



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 268 708**

51 Int. Cl.:

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 15/75 (2006.01)

C12N 9/28 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **96921305 .7**

86 Fecha de presentación : **06.06.1996**

87 Número de publicación de la solicitud: **0832250**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **01.04.1998**

54

Título: **α -amilasa mutante.**

30

Prioridad: **06.06.1995 US 468700**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

73

Titular/es: **GENENCOR INTERNATIONAL, Inc.**
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US

72

Inventor/es: **Mitchinson, Colin;**
Requadt, Carol;
Ropp, Traci;
Solheim, Leif, P.;
Ringer, Christopher y
Day, Anthony

74

Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 268 708 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

α -amilasa mutante.

5 **Campo de la invención**

La presente invención está dirigida a α -amilasas que presentan características de prestaciones alteradas. La presente invención también está dirigida a nuevas enzimas de α -amilasa que tienen al menos un residuo de asparagina que es sustituido por otro aminoácido diferente o que es eliminado, en el que la α -amilasa resultante presenta unas prestaciones de hidrólisis de almidón a pH bajo alteradas, una estabilidad alterada y perfiles de actividad alterados.

Antecedentes de la invención

Las α -amilasas (α -1,4-glucan-4-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1) hidrolizan los enlaces internos α -1,4-glucosídicos del almidón, principalmente de forma aleatoria, para producir malto-dextrinas de menor peso molecular. Las α -amilasas tienen un considerable valor comercial, siendo usadas en las etapas iniciales (licuefacción) del procesado del almidón; en la producción de alcohol; como agentes de limpieza en matrices detergentes; y en la industria textil para reducir el tamaño del almidón. Las α -amilasas se producen a partir de fuentes bacterianas tales como el *Bacillus licheniformis*, el *Bacillus amyloliquefaciens*, el *Bacillus subtilis* o el *Bacillus stearothermophilus*. En los últimos años, las enzimas preferidas para uso comercial han sido las procedentes de *Bacillus licheniformis* debido a su estabilidad térmica y sus prestaciones, al menos a pH's neutros y moderadamente alcalinos.

En general, el procesado de almidón a fructosa consiste en cuatro etapas: licuefacción de almidón granular, sacarificación del almidón licuado para formar dextrosa, purificación e isomerización a fructosa. El objetivo de un proceso de licuefacción de almidón es convertir una suspensión concentrada de gránulos de polímero de almidón en una disolución de dextrinas de cadena más corta solubles de baja viscosidad. Esta etapa es esencial para un manejo adecuado con equipamiento estándar, y para obtener una conversión eficaz de glucosa en otros azúcares. Para licuar almidón granular, es necesario gelatinizar los gránulos aumentando la temperatura del almidón granular por encima de aproximadamente 72°C. El proceso de calentamiento rompe instantáneamente los gránulos de almidón insoluble para producir una disolución de almidón soluble en agua. La disolución de almidón solubilizado se licua a continuación mediante α -amilasa (EC 3.2.1.1.).

Un proceso de licuefacción enzimática común incluye ajustar el pH de una mezcla de almidón granular hasta entre 6,0 y 6,5, el pH óptimo para la α -amilasa procedente de *Bacillus licheniformis*, mediante la adición de hidróxido cálcico, de hidróxido sódico o de carbonato sódico. La adición de hidróxido cálcico tiene la ventaja de que también proporciona iones calcio, conocidos por estabilizar las α -amilasas frente a la desactivación. Tras añadir las α -amilasas, la suspensión se bombea a través de un chorro de vapor para aumentar de forma instantánea la temperatura hasta 80-115°C. El almidón se gelatiniza inmediatamente y, debido a la presencia de α -amilasas, se despolimeriza por hidrólisis aleatoria de los enlaces α -(1,4)-glicosídicos para dar lugar a una masa fluida que se bombea fácilmente.

En una segunda variante del proceso de licuefacción, se añade la α -amilasa a la suspensión de almidón, se mantiene la suspensión a una temperatura de 80-100°C para hidrolizar parcialmente los gránulos de almidón, y la suspensión de almidón parcialmente hidrolizado se bombea a través de un chorro a temperaturas por encima de aproximadamente 105°C con el fin de gelatinizar por completo cualquier estructura granular remanente. Después de enfriar el almidón gelatinizado, se puede realizar una segunda adición de α -amilasa para hidrolizar aún más el almidón.

Una tercera variante de este proceso se denomina proceso de molienda en seco. En la molienda en seco, se muele el grano entero y se combina con agua. Opcionalmente el germen se retira mediante separación por flotación o por otras técnicas equivalentes. La mezcla resultante, que contiene almidón, fibra, proteína y otros componentes del grano, se licua usando α -amilasa. La práctica general en la técnica es acometer la licuefacción enzimática a una temperatura menor cuando se usa el proceso de molienda en seco. Generalmente, se cree que la licuefacción a baja temperatura es menos eficaz que la licuefacción a alta temperatura a la hora de convertir el almidón en dextrinas solubles.

Típicamente, después de la gelatinización, la disolución de almidón se mantiene a una temperatura elevada en presencia de α -amilasa hasta que se alcanza una ED de 10-20, normalmente un periodo de 1-3 horas. El equivalente de dextrosa (ED) es el patrón industrial para medir la concentración de azúcares reductoras totales, calculado como D-glucosa en base al peso seco. El almidón granular no hidrolizado presenta un ED virtualmente cero, mientras que el ED de D-glucosa se define como 100.

