 %	55 %
$\Delta$ (D183-G184)+M323L+A186T	62 %	50 %

40 [0207] En otra serie de análisis se usaron sobrenadantes de cultivo. Las mediciones se realizaron usando soluciones de las variantes respectivas en tampón de CAPS 100 mM ajustado a pH 10,5. Las soluciones fueron incubadas a 80°C.

45 [0208] Tras la incubación durante 30 minutos se midió la actividad residual utilizando el ensayo Phadebas (descrito en el sección "Materiales y Métodos" de más arriba). La actividad residual en las muestras se midió utilizando tampón de Britton Robinson pH 7,3. El descenso en la actividad residual se midió con respecto a una solución de referencia correspondiente de la misma enzima a 0 minutos, que no ha sido incubada a alto pH y 80°C.

[0209] El porcentaje de la actividad inicial como función se muestra en la tabla a continuación para la enzima progenitora (SEQ ID NO: 2) y para las variantes en cuestión.

50

Variante:	Actividad residual después de 30 min
$\Delta$ (D183-G184)	4 %
$\Delta$ (D183-G184)+P459T	25 %
$\Delta$ (D183-G184)+K458R	31 %
$\Delta$ (D183-G184)+K311R	10 %

**Ejemplo 8**

Determinación de estabilidad de calcio a pH alcalino de variantes de la  $\alpha$ -amilasa progenitora con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4.

A: Estabilidad de calcio de variantes de la secuencia en la SEQ ID NO:1

[0210] La medición se realizó usando soluciones de las variantes respectivas en tampón de CAPS 100 mM ajustado a pH 10,5 a lo que se añadió polifosfato (a tiempo t=0) para dar una concentración final de 2400 ppm. Las soluciones se incubaron a 50°C.

[0211] Tras la incubación durante 20 y 30 minutos la actividad residual se midió utilizando el ensayo PNP-G7 (descrito más arriba). La actividad residual en las muestras se midió utilizando tampón de Britton Robinson pH 7,3. El descenso en la actividad residual se midió con respecto a una solución de referencia correspondiente de la misma enzima a 0 minutos, que no ha sido incubada a alto pH y 50°C.

[0212] El porcentaje de la actividad inicial como función se muestra en la tabla a continuación para la enzima progenitora (SEQ ID NO: 1) y para las variantes en cuestión.

Variante:	Actividad residual después de 20 min	Actividad residual después de 30 min
$\Delta$ (T183-G184)	32 %	19 %
$\Delta$ (T183-G184)+ A186T	36 %	23 %
$\Delta$ (T183-G184)+K185R+A186T	45 %	29 %
$\Delta$ (T183-G184)+A186I	35 %	20 %
$\Delta$ (T183-G184)+N195F	44 %	n.d.
n.d.= No determinado		

B: Estabilidad de calcio de variantes de la secuencia en la SEQ ID NO:2

[0213] En esta serie de análisis se utilizaron muestras de enzimas purificadas. La medición se realizó usando soluciones de las variantes respectivas en tampón de CAPS 100 mM ajustado a pH 10,5 a lo que se añadió polifosfato fue (a tiempo t=0) para dar una concentración final de 2400 ppm. Las soluciones se incubaron a 50°C.

[0214] Tras la incubación durante 20 y 30 minutos la actividad residual se midió utilizando el ensayo PNP-G7 (descrito más arriba). La actividad residual en las muestras se midió utilizando tampón de Britton Robinson pH 7,3. El descenso en la actividad residual se midió con respecto a una solución de referencia correspondiente de la misma enzima a 0 minutos, que no ha sido incubada a alto pH y 50°C.

[0215] El porcentaje de la actividad inicial como función se muestra en la a continuación para la tabla enzima progenitora (SEQ ID NO: 2) y para las variantes en cuestión.

Variante:	Actividad residual después de 20 min	Actividad residual después de 30 min
$\Delta$ (D183-G184)+M323L	21 %	13 %
$\Delta$ (D183-G184)+M323L+R181S	32 %	19 %
$\Delta$ (D183-G184)+M323L+A186T	28 %	17 %
$\Delta$ (D183-G184)+M323L+A186R	30 %	18 %

Variante:	Actividad residual después de 20 min	Actividad residual después de 30 min
$\Delta$ (D183-G184)	30%	20%
$\Delta$ (D183-G14)+N195F	55%	44%

[0216] En esta serie de análisis se usaron sobrenadantes de cultivo. La medición se realizó usando soluciones de las variantes respectivas en tampón de CAPS 100 mM ajustado a pH 10,5 a lo que se añadió polifosfato fue (a tiempo t=0) para dar una concentración final de 2400 ppm. Las soluciones se incubaron a 50°C.

[0217] Tras la incubación durante 30 minutos la actividad residual se midió utilizando el ensayo Phadebas como se ha descrito anteriormente. La actividad residual en las muestras se midió utilizando tampón de Britton Robinson pH 7,3. El descenso en la actividad residual se midió con respecto a una solución de referencia correspondiente de la misma enzima a 0 minutos, que no ha sido incubada a alto pH y 50°C.

[0218] El porcentaje de la actividad inicial como función se muestra en la tabla a continuación para la enzima progenitora (SEQ ID NO: 2) y para las variantes en cuestión.

Variante:	Actividad residual después de 30 min
$\Delta$ (D183-G184)	0 %
$\Delta$ (D183-G184)+P459T	19 %
$\Delta$ (D183-G184)+K458R	18 %
$\Delta$ (D183-G184)+T461P	13 %
$\Delta$ (D183-G184)+E346Q+K385R	4 %

#### C: Estabilidad de calcio de variantes de la secuencia en la SEQ ID NO:4

[0219] La medición se realizó usando soluciones de las variantes respectivas en tampón de CAPS 100 mM ajustado a pH 10,5 a lo que se añadió polifosfato (a tiempo t=0) a dar una concentración final de 2400 ppm. Las soluciones se incubaron a 60°C durante 20 minutos.

[0220] Tras la incubación durante 20 minutos la actividad residual se midió utilizando el ensayo PNP-G7 (descrito más arriba). La actividad residual en las muestras se midió utilizando tampón de Britton Robinson pH 7,3. El descenso en la actividad residual se midió con respecto a una solución de referencia correspondiente de la misma enzima a 0 minutos, que no ha sido incubada a alto pH y 60°C.