La temperatura máxima a la que se puede mantener la disolución de almidón que contiene α -amilasa depende de la fuente microbiana a partir de la cual se ha obtenido la enzima y de la estructura molecular de la molécula de α -amilasa. Las α -amilasas producidas por cepas naturales de *Bacillus subtilis* o de *Bacillus amyloliquefaciens* se usan normalmente a temperaturas que no superan aproximadamente los 90°C, debido a una desactivación térmica excesivamente rápida por encima de esa temperatura, mientras que las α -amilasas producidas por cepas naturales de *Bacillus licheniformis* se pueden usar a temperaturas de hasta aproximadamente 110°C. Se sabe que la presencia de almidón y de iones calcio estabiliza las α -amilasas frente a la desactivación. No obstante, las α -amilasas se usan a valores de pH por encima de 6 para protegerlas frente a una rápida desactivación. A temperaturas más bajas, se sabe que la α -amilasa procedente de *Bacillus licheniformis* presenta actividad de hidrólisis sobre el sustrato de almidón a

ES 2 268 708 T3

valores de pH de hasta 5. Sin embargo, cuando se usa la enzima para hidrólisis de almidón a temperaturas de chorro comunes, por ejemplo, entre 102°C y 109°C, se debe mantener el pH por encima de al menos 5,7 para evitar una desactivación excesivamente rápida. Desafortunadamente, el requerimiento de pH proporciona una estrecha ventana de posibilidades de procesado, ya que valores de pH por encima de 6,0 dan como resultado subproductos no deseados, por ejemplo maltulosa. Por tanto, en realidad, el pH de licuefacción se mantiene generalmente entre 5,9 y 6,0 para alcanzar un rendimiento satisfactorio de almidón hidrolizado.

Otro problema en relación con el pH de licuefacción es la necesidad de aumentar el pH de la suspensión de almidón desde aproximadamente 4, el pH de una suspensión de almidón de maíz tal cual llega de la etapa de molienda en húmedo, hasta 5,9-6,0. Este ajuste de pH requiere la adición costosa de productos químicos de neutralización de ácidos, y también requiere un refinado adicional de intercambio iónico del producto final de conversión de almidón para eliminar el producto químico. Además, la siguiente etapa del proceso tras la licuefacción, típicamente la sacarificación del almidón licuado para dar glucosa mediante glucoamilasa, requiere un pH de 4-4,5; por tanto, el pH debe ajustarse desde 5,9-6,0 hasta 4-4,5; lo que requiere más adición de productos químicos y etapas de refinado adicionales.

Después de la licuefacción, el almidón procesado se sacarifica para dar glucosa con glucoamilasa. En los procesos presentes se produce un problema cuando hay almidón residual en la mezcla de sacarificación debido a una licuefacción incompleta del almidón, por ejemplo, una hidrólisis ineficaz de amilasa por amilasa. El almidón residual es altamente resistente a la hidrólisis por glucoamilasa. Supone una pérdida de rendimiento e interfiere con la posterior filtración de los jarabes.

Adicionalmente, se sabe que muchas α -amilasas requieren la adición de iones calcio para mejorar la estabilidad. Esto aumenta aún más el coste de la licuefacción.

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

En la Patente de EE.UU. N° 5.180.669, se logró la licuefacción entre pH 5,0 y 6,0 mediante la adición de iones carbonato en exceso con respecto a la cantidad necesaria para tamponar la disolución de la mezcla de almidón molido. Debido a un efecto de aumento del pH que se produce con la adición de iones carbonato, generalmente se neutraliza la mezcla añadiendo una fuente de iones hidrógeno, por ejemplo, un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.

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

En la Publicación PCT N° WO 94/18314, se describe una α -amilasa mutante que tiene una estabilidad oxidativa mejorada, en la que uno o más residuos de metionina, triptófano, cisteína, histidina o tirosina son reemplazados con un aminoácido no oxidable.

En la Publicación PCT N° WO 91/00353, las características de prestaciones y los problemas asociados a la licuefacción de α -amilasa de *Bacillus licheniformis* natural se abordan mediante modificación de ingeniería genética de la α -amilasa para incluir las sustituciones específicas Ala-111-Thr, His-133-Tyr y/o Thr-149-Ile.

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

A pesar de los avances realizados en la técnica anterior, existe una necesidad por una α -amilasa que sea suficientemente eficaz a valores bajos de pH para permitir la licuefacción comercial a menor pH que el actualmente práctico. De forma similar, existe una necesidad de un método que permita una licuefacción eficaz de un grano molido en seco a elevadas temperaturas. Además, existe una necesidad en la técnica de un método que permita la licuefacción eficaz de almidón con una menor dependencia de la costosa adición de calcio. Adicionalmente, existe una

necesidad de una enzima más eficaz para efectuar una hidrólisis más completa del almidón en la etapa de licuefacción, para asegurar una sacarificación eficaz. Debido a que las amilasas disponibles comercialmente no son aceptables en muchas condiciones debido a problemas de estabilidad, por ejemplo, a los niveles altamente alcalinos y oxidantes (lejía) asociados a detergentes, existe una necesidad de una amilasa que tenga unos perfiles de prestaciones alterados, preferiblemente superiores, en dichas condiciones. Por tanto, serían deseables características de prestaciones alteradas tales como un aumento de la actividad, de la termoestabilidad, de la estabilidad frente al pH, de la estabilidad oxidativa o de la estabilidad frente al calcio, que se pueden lograr a la vez que se altera, se mantiene o aumenta la actividad enzimática, en comparación con la enzima natural o precursora.

10 Resumen de la invención

Un objetivo de la presente invención es proporcionar una α -amilasa que presente perfiles de prestaciones alterados, tal como la estabilidad frente al pH, la estabilidad alcalina, la estabilidad oxidativa o la actividad enzimática.

15 Un objetivo adicional de la presente invención es proporcionar una α -amilasa que presenta una estabilidad aumentada en ausencia de ión calcio añadido durante la licuefacción del almidón.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una α -amilasa que presenta una estabilidad a pH bajo alterada para su uso en la licuefacción eficaz a bajo pH.

20 Otro objetivo adicional de la presente invención es proporcionar una α -amilasa que permite una licuefacción eficaz de grano molido seco a elevadas temperaturas.

Otro objetivo adicional de la presente invención es proporcionar una α -amilasa que es útil en entornos de pH elevado o en presencia de oxidantes o de lejía.

Otro objetivo adicional de la presente invención es proporcionar una α -amilasa que efectúa una hidrólisis más completa de moléculas de almidón para aumentar la eficacia de la sacarificación.

30 De acuerdo con la presente invención, se proporciona una α -amilasa que el producto de expresión de una secuencia de ADN mutada que codifica una α -amilasa, secuencia de ADN mutada que deriva de una α -amilasa precursora mediante la eliminación o la sustitución de uno o más residuos que tienen el efecto de mejorar las prestaciones de los residuos de α -amilasa.

35 La α -amilasa de la invención comprende una sustitución que corresponde con N188S o N188T del *Bacillus licheniformis*. También de forma preferible, la α -amilasa comprende además la eliminación o la sustitución de un residuo de metionina o triptófano, particularmente en una posición correspondiente a M15, W138 y/o M197, o en un residuo correspondiente a V128, H133, S187 y/o A209 de *Bacillus licheniformis*. En una realización más preferida, se proporciona una α -amilasa que comprende sustituciones en los residuos correspondientes a M15UN188S o M15T/N188S de *Bacillus licheniformis*.

40 Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra oligonucleótidos mutagénicos útiles durante la mutagénesis dirigida de Asn 188 de α -amilasa de *Bacillus licheniformis*. En esta y en las siguientes figuras que muestran constructos de oligonucleótidos, las letras en negrita indican cambios de bases introducidos por el oligonucleótido, y el subrayado indica posiciones de endonucleasa introducidas por el oligonucleótido.

La Figura 2 ilustra los primeros PCR usados para el procesamiento PCR de los moldes de oligonucleótidos mutagénicos.

La Figura 3 ilustra la secuencia de ADN del gen correspondiente a α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (NCIB 8061) (SEQ ID NO: 33) y la secuencia de aminoácidos deducida del producto de traducción (SEQ ID NO: 41), tal como se describe en Gray y col., J. Bacteriology, vol. 166, pág. 635-643 (1986).

55 La Figura 4 ilustra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 34) de la enzima de α -amilasa madura de *Bacillus licheniformis*.

La Figura 5 ilustra un alineamiento de las estructuras primarias de tres α -amilasas de *Bacillus*. La α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (Am-Lich) (SEQ ID NO: 35) se describe en Gray y col., J. Bacteriology, vol. 166, pág. 635-643 (1986); la α -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (Am-Amylo) (SEQ ID NO: 36) se describe en Takkinen y col., J. Biol. Chem., vol. 258, pág. 1007-1013 (1983); y la α -amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (Am-Stearo) (SEQ ID NO: 37) se describe en Ihara y col., J. Biochem., vol. 98, pág. 95-103 (1985).

65 La Figura 6 ilustra el plásmido pHP13 en el que Cm^R se refiere a resistencia a cloranfenicol, Em^R se refiere a resistencia a eritromicina y Rep pTA1060 se refiere al origen de la replicación del plásmido pTA1060.

La Figura 7 ilustra el plásmido pBLapr en el que BL AA se refiere al gen de α -amilasa de *Bacillus licheniformis*;

ES 2 268 708 T3

aprE se refiere al promotor y al péptido señal que codifica la región del gen *aprE*; AmpR se refiere al gen resistente a ampicilina de pBR322; y CAT se refiere al gen de resistencia a cloranfenicol de pC194.

La Figura 8 ilustra el plásmido pHP.BL que porta el gen de α -amilasa de *Bacillus licheniformis*.

La Figura 9 ilustra un esquema del método PCR usado para producir los oligonucleótidos mutantes correspondientes a α -amilasa derivada de *Bacillus licheniformis*.

La Figura 10 ilustra un gráfico derivado de un análisis estadístico de enzima variante de acuerdo con la invención, M15T/N188S, en comparación con la α -amilasa natural de *Bacillus licheniformis* en la licuefacción de almidón a 107°C, 60 ppm de calcio y pH variable.

La figura 11 ilustra un gráfico derivado de un análisis estadístico de la actuación de una enzima variante de acuerdo con la invención, M15T/N188S, en comparación con la α -amilasa natural de *Bacillus licheniformis* en la licuefacción de almidón a 170°C, pH 6,0, y concentración de calcio variable.

La Figura 12 ilustra un gráfico derivado de un análisis estadístico de la actuación de una enzima variante de acuerdo con la invención, M15T/N188S, en comparación con la α -amilasa natural de *Bacillus licheniformis* en la licuefacción de almidón a pH 6,0, 60 ppm de calcio y temperatura variable.

La Figura 13 ilustra los cruces de proteína madura-secuencia señal en una α -amilasa derivada *Bacillus licheniformis* (SEQ ID NO: 38), *Bacillus subtilis* *aprE* (SEQ ID NO: 39) y de *Bacillus licheniformis* in pBLapr (SEQ ID NO: 40).

Descripción detallada

“ α -Amilasa” significa una actividad enzimática que rompe o hidroliza el enlace $\alpha(1-4)$ glicosídico, por ejemplo, en polímeros de almidón, de amilopectina o de amilasa. α -Amilasa tal como se emplea en la presente memoria incluye tanto las α -amilasas naturales como las α -amilasas recombinantes. Las α -amilasas de la presente invención son aquellas derivadas de *Bacillus licheniformis*.

“ α -Amilasa recombinante” significa una α -amilasa en la que la secuencia de ADN que codifica la α -amilasa natural se modifica para producir una secuencia de ADN mutante que codifica la sustitución, inserción o eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia de α -amilasa, en comparación con la α -amilasa natural.

“Vector de expresión” significa un constructo de ADN que comprende una secuencia de ADN que está ligada operativamente a una secuencia de control adecuada capaz de efectuar la expresión de dicho ADN en un hospedante adecuado. Dichas secuencias de control pueden incluir un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar dicha transcripción, una secuencia que codifica posiciones de unión de ribosoma de mRNA adecuadas, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y de la traducción. El promotor *aprE* de *Bacillus subtilis* es un promotor preferido. El vector puede ser un plásmido, una partícula fago, o simplemente un injerto genómico potencial. Una vez transformado en un hospedante adecuado, el vector puede replicarse y funcionar independientemente del genoma hospedante, o puede, en algunos casos, integrarse en el propio genoma. En la presente especificación, a veces plásmido y vector se usan indistintamente para incluir otras formas de vectores de expresión que actúan con funciones equivalentes, y que son, o pasan a ser, conocidos en la técnica.