[0221] El porcentaje de la actividad inicial como función se muestra en la tabla a continuación para la enzima progenitora (SEQ ID NO: 4) y para las variantes en cuestión.

Variante:	Actividad residual después de 20 min
Termamyl (SEQ ID NO: 4)	17 %
N265R	28 %
N265D	25 %

#### Ejemplo 9:

Medición de actividad a temperatura media de  $\alpha$ -amilasas con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1.

#### A: actividad de $\alpha$ -amilasa de variantes de la secuencia en la SEQ ID NO:1

[0222] La medición se realizó usando soluciones de las variantes respectivas en tampón Britton Robinson 50 mM ajustado a pH 7,3 y utilizando el ensayo Phadebas anteriormente descrito. La actividad en las muestras se midió a 37°C usando tampón Britton Robinson 50 mM ajustado a pH 7,3 y a 25°C usando tampón de CAPS 50 mM pH 10,5.

[0223] La actividad dependiente de temperatura y el porcentaje de la actividad a 25°C en relación con la actividad a 37°C se muestran en la tabla a continuación para la enzima progenitora (SEQ ID NO: 1) y para las variantes en cuestión.

Variante:	NU/mg 25°C	NU/mg 37°C	NU (25°C) / NU(37°C)
SP690	1440	35000	4.1 %
$\Delta$ (T183-G184)	2900	40000	7.3 %
$\Delta$ (T183-G184)+K269S	1860	12000	15.5 %
$\Delta$ (Q174)	3830	38000	7.9 %

[0224] Otra medición se realizó usando soluciones de las variantes respectivas en tampón Britton Robinson 50 de modo similar al que ajustado a pH 7,3 y utilizando el ensayo Phadebas anteriormente descrito. La actividad en las muestras se midió a 37°C y 50°C usando tampón de Britton Robinson 50 mM pH 7,3.

- 5 [0225] La actividad dependiente de temperatura y el porcentaje de la actividad a 37°C en relación con la actividad a 50°C se muestra en la tabla a continuación para la enzima progenitora (SEQ ID NO: 1) y para las variantes en cuestión.

Variante:	NU/mg 37°C	NU/mg 50°C	NU(37°C) / NU (50°C)
SP690 (seq ID NO: 1)	13090	21669	60 %
K269Q	7804	10063	78 %

10 B: actividad de  $\alpha$ -amilasa de variantes de la secuencia en la SEQ ID NO:2

[0226] La medición se realizó usando soluciones de las variantes respectivas en tampón de Britton Robinson 50 mM ajustado a pH 7,3 y utilizando el ensayo Phadebas anteriormente descrito. La actividad en las muestras se midió a 25°C y 37°C usando tampón de Britton Robinson 50 mM pH 7,3.

- 15 [0227] La actividad dependiente de temperatura y el porcentaje de la actividad a 25°C en relación con la actividad a 37°C se muestra en la tabla a continuación para la enzima progenitora (SEQ ID NO: 2) y para las variantes en cuestión.

Variante:	NU/mg 25°C	NU/mg 37°C	NU(25°C) / NU (37°C)
$\Delta$ (D183-G184)+M323L	3049	10202	30 %
$\Delta$ (D183-G184)+M323L+R181S	18695	36436	51 %

20 C: actividad de  $\alpha$ -amilasa de variantes de la secuencia en la SEQ ID NO:4

[0228] La medición se realizó usando soluciones de las variantes respectivas en tampón de Britton Robinson 50 mM ajustado a pH 7,3 y utilizando el ensayo Phadebas anteriormente descrito. La actividad en las muestras se midió a 37°C usando tampón de Britton Robinson 50 mM pH 7,3 y a 60°C usando tampón de CAPS 50 mM pH 10,5.

- 25 [0229] La actividad dependiente de temperatura y el porcentaje de la actividad a 37°C en relación con la actividad a 60°C se muestra en la tabla a continuación para la enzima progenitora (SEQ ID NO: 4) y para las variantes en cuestión.

Variante:	NU/mg 37°C	NU/mg 60°C	NU(37°C) / NU(60°C)
Termamyl	7400	4350	170%
Q264S	10000	4650	215%

30 **Ejemplo 10**

Construcción de variantes de  $\alpha$ -amilasa híbrido progenitora BAN:1-300/Termamyl:301-483

- 35 [0230] El plásmido pTVB191 contiene la  $\alpha$ -amilasa híbrida BAN:1-300/Termamyl:301-483 que codifica el gen al igual que un origen de replicación funcional en el *Bacillus subtilis* y gen cat que confiere resistencia de cloranfenicol.

- 40 [0231] La variante BM4 (F290E) se construyó utilizando el método de megacebador (Sarkar and Sommer, 1990) con plásmido pTVB191 como modelo.

- 45 [0232] El cebador p1 (SEQ ID NO: 52) y el oligonucleótido mutagénico bm4 (SEQ ID NO: 47) se usaron para amplificar un fragmento de 444 pares de bases con reacción en cadena de polimerasa (PCR) bajo condiciones estándar. Este fragmento se purificó de un gel de agarosa y se usó como ' Megacebador en una segunda PCR con el cebador p2 (SEQ ID NO: 53) dando como resultado un fragmento de 531 pares de bases. Este fragmento se digirió con endonucleasas de restricción HinDIII y Tth111I. El fragmento de 389 pares de bases producido por este fue ligado en el plásmido pTVB191 que había sido dividido con las mismas dos enzimas. El plásmido resultante se transformó en *B. subtilis* SHA273. Se seleccionaron clones resistentes al cloranfenicol cultivando los transformantes en placas que contenían cloranfenicol al igual que almidón insoluble. Los clones que expresan una  $\alpha$ -amilasa activa se aislaron seleccionando clones que formaron halos después de la coloración de las placas con vapor de yodo. La identidad de las mutaciones introducidas fue confirmada por secuenciación de ADN.



[0233] Las variantes BM5(F290K), BM6(F290A), BM8(Q360E) y BM11(N102D) se construyeron de una manera similar. Detalles de su construcción se dan por debajo.