“Cepa hospedante” o “célula hospedante” significa un hospedante adecuado para un vector de expresión que comprende un ADN que codifica la α -amilasa de acuerdo con la presente invención. Las células hospedantes útiles en la presente invención generalmente son hospedantes procarióticos o eucarióticos, incluyendo cualquier microorganismo transformable en el que se pueda lograr la expresión de α -amilasa de acuerdo con la presente invención. Específicamente, son adecuadas las cepas hospedantes de la misma especie, o género, de la que deriva la α -amilasa, tal como una cepa de *Bacillus*. Preferiblemente, se usa una cepa de *Bacillus* negativa en α -amilasa (genes eliminados) y/o una cepa de *Bacillus* con α -amilasa y proteasa eliminadas ($\Delta amyE$, Δapr , Δnpr). Las células hospedantes se transforman o se transfectan con vectores construidos usando técnicas de ADN recombinante. Dichas células hospedantes transformadas son capaces de replicar vectores que codifican α -amilasa y sus variantes (mutantes) o que expresan la α -amilasa deseada.

“Licuefacción” o “licuar” significan un proceso mediante el cual se convierte almidón en dextrinas de cadena más corta y menos viscosas. Generalmente, este proceso incluye la gelatinización de almidón simultáneamente o después de la adición de α -amilasa.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una α -amilasa que es el producto de expresión de una secuencia de ADN mutada que codifica una α -amilasa, derivando la secuencia de ADN mutada de una α -amilasa precursora por eliminación o sustitución de uno o más residuos de asparagina. También se proporciona una molécula de ácido nucleico (ADN) que codifica una secuencia de aminoácido que comprende al menos una parte de la α -amilasa proporcionada por la presente invención, sistemas de expresión que incorporan dicho ADN que incluyen vectores y fagos, células hospedantes transformadas con dicho ADN, y cadenas antisentido de ADN correspondientes a la molécula de ADN que codifica la secuencia de aminoácido. De forma similar, la presente invención incluye un método para producir una α -amilasa mediante la expresión de ADN incorporado en un sistema de expresión que ha

sido transformado en una célula hospedante. La α -amilasa de la invención se puede usar en la licuefacción de almidón, como ingrediente de detergentes, en el procesado de comida, en el procesado de textiles o en cualquier otra aplicación en la que la actividad de α -amilasa sea útil.

5 Las α -amilasas de acuerdo con la presente invención comprenden una secuencia de aminoácidos que deriva de la secuencia de aminoácidos de una α -amilasa precursora. Las α -amilasas precursoras incluyen α -amilasas que existen de forma natural y α -amilasas recombinantes. La secuencia de aminoácidos de la α -amilasa mutante deriva de la secuencia de aminoácidos de la α -amilasa precursora mediante la sustitución, eliminación o inserción de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos precursora. Generalmente, dicha modificación es de la secuencia de ADN precursora que codifica la secuencia de aminoácidos de la α -amilasa precursora, más que de la manipulación de la enzima de α -amilasa precursora *per se*. Los métodos adecuados para dicha manipulación de la secuencia de ADN precursora incluyen métodos descritos en la presente memoria y en las Patentes de propiedad común de EE.UU. N° 4.760.025 y 5.185.258.

15 Las α -amilasas descritas en la especificación se derivan de una amilasa precursora. La α -amilasa precursora se produce mediante cualquier fuente capaz de producir α -amilasa. Las fuentes adecuadas de α -amilasas son organismos procarióticos o eucarióticos, incluyendo hongos, bacterias, plantas o animales. Preferiblemente, la α -amilasa precursora es producida por un *Bacillus*; más preferiblemente, por un *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens* o *Bacillus stearothermophilus*; aún más preferiblemente, la α -amilasa precursora deriva de *Bacillus licheniformis*.

20 Hasta la fecha se han descubierto Homologías variables entre casi todas las endo-amilasas secuenciadas hasta el momento, procedentes de plantas, animales y bacterias (Nakajima y col., Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 23, pág. 355-360 (1986); Rogers, Biochem. Biophys. Res. Commun., vol. 128, pág. 470-476 (1985); Janecek, Eur. J. Biochem., vol. 224, pág. 519-524 (1994)). Existen cuatro áreas de homología particularmente alta en determinadas amilasas de *Bacillus*, como se muestra en la Figura 5, en la que las secciones subrayadas designan áreas de alta homología. También se han usado alineamientos de secuencia para mapear la relación entre las endo-amilasas de *Bacillus* (Feng y col., J. Molec. Evol., vol. 35, pág. 351-360 (1987)). La homología relativa de secuencia entre la amilasa de *Bacillus stearothermophilus* y la de *Bacillus licheniformis* es aproximadamente del 66%, y entre las amilasas de *Bacillus licheniformis* y de *Bacillus amyloliquefaciens* es de aproximadamente el 81%, determinado por Holm y col., Protein Engineering, vol. 3, N° 3, pág. 181-191 (1990). Aunque la homología de secuencia es importante, generalmente se reconoce que la homología estructural también es importante al comparar amilasas u otras enzimas. Por ejemplo, se ha sugerido una homología estructural entre amilasas de hongos y de bacterias y, por tanto, las amilasas de hongos quedan abarcadas por la presente invención.

35 Entre otros, los residuos correspondientes a residuos de asparagina en la α -amilasa se identifican en la presente memoria para eliminación o sustitución. Por tanto, residuos específicos tales como N188 se refieren a un número de posición de aminoácido (es decir, +188) que hace referencia al número asignado en la secuencia de α -amilasa madura de *Bacillus licheniformis* ilustrada en la Figura 4. Un residuo de una α -amilasa precursora es equivalente a un residuo de α -amilasa de *Bacillus licheniformis* si es homóloga (es decir, se corresponde en posición con la estructura primaria o con la terciaria) o análoga a un residuo específico o porción de dicho residuo de la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (es decir, que tiene la misma o similar capacidad funcional para combinarse, reaccionar o interaccionar química o estructuralmente).

45 Con el fin de establecer la homología con la estructura primaria, se compara directamente la secuencia de aminoácidos de una α -amilasa precursora con la secuencia primaria de α -amilasa de *Bacillus licheniformis*, y particularmente con un conjunto de residuos que son invariantes en todas las α -amilasas de las que se conocen las secuencias (véase, por ejemplo, la Figura 7). También es posible determinar los residuos equivalentes mediante análisis de la estructura terciaria de las estructuras cristalinas presentadas para la α -amilasa pancreática porcina (Buisson y col., EMBO Journal, vol. 6, pág. 3909-3916 (1987); Qian y col., Biochemistry, vol. 33, pág. 6284-6294 (1994); Larson y col., J. Mol. Biol., vol. 235, pág. 1560-1584 (1994)); para la Taka-amilasa A de *Aspergillus oryzae* (Matsuura y col., J. Biochem. (Tokio), vol. 95, pág. 697-702 (1984)); y para una α -amilasa ácida de *A. niger* (Boel y col., Biochemistry, vol. 29, pág. 6244-6249 (1990)), siendo las dos estructuras anteriores similares, y para la α -amilasa de cebada (Vallee y col., J. Mol. Biol., vol. 236, pág. 368-371 (1994); Kadziola, J. Mol. Biol., vol. 239, pág. 104-121 (1994)). Aunque se han publicado algunos estudios preliminares (Suzuki y col., J. Biochem., vol. 108, pág. 379-381 (1990); Lee y col., Arch. Biochem. Biophys., vol. 291, pág. 255-257 (1991); Chang y col., J. Mol. Biol., vol. 229, pág. 235-238 (1993); Mizuno y col., J. Mol. Biol., vol. 234, pág. 1282-1263 (1993)), sólo existe una estructura publicada para la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* (Machius y col., J. Mol. Biol., vol. 246, pág. 545-549 (1995)). Sin embargo, varios investigadores han predicho estructuras super-secundarias comunes entre las glucanasas (MacGregor y col., Biochem. J., vol. 259, pág. 145-152 (1989)) y dentro de las α -amilasas y otras enzimas metabolizadoras de almidón (Jaspersen, J. Prot. Chem., vol. 12, pág. 791-805 (1993); MacGregor, Starke, vol. 45, pág. 232-237 (1993)); y las similitudes de secuencia entre enzimas con estructuras super-secundarias similares a las de las α -amilasas (Janecek, FEBS Letters, vol. 316, pág. 23-26 (1993); Janecek y col., J. Prot. Chem., vol. 12, pág. 509-514 (1993)). Se ha modelado una estructura para la enzima de *Bacillus stearothermophilus* sobre la de la Taka-amilasa A (Holm y col., Protein Engineering, vol. 3, pág. 181-191 (1990)). Las cuatro regiones altamente conservadas mostradas en la Figura 7 contienen muchos residuos que se cree forman parte del centro activo (Matsuura y col., J. Biochem. (Tokio), vol. 95, pág. 697-702 (1984); Buisson y col., EMBO Journal, vol. 6, pág. 3909-3916 (1987); Vihinen y col., J. Biochem., vol. 107, pág. 267-272 (1990)), incluyendo His +105; Arg +229; Asp +231; His +235; Glu +261 y Asp +328, según el sistema de numeración del *Bacillus licheniformis*.

ES 2 268 708 T3

La α -amilasa de la invención comprende una sustitución que se corresponde con N1885 o N188T de *Bacillus licheniformis*. También de forma preferible, la α -amilasa comprende además la eliminación o la sustitución de un residuo de metionina o de triptófano.

5 Las α -amilasas de acuerdo con la presente invención presentan unas características de prestaciones alteradas, que proporcionan unos resultados deseables e inesperados que son útiles en las diversas aplicaciones para las que se usan habitualmente las α -amilasas. Por ejemplo, las α -amilasas de acuerdo con la presente invención que presentan unas características de prestaciones alteradas a bajo pH, incluyendo una estabilidad térmica mejorada, una estabilidad con el pH mejorada y/o una estabilidad oxidativa mejorada, son útiles en la licuefacción del almidón a pH bajo. La estabilidad térmica mejorada será útil para aumentar la vida media de los productos que las incorporan. La estabilidad oxidativa mejorada o las prestaciones mejoradas son particularmente deseables en los productos de limpieza, y para aumentar la vida media de la α -amilasa en presencia de lejía, perborato, percarbonato o perácidos, usados en dichos productos de limpieza. Por el contrario, una estabilidad térmica reducida o una estabilidad oxidativa reducida pueden ser útiles en procesos industriales que requieran una parada rápida y eficaz de la actividad amilolítica.

15 La α -amilasa de la presente invención es especialmente útil en el procesado de almidón y particularmente en la licuefacción de almidón. Las condiciones presentes durante la licuefacción comercialmente deseable característicamente incluyen un pH bajo, una temperatura elevada y unas condiciones potencialmente oxidantes que requieren α -amilasas que presenten unas prestaciones mejoradas a pH bajo, una estabilidad térmica mejorada y una estabilidad oxidativa mejorada. Del mismo modo, las α -amilasas de acuerdo con la presente invención que son particularmente útiles en la licuefacción exhiben unas prestaciones mejoradas a pH por debajo de aproximadamente 6, preferiblemente por debajo de aproximadamente 5,5, y más preferiblemente entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 5,5. Adicionalmente, serán especialmente útiles las α -amilasas de acuerdo con la presente invención que exhiben una estabilidad térmica aumentada a temperaturas de entre 80 y 120°C, y preferiblemente de entre aproximadamente 100 y 110°C, y una estabilidad mejorada en presencia de oxidantes. Preferiblemente, la α -amilasa usada en licuefacción de acuerdo con la presente invención, además de la sustitución de la asparagina, comprende una eliminación o una sustitución en uno o más residuos correspondientes a M15, V128, H133, W138, S187, M197 y/o A209 del *Bacillus licheniformis*. La α -amilasa usada en la licuefacción de almidón de acuerdo con la presente invención comprende una sustitución correspondiente a M188S o N188T. Más preferiblemente, la amilasa comprende una sustitución correspondiente a M15T/N188S, M15L/N188S, M15T/H133Y/N188S, M15T/H133Y/N18BS/A209V, M15T/N188S/A209V, M15T/V128E/H133Y/N188S ó M15T/S187D/N188S, de *Bacillus licheniformis*.