Variante: BM5(F290K)  
oligonucleótido mutagénico: bm5 (SEQ ID NO: 48)  
cebador (primera PCR): p1 (SEQ ID NO: 52)  
Tamaño de fragmento resultante: 444 bp  
Cebador (segunda PCR): p2 (SEQ ID NO: 53)  
Endonucleasas de restricción: HinDIII, Tth111I  
Tamaño de fragmento dividido: 389 pares de bases

Variante: BM6(F290A)  
oligonucleótido mutagénico: bm6 (SEQ ID NO: 49)  
cebador (primera PCR): p1 (SEQ ID NO: 52)  
Tamaño de fragmento resultante: 444 bp  
Cebador (segunda PCR): p2 (SEQ ID NO: 53)  
Endonucleasas de restricción: HinDIII, Tth111I  
Tamaño de fragmento dividido: 389 bp

Variante: BM8(Q360E)  
oligonucleótido mutagénico: bm8 (SEQ ID NO: 50)  
cebador (primera PCR): p1 (SEQ ID NO: 52)  
Tamaño de fragmento resultante: 230 pares de bases  
Cebador (segunda PCR): p2 (SEQ ID NO: 53)  
Endonucleasas de restricción: HinDIII, Tth111I  
Tamaño de fragmento dividido: 389 bp

Variante: BM11(N102D)  
oligonucleótido mutagénico: bm11 (SEQ ID NO: 51)  
cebador (primera PCR): p3 (SEQ ID NO: 54)  
Tamaño de fragmento resultante: 577  
Cebador (segunda PCR): p4 (SEQ ID NO: 55)  
Endonucleasas de restricción: HinDIII, PvuI  
Tamaño de fragmento dividido: 576

#### Oligonucleótidos mutagénicos:

bm4 (SEQ ID NO: 47): F290E  
cebador 5' GTG TTT GAC GTC CCG CTT CAT GAG AAT TTA CAG G bm5 (SEQ ID NO: 48): F290K  
cebador 5' GTG TTT GAC GTC CCG CTT CAT AAG AAT TTA CAG G bm6 (SEQ ID NO: 49): F290A  
cebador 5' GTG TTT GAC GTC CCG CTT CAT GCC AAT TTA CAG G bm8 (SEQ ID NO: 50): Q360E  
cebador 5' AGG GAA TCC GGA TAC CCT GAG GTT TTC TAC GG  
bm11 (SEQ ID NO: 51): N102D  
cebador 5' GAT GTG GTT TTG GAT CAT AAG GCC GGC GCT GAT G

#### Otros cebadores:

p1: 5' CTG TTA TTA ATG CCG CCA AAC C (SEQ ID NO: 52)  
p2: 5' G GAA AAG AAA TGT TTA CGG TTG CG (SEQ ID NO: 53)  
p3: 5' G AAA TGA AGC GGA ACA TCA AAC ACG (SEQ ID NO: 54)  
p4: 5' GTA TGA TTT AGG AGA ATT CC (SEQ ID NO: 55)

### **Ejemplo 11**

Actividad de  $\alpha$ -amilasa a pH alcalino de variantes de  $\alpha$ -amilasa híbrida BAN:1-300/Termamyl:301-483 progenitora.

[0234] Las mediciones se realizaron usando soluciones para las enzimas respectivas y utilizando el ensayo Phadebas (descrito anteriormente). La actividad se midió después de la incubación durante 15 minutos a 30°C en tampón Britton-Robinson 50 mM ajustado al pH indicado por NaOH.

		NU/mg de enzima				
pH	Wt	Q360E	F290A	F290K	F290E	N120D
8.0	5300	7800	8300	4200	6600	6200
9.0	1600	2700	3400	2100	1900	1900

### **REFERENCIAS CITADAS**

[0235]

- 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 ,  
 5 Larson, S.B., *J. Mol. Biol.* (1994) 235, 1560-1584 ,  
 Lawson, C.L., *J. Mol. Biol.* (1994) 236, 590-600 ,  
 Qian, M., et al., *J. Mol. Biol.* (1993) 231, 785-799 ,  
 Brady, R.L., et al., *Acta Crystallogr. sect. B*, 47, 527-535 ,  
 Swift, H.J., et al., *Acta Crystallogr. sect. B*, 47, 535-544  
 10 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 ,  
 15 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989  
 S.L. Beaucage and M.H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22, 1981, pp. 1859-1869  
 Matthes et al., *The EMBO J.* 3, 1984, pp. 801-805 .  
 R.K. Saiki et al., *Science* 239, 1988, pp. 487-491 .  
 Morinaga et al., (1984, *Biotechnology* 2:646-639 )  
 20 Nelson and Long, *Analytical Biochemistry* 180, 1989, pp. 147-151 Hunkapiller et al., 1984, *Nature* 310:105-111  
 R. Higuchi, B. Krummel, and R.K. Saiki (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of  
 DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucl. Acids Res.* 16:7351-7367 .  
 Dubnau et al., 1971, *J. Mol. Biol.* 56, pp. 209-221 .  
 Gryczan et al., 1978, *J. Bacteriol.* 134, pp. 318-329 .  
 25 S.D. Erlich, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, pp. 1680-1682 .  
 Boel et al., 1990, *Biochemistry* 29, pp. 6244-6249 .

#### LISTA DE SECUENCIAS

- 30 **[0236]**
- <110> Novozymes A/S  
 Vedel Borchert, Torben
- 35 <120> Mutantes de alfa-amilasa
- <130> 5368-EP-ETD
- <140> 10180200.7  
 40 <141> 1998-10-30
- <160> 58
- <170> PatentIn version 3.5
- 45 <210> 1  
 <211> 485  
 <212> PRT  
 <213> *Bacillus* sp.
- 50 <400> 1

ES 2 515 218 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			

# ES 2 515 218 T3

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				

# ES 2 515 218 T3

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> 2

<211> 485

5 <212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 2

ES 2 515 218 T3

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

# ES 2 515 218 T3

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

5 <213> Bacillus stearothermophilus

<400> 3



ES 2 515 218 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

# ES 2 515 218 T3

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  
 325 330 335  
 Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala  
 340 345 350  
 Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp  
 355 360 365  
 Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile  
 370 375 380  
 Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His  
 385 390 395 400  
 Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Val  
 405 410 415  
 Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro

420				425				430							
Gly	Gly	Ser	Lys	Trp	Met	Tyr	Val	Gly	Lys	Gln	His	Ala	Gly	Lys	Val
435				440				445							
Phe	Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly	Asn	Arg	Ser	Asp	Thr	Val	Thr	Ile	Asn	Ser
450				455				460							
Asp	Gly	Trp	Gly	Glu	Phe	Lys	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Val	Trp
465				470				475				480			
Val	Pro	Arg	Lys	Thr	Thr	Val	Ser	Thr	Ile	Ala	Trp	Ser	Ile	Thr	Thr
485				490				495							
Arg	Pro	Trp	Thr	Asp	Glu	Phe	Val	Arg	Trp	Thr	Glu	Pro	Arg	Leu	Val
500				505				510							