30 Se pueden añadir otros componentes adicionales conocidos por los especialistas de la técnica que son útiles en la licuefacción, incluyendo, por ejemplo, antioxidantes, calcio, iones, sales u otras enzimas tales como endoglicosidasas, celulasas, proteasas, lipasas u otras enzimas de amilasa, dependiendo de las condiciones de reacción pretendidas. Por ejemplo, las combinaciones de las enzimas de α -amilasa de acuerdo con la presente invención con α -amilasas procedentes de otras fuentes, pueden proporcionar unos perfiles de acción únicos que presenten uso concreto en condiciones de licuefacción específicas. En concreto, se contempla que la combinación de una α -amilasa de acuerdo con la presente invención con una α -amilasa derivada de *Bacillus stearothermophilus* proporcionará una licuefacción potenciada a valores de pH por debajo de 5,5 debido a patrones de acción complementarios. Una realización preferida, en la que el proceso implica la licuefacción de almidón seco molido para la producción de etanol, comprende α -amilasa derivada de *Bacillus stearothermophilus* y α -amilasa de acuerdo con la presente invención que tiene una sustitución correspondiente a M15T/N18BS o a M15L/N1SBS de *Bacillus licheniformis*.

45 Durante la licuefacción, el almidón, especialmente las mezclas de almidón granular procedentes de un proceso de molienda en húmedo o en seco, se trata con una α -amilasa de la presente invención de acuerdo con técnicas de licuefacción conocidas. Generalmente, en la primera etapa del proceso de degradación de almidón, la mezcla de almidón se gelatiniza mediante calefacción a una temperatura relativamente elevada (entre aproximadamente 80°C y aproximadamente 110°C). Después de que la mezcla de almidón se gelatiniza, se licua usando una α -amilasa.

50 En otra realización de la presente invención, se proporcionan composiciones detergentes en forma líquida, del gel o granular, que comprenden la α -amilasa de acuerdo con la presente invención. Dichas composiciones detergentes se beneficiarán particularmente de la adición de una α -amilasa de acuerdo con la presente invención que haya aumentado la estabilidad térmica para mejorar la vida media, o que haya incrementado la estabilidad oxidativa de tal modo que la α -amilasa haya mejorado la resistencia frente a compuestos de lejía o peróxidos, comúnmente presentes en los detergentes. Por tanto, la α -amilasa de acuerdo con la presente invención puede formularse de forma ventajosa en detergentes conocidos en polvo, líquido o gel, que tengan un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 12,0. Una realización preferida de la presente invención comprende además la eliminación o la sustitución de un residuo de metionina o de un residuo de triptófano, por ejemplo M15, M197 o W138, tal como se describe en las Solicitudes de Patente asignadas en común de EE.UU. con N° de Serie 08/289.351 y 08/409.771, la sustitución en M133Y tal como se describe en la Publicación PCT N° WO 91/00353; o la sustitución en A209 tal como se describe en DeClerck, y col., J. Biol. Chem., vol. 265, pág. 15481-15488 (1990). Asimismo, una α -amilasa de acuerdo con la presente invención usada en composiciones detergentes comprende la sustitución correspondiente a N188S o a N188T de *Bacillus licheniformis*. Las composiciones detergentes que comprenden la α -amilasa de acuerdo con la presente invención pueden incluir además otras enzimas tales como las endoglicosidasas, las celulasas, las proteasas, las lipasas u otras enzimas de amilasa, particularmente α -amilasa derivada de *Bacillus stearothermophilus*, así como ingredientes adicionales conocidos de forma general en la técnica.

Las realizaciones de la presente invención que comprenden una combinación de la α -amilasa de acuerdo con la presente invención con enzimas de proteasa preferiblemente incluyen proteasas oxidativamente estables tales como las descritas en el documento de EE.UU. Re. 34.606, incorporado en la presente memoria a modo de referencia, así como enzimas comercialmente disponibles tales como DURAZYM (Novo Nordisk), MAXAPEM (Gist-brocades) y PURAFECT® OXP (Genencor Internacional, Inc.). En el documento de EE.UU. Re. 34.606 se describen los métodos para fabricar dichos mutantes de proteasa (proteasas oxidativamente estables), y particularmente los mutantes que tengan una sustitución para la metionina de la posición equivalente a M222 de *Bacillus amyloliquefaciens*.

Una realización adicional de la presente invención comprende ADN que codifica una α -amilasa de acuerdo con la presente invención y vectores de expresión que comprenden dicho ADN. Las secuencias de ADN se pueden expresar ligándolos operativamente a una secuencia de control de expresión en un vector de expresión apropiado, y empleando dicho vector de expresión para transformar un hospedante adecuado siguiendo técnicas bien conocidas. Se puede emplear una amplia variedad de combinaciones hospedante/vector de expresión para expresar las secuencias de ADN de esta invención. Los vectores de expresión útiles, por ejemplo, incluyen segmentos de secuencias de ADN sintéticas y no cromosomales, tales como los diversos plásmidos y fagos que se saben son útiles para este propósito. Adicionalmente, en estos vectores generalmente se usa cualquiera de una amplia variedad de secuencias de control de expresión. Por ejemplo, los Solicitantes han descubierto que una secuencia de control de expresión preferida para transformantes de *Bacillus* es el péptido señal *aprE* derivado de *Bacillus subtilis*.