Ala Trp

<210> 4

<211> 483

5 <212> PRT

<213> *Bacillus lincheniformis*

<400> 4

# ES 2 515 218 T3

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

# ES 2 515 218 T3

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

5 <213> Bacillus amyloquefaciens

<400> 5

ES 2 515 218 T3

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	

# ES 2 515 218 T3

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
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
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
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

<210> 6

<211> 485

5 <212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 6

ES 2 515 218 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 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

# ES 2 515 218 T3

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

5 <212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 7

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

# ES 2 515 218 T3

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 2 515 218 T3

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

<211> 485

5 <212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 8

ES 2 515 218 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			



# ES 2 515 218 T3

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
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
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
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> 9

<211> 1455

5 <212> ADN

<213> Bacillus sp.

<400> 9

catcataatg gaacaaatgg tactatgatg caatatttcg aatggatattt gccaaatgac	60
gggaatcatt ggaacaggtt gagggatgac gcagctaact taaagagtaa agggataaca	120
gctgtatgga tcccacctgc atggaagggg acttcccaga atgatgtagg ttatggagcc	180
tatgatttat atgatcttgg agagttaaac cagaagggga cggttcgtac aaaatatgga	240
acacgcaacc agctacaggc tgcggtgacc tctttaaaaa ataacggcat tcaggatatat	300
ggtgatgtcg tcatgaatca taaagggtgga gcagatggta cggaaattgt aaatgcggta	360
gaagtgaatc ggagcaaccg aaaccaggaa acctcaggag agtatgcaat agaagcgtgg	420
acaaagtttg attttcctgg aagaggaaat aaccattcca gctttaagtg gcgctggtat	480
cattttgatg ggacagattg ggatcagtca cgccagcttc aaaacaaaat atataaattc	540
aggggaacag gcaaggcctg ggactgggaa gtcgatacag agaatggcaa ctatgactat	600
cttatgtatg cagacgtgga tatggatcac ccagaagtaa tacatgaact tagaaactgg	660
ggagtgtggt atacgaatac actgaacctt gatggattta gaatagatgc agtgaaacat	720
ataaaatata gctttacgag agattggctt acacatgtgc gtaacaccac aggtaaacca	780
atgtttgcag tggctgagtt ttggaaaaat gaccttggtg caattgaaaa ctatttgaat	840
aaaacaagtt ggaatcactc ggtgtttgat gttcctctcc actataattt gtacaatgca	900
tctaatagcg gtggttatta tgatatgaga aatattttaa atggttctgt ggtgcaaaaa	960
catccaacac atgccgttac ttttgttgat aaccatgatt ctcagcccgg ggaagcattg	1020
gaatcctttg ttcaacaatg gtttaaacca cttgcatatg cattggttct gacaagggaa	1080
caaggttatc cttccgtatt ttatggggat tactacggta tcccaaccca tgggtgtccg	1140
gctatgaaat ctaaaaataga ccctcttctg caggcacgtc aaacttttgc ctatggtacg	1200
cagcatgatt actttgatca tcatgatatt atcggttgga caagagaggg aaatagctcc	1260
catccaaatt caggccttgc caccattatg tcagatggtc caggtggtaa caaatggatg	1320
tatgtgggga aaaataaagc gggacaagtt tggagagata ttaccggaaa taggacaggc	1380
accgtcacia ttaatgcaga cggatggggg aatttctctg ttaatggagg gtccgtttcg	1440
gtttgggtga agcaa	1455

<210> 10

<211> 1455

5 <212> ADN

<213> Bacillus sp.

<400> 10

catcataatg ggacaaatgg gacgatgatg caatactttg aatggcactt gcctaataatgat	60
gggaatcact ggaatagatt aagagatgat gctagtaatc taagaaatag aggtataacc	120
gctatttgga ttccgcctgc ctggaaaggg acttcgcaaa atgatgtggg gtatggagcc	180
tatgatcttt atgatttagg ggaatttaaat caaaagggga cggttcgtac taagtatggg	240
acacgtagtc aattggagtc tgccatccat gctttaaaga ataatggcgt tcaagtttat	300
ggggatgtag tgatgaacca taaaggagga gctgatgcta cagaaaacgt tcttgctgtc	360
gaggtgaatc caaataaccg gaatcaagaa atatctgggg actacacaat tgaggcttgg	420
actaagtttg attttccagg gaggggtaac acatactcag actttaaatg gcgttggtat	480
catttcgatg gtgtagattg ggatcaatca cgacaattcc aaaatcgtat ctacaaattc	540
cgaggtgatg gtaaggcatg ggattgggaa gtagattcgg aaaatggaaa ttatgattat	600
ttaatgtatg cagatgtaga tatggatcat ccggaggtag taaatgagct tagaagatgg	660
ggagaatggt atacaaatac attaaatctt gatggattta ggatcgatgc ggtgaagcat	720
attaaatata gctttacacg tgattggttg acccatgtaa gaaacgcaac gggaaaagaa	780
atgtttgctg ttgctgaatt ttggaaaaat gatttaggtg ccttggagaa ctatttaaat	840
aaaacaaact ggaatcattc tgtctttgat gtcccccttc attataatct ttataacgcg	900
tcaaatagtg gaggcaacta tgacatggca aaacttctta atggaacggt tgttcaaaag	960
catccaatgc atgccgtaac ttttgtggat aatcacgatt ctcaacctgg ggaatcatta	1020
gaatcatttg tacaagaatg gtttaagcca cttgcttatg cgcttatattt aacaagagaa	1080
caaggctatc cctctgtctt ctatggtgac tactatggaa ttccaacaca tagtgtccca	1140
gcaatgaaag ccaagattga tccaatctta gaggcgcgtc aaaattttgc atatggaaca	1200
caacatgatt attttgacca tcataatata atcggatgga cacgtgaagg aaataccacg	1260
catcccaatt caggacttgc gactatcatg tcggatgggc cagggggaga gaaatggatg	1320
tacgtagggc aaaataaagc aggtcaagtt tggcatgaca taactggaaa taaaccagga	1380
acagttacga tcaatgcaga tggatgggct aatttttcag taaatggagg atctgtttcc	1440
atttgggtga aacga	1455

<210> 11

<211> 1548

5 <212> ADN

<213> Bacillus stearothermophilus

<400> 11

gccgcaccgt ttaacggcac catgatgcag tatTTTTgaat ggtacttgcc ggatgatggc	60
acgttatgga ccaaagtggc caatgaagcc aacaacttat ccagccttgg catcaccgct	120
ctttggctgc cgcccgtta caaaggaaca agccgcagcg acgtagggta cggagtatac	180
gacttgatg acctcggcga attcaatcaa aaagggaccg tccgcacaaa atacggaaca	240
aaagctcaat atcttcaagc cattcaagcc gcccacgccg ctggaatgca agtgtacgcc	300
gatgtcgtgt tcgaccataa aggcggcgct gacggcacgg aatgggtgga cgccgtcgaa	360
gtcaatccgt ccgaccgcaa ccaagaaatc tcgggcacct atcaaatcca agcatggacg	420
aaatttgatt ttcccgggcg gggcaacacc tactccagct ttaagtggcg ctggtaccat	480
tttgacggcg ttgattggga cgaaagccga aaattgagcc gcatttaca attccgcggc	540
atcggcaaag cgtgggattg ggaagtagac acggaaaacg gaaactatga ctacttaatg	600
tatgccgacc ttgatatgga tcatcccgaa gtcgtgaccg agctgaaaaa ctgggggaaa	660
tggtatgtca acacaacgaa cattgatggg ttccggcttg atgccgtcaa gcatattaag	720
ttcagttttt ttcttgattg gttgtcgtat gtgcgttctc agactggcaa gccgctatTT	780
accgtcgggg aatattggag ctatgacatc aacaagttgc acaattacat tacgaaaaca	840
gacggaacga tgtctttgtt tgatgccccg ttacacaaca aattttatac cgcttccaaa	900
tcagggggcg catttgatat gcgcacgtta atgaccaata ctctcatgaa agatcaaccg	960
acattggccg tcaccttctg tgataatcat gacaccgaac ccggccaagc gctgcagtca	1020
tgggtcgacc catggttcaa accgttggct tacgccttta ttctaactcg gcaggaagga	1080
taccctgctg tcttttatgg tgactattat ggcattccac aatataacat tccttcgctg	1140
aaaagcaaaa tcgatccgct cctcatcgcg cgcagggatt atgcttacgg aacgcaacat	1200
gattatcttg atcactccga catcatcggg tggacaaggg aagggggcac tgaaaaacca	1260
ggatccggac tggccgcact gatcaccgat gggccgggag gaagcaaatg gatgtacgtt	1320
ggcaaacaac acgttgaaa agtgttctat gaccttaccg gcaaccggag tgacaccgtc	1380
accatcaaca gtgatggatg gggggaattc aaagtcaatg gcggttcggt ttcggtttgg	1440
gttcctagaa aaacgaccgt ttctaccatc gtcggccga tcacaacccg accgtggact	1500
ggtgaattcg tccgttggac cgaaccacgg ttggtggcat ggccttga	1548

<210> 12

<211> 1920

5 <212> ADN

<213> *Bacillus licheniformis*

<400> 12

cggaagattg gaagtacaaa aataagcaaa agattgtcaa tcatgtcatg agccatgcgg	60
gagacggaaa aatcgtctta atgcacgata tttatgcaac gtctgcagat gctgctgaag	120
agattattaa aaagctgaaa gcaaaaggct atcaattgggt aactgtatct cagcttgaag	180
aagtgaagaa gcagagaggc tattgaataa atgagtagaa gcgccatata ggcgcttttc	240
ttttggaaga aaatataggg aaaatggtac ttgttaaaaa ttcggaatat ttatacaaca	300
tcatatgttt cacattgaaa ggggaggaga atcatgaaac aacaaaaacg gctttacgcc	360
cgattgctga cgctgttatt tgcgctcatc ttcttgctgc ctcatctctgc agcagcggcg	420
gcaaacttta atgggacgct gatgcagtat tttgaatgggt acatgcccaa tgacggccaa	480
cattggaggc gtttgcaaaa cgactcggca tatttggtctg aacacgggtat tactgccgtc	540
tggattcccc cgcatataa gggaacgagc caagcggatg tgggctacgg tgcttacgac	600
ctttatgatt taggggagtt tcatcaaaaa gggacgggtc ggacaaagta cggcacaaaa	660
ggagagctgc aatctgcgat caaaagtctt cattcccgcg acattaacgt ttacggggat	720
gtggtcatca accacaaagg cggcgctgat gcgaccgaag atgtaaccgc ggttgaagtc	780
gatcccgtc accgcaaccg cgtaatttca ggagaacacc taattaaagc ctggacacat	840
tttcattttc cggggcgcg cagcacatac agcgatttta aatggcattg gtaccatttt	900
gacggaaccg attgggacga gtcccgaag ctgaaccgca tctataagtt tcaaggaaag	960
gcttgggatt gggaagtttc caatgaaaac ggcaactatg attatttgat gtatgccgac	1020
atcgattatg accatcctga tgtcgcagca gaaattaaga gatggggcac ttggtatgcc	1080
aatgaactgc aattggacgg tttccgtctt gatgctgtca aacacattaa attttctttt	1140
ttgcgggatt gggttaatca tgtcagggaa aaaacgggga aggaaatgtt tacggtagct	1200
gaatattggc agaatgactt gggcgcgctg gaaaactatt tgaacaaaac aaattttaat	1260
cattcagtgt ttgacgtgcc gcttcattat cagttccatg ctgcatcgac acagggaggc	1320
ggctatgata tgaggaaatt gctgaacggt acggtcgttt ccaagcatcc gttgaaatcg	1380
gttacatttg tcgataacca tgatacacag cgggggcaat cgcttgagtc gactgtccaa	1440
acatggttta agccgcttgc ttacgctttt attctcacia gggaatctgg ataccctcag	1500
gttttctacg gggatatgta cgggacgaaa ggagactccc agcgcgaaat tcctgccttg	1560
aaacacaaaa ttgaaccgat cttaaaagcg agaaaacagt atgcgtacgg agcacagcat	1620

# ES 2 515 218 T3

<b>gattatttcg accaccatga cattgtcggc tggacaaggg aaggcgacag ctcggttgca</b>	<b>1680</b>
<b>aattcagggtt tggcggcatt aataacagac ggacccgggtg gggcaaagcg aatgtatgtc</b>	<b>1740</b>
<b>ggcgggcaaa acgccgggtga gacatggcat gacattaccg gaaaccgttc ggagccgggtt</b>	<b>1800</b>
<b>gtcatcaatt cggaaggctg gggagagttt cacgtaaacg gcgggtcggt ttcaatttat</b>	<b>1860</b>
<b>gttcaaagat agaagagcag agaggacgga tttcctgaag gaaatccgtt tttttatttt</b>	<b>1920</b>

<210> 13

<211> 1455

5 <212> ADN

<213> Bacillus sp.