También son útiles una amplia variedad de células hospedantes en la expresión de secuencias de ADN de esta invención. Estos hospedantes pueden incluir hospedantes eucarióticos y procarióticos bien conocidos, tales como cepas de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, diversos hongos, levaduras y células animales. Preferiblemente, el hospedante expresa la α -amilasa de la presente invención extracelularmente para facilitar la purificación y el procesado posterior. La expresión y la purificación de la α -amilasa mutante de la invención se pueden efectuar con medios reconocidos en la técnica para llevar a cabo dichos procesos.

Las α -amilasas mejoradas de acuerdo con la presente invención proporcionan varias ventajas importantes en comparación con las α -amilasas naturales de *Bacillus*. Por ejemplo, una ventaja es el aumento de actividad observado al pH bajo y a las altas temperaturas típicas de los métodos comunes de licuefacción de almidón. Otra ventaja es la mejora en la estabilidad oxidativa y a pH alto que facilita su uso en detergentes. Otra ventaja es que se logra una hidrólisis más completa de las moléculas de almidón, lo que reduce el almidón residual en la corriente de proceso. Otra ventaja más es el aumento de estabilidad en ausencia de ión calcio. Otra ventaja adicional es que la adición de dosis iguales de proteínas de α -amilasa de acuerdo con la invención proporciona unas prestaciones superiores en comparación con la α -amilasa natural de *Bacillus licheniformis* debido a mejoras tanto en la actividad específica como en la estabilidad en condiciones severas. En otras palabras, debido al aumento general de la estabilidad de las amilasas de acuerdo con la presente invención, el aumento de la actividad específica sobre almidón de las amilasas de la invención se traduce en beneficios de prestaciones potenciales incluso superiores en esta variante. En condiciones en las que la enzima natural se desactiva, no sólo sobrevive más cantidad de la amilasa de la invención debido a su estabilidad mejorada, sino que también la que sobrevive expresa proporcionalmente más actividad debido a su actividad específica mejorada.

Las siguientes descripciones se presentan a modo de ejemplo y no pretenden constituir limitación alguna al alcance de las reivindicaciones. Las abreviaciones usadas en la presente memoria, particularmente las anotaciones de tres letras o de una letra para los aminoácidos, se describen en Dale, J. W., *Molecular Genetics of Bacteria*, John Wiley & Sons, (1989) Apéndice B.

Ejemplos

Ejemplo 1

Construcción del Plásmido pHP.BL

El gen de α -amilasa mostrado en la Figura 3 fue clonado a partir de NCIB8061 de *Bacillus licheniformis* (Gray y col., *J. Bacteriology*, vol. 166, pág. 635-643 (1986)). El fragmento PstI-SstI de 1,72 kb, que codifica los últimos tres residuos de la secuencia señal, la proteína madura completa y la región de terminación, fue subclonado en M13mp18. Se añadió un terminador sintético entre las posiciones BclI y SstI usando una casete de oligonucleótidos sintéticos de la forma:

BclI	SstI
5'-GATCAAAACATAAAAAACCGGCCCTTGGCCCCGCCGGTTTTTTATTATTTTGGAGCT-3'	(SEQ ID NO:1)
3' TTTTGTATTTTTTGGCCGGAACCGGGCGGCCAAAAATAATAAAAAC	5' (SEQ ID NO:2)

designada para contener el terminador transcripcional de subtilisina de *Bacillus amyloliquefaciens* (Wells y col., *Nucleic Acid Research*, vol. 11, pág. 7911-7925 (1983)).

ES 2 268 708 T3

El plásmido pBLapr se construyó portando el gen de la α -amilasa de *Bacillus licheniformis*. Como se muestra en la Figura 7, el pBLapr comprende un plásmido de 6,1 kb que incluye el gen de resistencia a ampicilina del pBR322 y el gen de resistencia a cloranfenicol del pC194, el promotor aprE y el gen que codifica la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* ("BL AA"). El promotor aprE se construyó a partir de un fragmento HindIII-PstI de 660 pb que codifica el promotor y la secuencia señal de la proteasa alcalina de *Bacillus subtilis*. La posición PstI se eliminó, y se añadió una posición SfiI cerca del cruce *aprEI BL AA*. El gen BL AA comprende el fragmento PstI-SstI de 1720 pb descrito anteriormente. En el trabajo descrito en la presente memoria, el pBLapr se construyó con una posición SfiI adyacente al extremo 5' del inicio de la secuencia de codificación del gen de amilasa maduro. Específicamente, el extremo 5' de la construcción pBLapr fue subclonado sobre un fragmento EcoRI-SstII procedente de pBLapr en M138M20 (Boehringer Mannheim) para obtener un molde de cadena codificadora para el oligonucleótido mutagénico siguiente:

5'-CCC ATT AAG ATT GGC CGC CTG GGC CGA CAT GTT GCT GG-3'

Este primero introdujo una posición SfiI (indicada por el subrayado) que permitió la monitorización de formas correctas a través de la presencia de esta posición de restricción única. La subclonación del fragmento EcoRI-SstII de vuelta al vector pBLapr proporcionó una versión del plásmido que contenía una posición SfiI.

El plásmido pHP13 (Haima y col., Mol. Gen. Genet., vol. 209, pág. 335-342 (1987)) (Figura 6) fue digerido con enzimas de restricción EcoRI y HindIII, y el vector resultante fue purificado sobre gel de poli(acrilamida) y a continuación fue eluido. Se digirió el plásmido pBLapr con HindIII, Asp718 y en una incubación aparte con Asp718, EcoRI y purificado con gel. Se purificaron con gel dos bandas, HindIII-Asp718 (1203 pb) y Asp718-EcoRI (1253 pb), fueron eluidas del gel y ligadas al vector mediante una unión de 3 vías, para dar lugar al plásmido pHP.BL, el plásmido usado en la expresión de la α -amilasa (Figura 8).