<400> 13

catcataatg gaacaaatgg tactatgatg caatatttcg aatggatattt gccaaatgac	60
gggaatcatt ggaacaggtt gagggatgac gcagctaact taaagagtaa agggataaca	120
gctgtatgga tcccacctgc atggaagggg acttcccaga atgatgtagg ttatggagcc	180
tatgatttat atgatcttgg agagtttaac cagaagggga cggttcgtac aaaatatgga	240
acacgcaacc agctacaggc tgcggtgacc tctttaaaaa ataacggcat tcaggtatat	300
ggtgatgtcg tcatgaatca taaaggtgga gcagatggta cggaaattgt aaatgcggta	360
gaagtgaatc ggagcaaccg aaaccaggaa acctcaggag agtatgcaat agaagcgtgg	420
acaaagtttg attttcctgg aagaggaaat aaccattcca gctttaagtg gcgctggtat	480
cattttgatg ggacagattg ggatcagtca cgccagcttc aaaacaaaat atataaattc	540
aggggaacag gcaaggcctg ggactgggaa gtcgatacag agaatggcaa ctatgactat	600
cttatgtatg cagacgtgga tatggatcac ccagaagtaa tacatgaact tagaaactgg	660
ggagtgtggt atacgaatac actgaacctt gatggattta gaatagatgc agtgaaacat	720
ataaaatata gctttacgag agattggctt acacatgtgc gtaacaccac aggtaaacca	780
atgtttgcag tggtgagtt ttggaaaaat gaccttggtg caattgaaaa ctatttgaat	840
aaaacaagtt ggaatcactc ggtgtttgat gttcctctcc actataattt gtacaatgca	900
tctaatagcg gtggttatta tgatatgaga aatattttaa atggttctgt ggtgcaaaaa	960
catccaacac atgccgttac ttttgttgat aaccatgatt ctcagcccgg ggaagcattg	1020
gaatcctttg ttcaacaatg gtttaaacca cttgcatatg cattggttct gacaagggaa	1080
caaggttatc cttccgtatt ttatggggat tactacggta tcccaacca tgggtgtccg	1140
gctatgaaat ctaaaataga ccctcttctg caggcacgtc aaacttttgc ctatggtacg	1200
cagcatgatt actttgatca tcatgatatt atcggttgga caagagaggg aaatagctcc	1260
catccaaatt caggccttgc caccattatg tcagatggtc caggtggtaa caaatggatg	1320
tatgtgggga aaaataaagc gggacaagtt tggagagata ttaccggaaa taggacaggc	1380
accgtcacia ttaatgcaga cggatggggg aatttctctg ttaatggagg gtccgtttcg	1440
gtttgggtga agcaa	1455

<210> 14

<211> 1455

5 <212> ADN

<213> Bacillus sp.

<400> 14



catcataatg ggacaaatgg gacgatgatg caatactttg aatggcactt gcctaataatg 60  
 ggggaatcact ggaatagatt aagagatgat gctagtaatc taagaaatag aggtataacc 120  
 gctatattgga ttccgcctgc ctggaaaggg acttcgcaaa atgatgtggg gtatggagcc 180  
 tatgatcttt atgatttagg ggaatttaaat caaaagggga cggttcgtac taagtatggg 240  
 acacgtagtc aattggagtc tgccatccat gctttaaaga ataatggcgt tcaagtttat 300  
 ggggatgtag tgatgaacca taaaggagga gctgatgcta cagaaaacgt tcttgctgtc 360  
 gaggtgaatc caaataaccg gaatcaagaa atatctgggg actacacaat tgaggcttgg 420  
 actaagtttg attttccagg gaggggtaat acatactcag actttaaatg gcgttggtat 480  
 catttcgatg gtgtagattg ggatcaatca cgacaattcc aaaatcgtat ctacaaattc 540  
 cgaggtgatg gtaaggcatg ggattgggaa gtagattcgg aaaatggaaa ttatgattat 600  
 ttaatgtatg cagatgtaga tatggatcat ccggaggtag taaatgagct tagaagatgg 660  
 ggagaatggt atacaaatac attaaatctt gatggattta ggatcgatgc ggtgaagcat 720  
 attaaatata gctttacacg tgattgggtg acccatgtaa gaaacgcaac gggaaaagaa 780  
 atgtttgctg ttgctgaatt ttggaaaaat gatttaggtg ccttgagaa ctatttaa 840  
 aaaacaaact ggaatcattc tgtctttgat gtcccccttc attataatct ttataacgcg 900  
 tcaaatagtg gaggcaacta tgacatggca aaacttctta atggaacggt tgttcaaaag 960  
 catccaatgc atgccgtaac ttttgtggat aatcacgatt ctcaacctgg ggaatcatta 1020  
 gaatcatttg tacaagaatg gtttaagcca cttgcttatg cgcttatttt aacaagagaa 1080  
 caaggctatc cctctgtctt ctatggtgac tactatggaa ttccaacaca tagtgtccca 1140  
 gcaatgaaag ccaagattga tccaatctta gaggcgcgtc aaaattttgc atatggaaca 1200  
 caacatgatt attttgacca tcataatata atcggatgga cacgtgaagg aaataccacg 1260  
 catcccaatt caggacttgc gactatcatg tcggatgggc cagggggaga gaaatggatg 1320  
 tacgtagggc aaaataaagc aggtcaagtt tggcatgaca taactggaaa taaaccagga 1380  
 acagttacga tcaatgcaga tggatgggct aatttttcag taaatggagg atctgtttcc 1440  
 atttgggtga aacga 1455

<210> 15  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Cebador directo FSA

10

<400> 15  
 caaaatcga tctacaaatt cmrksyarg dvktgggatt sggaagtaga ttcggaaaat

60

5  
 <210> 16  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador inverso RSA  
 10  
 <400> 16  
 gaattgtag atacgattt g 21  
 <210> 17  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 15  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de cebador  
 20  
 <400> 17  
 cgattgctga cgctgtatt tgcg 24  
 <210> 18  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 25  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Secuencia de cebador  
 30  
 <400> 18  
 ctgttcct tgtcagaacc aatg 24  
 <210> 19  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 35  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador 101458  
 40  
 <400> 19  
 gtcatagttg ccgaaatctg tatcgacttc 30  
 45  
 <210> 20  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Cebador 101638  
 <400> 20  
 cccagtccca cgtacgtccc ctgaatttat atatttg 38  
 55  
 <210> 21

# ES 2 515 218 T3

	<211> 38	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Oligo 1	
	<220>	
	<221> misc_feature	
10	<222> (12)..(12)	
	<223> n is a, c, g, or t	
	<400> 21	
15	cccagtccca gntcttccc ctgaatttat atatttg	38
	<210> 22	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador X2	
	<400> 22	
25	gcgtggacaa agtttgattt tcctg	25
	<210> 23	
	<211> 21	
	<212> ADN	
30	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador DA01	
35	<400> 23	
	cctaatagatg ggaatcactg g	21
	<210> 24	
	<211> 24	
40	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador DA03	
45	<400> 24	
	gcattggatg ctttgaaca accg	24
	<210> 25	
50	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador DA07	

# ES 2 515 218 T3

	<400> 25 cgcaaatga tatcgggtat ggagcc	26
5	<210> 26 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador DA20	
	<400> 26 gtgatgaacc acswaggtgg agctgatgc	29
15	<210> 27 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador DA14	
	<400> 27 gatggtgtat ggrycaatca cgacaattcc	30
25	<210> 28 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador DA15	
35	<400> 28 ggtgtatggg ataactcacg acaattcc	28
40	<210> 29 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador DA16	
45	<400> 29 ggtgtatggg atctctcacg acaattcc	28
50	<210> 30 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador DA17	
55	<400> 30	

# ES 2 515 218 T3

	gggatcaatc acgaaatttc caaaatcgta tc	32
5	<210> 31 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador DA18	
	<400> 31 gggatcaatc acgactcttc caaaatcgta tc	32
15	<210> 32 <211> 34 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador DA06	
	<400> 32 ggaaattatg attatatcat gtatgcagat gtag	34
25	<210> 33 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Cebador DA09	
35	<400> 33 gctgaatttt ggtcgaatga ttaggtgcc	30
40	<210> 34 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador DA11	
45	<400> 34 gctgaatttt ggtcgaatga ttaggtgcc	30
50	<210> 35 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador DA21	
55	<400> 35 gaattttgga agtacgattt aggtcgg	27

# ES 2 515 218 T3

5  
 <210> 36  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador DA12  
 10  
 <400> 36  
 ggaaaaacga trycggtgcc ttggagaac 29  
 <210> 37  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 15  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador DA13  
 20  
 <400> 37  
 gatttaggtg cctrycagaa ctattta 27  
 <210> 38  
 <211> 26  
 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Cebador DA08  
 30  
 <400> 38  
 ccccttcat gagaatcttt ataacg 26  
 <210> 39  
 <211> 25  
 35  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 40  
 <223> Cebador DA04  
 <400> 39  
 gaatccgaac ctattacac attcg 25  
 45  
 <210> 40  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Cebador DA05  
 <400> 40  
 cgatggact cgagaaggaa ataccacg 28  
 55  
 <210> 41

# ES 2 515 218 T3

<211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Cebador DA10

10 <400> 41  
 cgtagggcaa aatcaggccg gtcaagttg g 31

15 <210> 42  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador DA22

25 <400> 42  
 cataactgga aatcgcccgg gaacagttac g 31

30 <210> 43  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

35 <220>  
 <223> Cebador DA19

40 <400> 43  
 ctggaaataa awccggaaca gttacg 26

45 <210> 44  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> Cebador DA23

55 <400> 44  
 ggaaataaac caggaccggt tacgatcaat gc 32

60 <210> 45  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

65 <220>  
 <223> Cebador DA32

70 <400> 45  
 gaggcttgga ctaggttga tttccag 28

75 <210> 46  
 <211> 30

# ES 2 515 218 T3

	<212> ADN	
	<213> Cebador DA31	
5	<400> 46 gctgaatttt ggcgcaatga ttaggtgcc	30
	<210> 47	
	<211> 34	
10	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador bm4	
15	<400> 47 gtgtttgacg tcccgttca tgagaattta cagg	34
	<210> 48	
	<211> 34	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Cebador bm5	
25	<400> 48 gtgtttgacg tcccgttca taagaattta cagg	34
	<210> 49	
30	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> Cebador bm6	
	<400> 49 gtgtttgacg tcccgttca tgccaattta cagg	34
40	<210> 50	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> Cebador bm8	
	<400> 50 agggaatccg gataccctga gggtttctac gg	32
50	<210> 51	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	



# ES 2 515 218 T3

<223> Cebador bm11

<400> 51  
gatgtggttt tggatcataa ggccggcgct gatg 34

5

<210> 52  
<211> 22  
<212> ADN  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> Cebador p1

<400> 52  
ctgttattaa tgccgcaaaa cc 22

15

<210> 53  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Artificial

20

<220>  
<223> Cebador p2

<400> 53  
ggaaaagaaa tgtttacggt tgcg 24

25

<210> 54  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Artificial

30

<220>  
<223> Cebador p3

35

<400> 54  
gaaatgaagc ggaacatcaa acacg 25

40

<210> 55  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Artificial

<220>  
<223> Cebador p4

45

<400> 55  
gtatgattta ggagaattcc 20

50

<210> 56  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Artificial

55

<220>  
<223> Cebador b11

## ES 2 515 218 T3

	<400> 56	
	ccagcgcgcc taggtcacgc tgccaatatt cag	33
5	<210> 57	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador b12	
	<400> 57	
	ccagcgcgcc taggtcatcc tgccaatatt cag	33
15	<210> 58	
	<211> 2084	
	<212> ADN	
	<213> Bacillus amyloliquefaciens	
20	<400> 58	

# ES 2 515 218 T3

gccccgcaca	tacgaaaaga	ctggctgaaa	acattgagcc	tttgatgact	gatgatttgg	60
ctgaagaagt	ggatcgattg	tttgagaaaa	gaagaagacc	ataaaaatac	cttgtctgtc	120
atcagacagg	gtatttttta	tgctgtccag	actgtccgct	gtgtaaaaat	aaggaataaa	180
ggggggttgt	tattatttta	ctgatatgta	aaatataatt	tgtataagaa	aatgagaggg	240
agaggaaaca	tgattcaaaa	acgaaagcgg	acagtttcgt	tcagacttgt	gcttatgtgc	300
acgctgttat	ttgtcagttt	gccgattaca	aaaacatcag	ccgtaaatgg	cacgctgatg	360
cagtattttg	aatggtatac	gccgaacgac	ggccagcatt	ggaaacgatt	gcagaatgat	420
gcggaacatt	tatcggatat	cggaaatcact	gccgtctgga	ttcctcccgc	atacaaagga	480
ttgagccaat	ccgataacgg	atacggacct	tatgatttgt	atgatttagg	agaattccag	540
caaaaaggga	cggtcagaac	gaaatacggc	acaaaatcag	agcttcaaga	tgcgatcggc	600
tcactgcatt	cccggaaagt	ccaagtatac	ggagatgtgg	ttttgaatca	taaggctggt	660
gctgatgcaa	cagaagatgt	aactgccgtc	gaagtcaatc	cggccaatag	aaatcaggaa	720
acttcggagg	aatatcaaat	caaagcgtgg	acggattttc	gttttccggg	ccgtggaaac	780
acgtacagtg	attttaaatg	gcattgggat	catttcgacg	gagcggactg	ggatgaatcc	840
cggaaagatca	gccgcatott	taagtttcgt	ggggaaggaa	aagcgtggga	ttgggaagta	900
tcaagtgaia	acggcaacta	tgactattta	atgtatgctg	atgttgacta	cgaccaccct	960
gatgtcgtgg	cagagacaaa	aaaatggggg	atctggtatg	cgaatgaact	gtcattagac	1020
ggcttccgta	ttgatgccgc	caaacatatt	aaattttcat	ttctgcgtga	ttgggttcag	1080
gcggtcagac	aggcgacggg	aaaagaaatg	tttacggttg	cggagtattg	gcagaataat	1140
gccgggaaac	tcgaaaacta	cttgaataaa	acaagcttta	atcaatccgt	gtttgatgtt	1200
ccgcttcatt	tcaattttaca	ggcggcttcc	tcacaaggag	gcggatatga	tatgaggcgt	1260
ttgctggacg	gtaccgttgt	gtccaggcat	ccggaaaagg	cggttacatt	tgttgaaaat	1320
catgacacac	agccgggaca	gtcattggaa	tcgacagtcc	aaacttggtt	taaaccgctt	1380
gcatacgctt	ttattttgac	aagagaatcc	ggttatcctc	aggtgttcta	tggggatatg	1440
tacgggacaa	aaggagacatc	gccaaaggaa	attccctcac	tgaaagataa	tatagagccg	1500
attttaaaaag	cgcgtaagga	gtacgcatac	gggccccagc	acgattatat	tgaccacccg	1560
gatgtgatcg	gatggacgag	ggaagggtgac	agctccgccc	ccaaatcagg	tttgcccgct	1620
ttaatcacgg	acggacccgg	cggatcaaag	cggatgtatg	ccggcctgaa	aatgccggc	1680
gagacatggt	atgacataac	gggcaaccgt	tcagatactg	taaaaatcgg	atctgacggc	1740
tggggagagt	ttcatgtaaa	cgatgggtcc	gtctccattt	atgttcagaa	ataaggtaat	1800
aaaaaaacac	ctccaagctg	agtgcgggta	tcagcttgga	ggtgcgttta	ttttttcagc	1860
cgtatgacaa	ggtcggcatc	aggtgtgaca	aatacgggat	gctggctgtc	ataggtgaca	1920

## ES 2 515 218 T3

aatccggggtt ttgcgccgtt tggctttttc acatgtctga tttttgtata atcaacaggc	1980
acggagccgg aatctttcgc cttggaaaaa taagcggcga tcgtagctgc ttccaatatg	2040
gattgttcat cgggatcgct gcttttaatc acaacgtggg atcc	2084

## REIVINDICACIONES

- 5      **1.** Variante de una  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl progenitora, cuya variante tiene actividad de  $\alpha$ -amilasa y muestra estabilidad mejorada a pH 8 hasta 10,5 en relación con la alfa amilasa progenitora. Dicha variante comprende solo una mutación de la  $\alpha$ -amilasa de tipo Termamyl progenitora, donde la única mutación del progenitor es una de las siguientes sustituciones; G149Y,S,K,A,T,C,F,H,W,V (usando la SEQ ID NO: numeración 6) y donde la  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl progenitora tiene al menos 95 % de homología con la SEQ ID NO: 6.
- 10     **2.** Variante según la reivindicación 1, cuya variante tiene una de las siguientes sustituciones: G149A,K,S,Y
- 3.** Uso de una variante de  $\alpha$ -amilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para lavado y/o lavado de la vajilla.
- 4.** Aditivo de detergente que incluye una variante de  $\alpha$ -amilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 15     **5.** Aditivo de detergente según la reivindicación 4 que contiene 0,02-200 mg de enzima proteína/g del aditivo.
- 6.** Aditivo de detergente según la reivindicación 4 o 5, que adicionalmente comprende otra enzima.
- 20     **7.** Composición de detergente que incluye una variante de  $\alpha$ -amilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 8.** Composición de detergente según la reivindicación 7 que adicionalmente comprende otra enzima.
- 25     **9.** Composición de detergente según la reivindicación 8 donde la enzima adicional es una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, otra enzima amilolítica y/o una celulasa.
- 10.** Composición de detergente de lavado de la vajilla manual o automático que incluye una variante de  $\alpha$ -amilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 30     **11.** Composición de detergente de lavado de la vajilla según la reivindicación 10 que adicionalmente comprende otra enzima.
- 12.** Composición de detergente de lavado de la vajilla según la reivindicación 11 donde la enzima adicional es una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, otra enzima amilolítica y/o una celulasa.
- 35     **13.** Composición de detergente de lavado de ropa manual o automático que incluye una variante de  $\alpha$ -amilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 14.** Composición de lavado de ropa según la reivindicación 13, que adicionalmente comprende otra enzima.