25 Ejemplo 2

Construcción del Plásmido que Codifica α -Amilasa que Comprende Sustituciones Correspondientes a la Asparagina 188

Se sintetizó una serie de primeros mutagénicos que codifican las sustituciones correspondientes a Asn 188 ("N188") con cada uno de los aminoácidos naturales, y se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NOS: 4-22).

Etapa (1): Se usaron como moldes los primeros mutagénicos para los primeros PCR A+ y PCR B-, dando como resultado un ADN de cadena doble alargado (61 pb). Cada uno contenía un cambio de aminoácidos diferente en la posición 188, y todos excepto el N188M contenían una posición de restricción diferente. Inicialmente se maduraron los primeros PCR a 35°C durante cinco minutos, seguido de una extensión de ADN de un minuto con polimerasa taq a 75°C. A continuación el ADN de doble cadena fue fundido a 95°C durante un minuto, seguido de las etapas de maduración y extensión. Se continuó con la fusión, la maduración y la extensión por un total de 30 ciclos.

Etapa (2): El ADN por encima y por debajo de la posición 188 se fabricó en reacciones PCR separadas. El molde fue pBLapr, y los primeros PCR fueron LAAfs5 (SEQ ID NO: 27) y PCR A- (SEQ ID NO: 24) para la parte por encima; y PCR B+ (SEQ ID NO: 25) y PCR ClaI-SalI (SEQ ID NO: 28) para el ADN por debajo. Se fundió el ADN a 95°C durante un minuto, se maduró a 45°C durante tres minutos y se alargó a 68°C durante 3 minutos. La porción por encima es de 290 pb y la de por debajo es de 498 pb. Se repitió este procedimiento durante 18 ciclos usando polimerasa pfu. Se usó el mismo procedimiento PCR en las Etapas (3) y (4).

Etapa (3): La porción por encima de ADN descrita en la Etapa (2) se unió a los primeros mutagénicos de doble cadena descritos en la etapa (1). Se usaron los primeros LAAfs5 (SEQ ID NO: 27) y PCR B- (SEQ ID NO: 26). Como resultado del diseño de primeros se produce un solapamiento de 24 pb entre estos moldes, lo que permite la unión de las dos piezas de ADN.

Etapa (4): Las porciones por debajo de ADN descritas en la Etapa (2) y el producto de la Etapa (3) se unieron para formar el producto final. Un solapamiento de 24 pb entre los dos productos PCR permite la unión. Los primeros usados fueron LAAfs5 (SEQ ID NO: 27) y PCR ClaI-SalI (SEQ ID NO: 28).

Etapa (5): Existen posiciones de restricción únicas, Asp718 y BssHII, ubicadas por encima y por debajo, respectivamente, de la posición 188. El producto PCR final se digiere con Asp718 y BssHII, se aísla el fragmento de 333 pb mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) y se subclona en el vector pHP.BL para obtener pHP.N188X.

Las mutaciones fueron confirmadas mediante secuenciación didesoxi (Sanger y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol. 74, pág. 5463-5467 (1977)).

En referencia a la secuencia de ADN y al sistema de numeración usado en la Figura 3, el codón que codifica la posición de aminoácido + 188 se encuentra en los pares base 812-814. Los primeros PCR A+ y A- se corresponden con los pares base 784-807. Los primeros PCR B+ y B- se corresponden con los pares base 821-844. El extremo 5' del primero PCR LAAfs5 se corresponde con el par base 518. El extremo 5' del primero PCR denominado PCR ClaI-SalI se corresponde con el par base 1317. La posición Asp718 se corresponde con el par base 724. La posición BssHII se corresponde con el par base 1053.

ES 2 268 708 T3

Ejemplo 3

Construcción del Plásmido que Codifica Mutaciones en M15 y N188

5 Se construyó un plásmido pBLapr que tiene treonina sustituida por metionina en el aminoácido 15 de acuerdo con la Solicitud de Patente de EE.UU. con N° de Serie 08/194.664 (Publicación PCT N° WO 94/18314). Este plásmido (pBLaprM15T) fue digerido con SfiI y Asp718, y el fragmento de 477 pares base fue subclonado en pHP.BL para crear pHP.M15T. De un modo análogo al descrito anteriormente, en el Ejemplo 1, se digirió el pHP.M15T con Asp718 y BssHII, fue purificado con gel y eluido del gel. El fragmento de 333 pares base que comprendía de Asp718 a
10 BssHII y el fragmento de pHP.N188S fueron subclonados a continuación en pHP.M15T para proporcionar el plásmido pHP.M15T/N188S. De un modo análogo, se construyó el plásmido pHP.M15L/N188Y partiendo de los plásmidos pBLaprM15L y pHP.N188Y.

Ejemplo 4

Transformación de los Plásmidos en Bacillus subtilis. Expresión y Purificación de α -Amilasa Mutante

Se expresó α -amilasa en *Bacillus subtilis* tras transformación con los plásmidos descritos en los Ejemplos 1-3. El pHP13 es un plásmido capaz de replicarse en *E. coli* y en *Bacillus subtilis*. Se construyeron plásmidos que contenían diferentes variantes usando la cepa MM294 de *E. coli*, los plásmidos se aislaron y a continuación se transformaron en *Bacillus subtilis* tal como se describe en Anagnostopoulos y col., J. Bacter., vol. 81, pág. 741-746 (1961). La cepa de *Bacillus* había sido eliminada para dos proteasas (Δ apr, Δ npr) (véase, por ejemplo, Ferrari y col., Patente de EE.UU. N° 5.264.366) y para amilasa (Δ amyE) (véase, por ejemplo, Stahl y col., J. Bacter., vol. 158, pág. 411-418 (1984)). Se observó que la cepa de bacillus que expresa M15L/N188Y forma zonas más grandes de eliminación que la cepa que expresa M15L en placas de agar que contienen un 1% de almidón insoluble, lo que indica un aumento en el actividad amilolítica. Tras la transformación, se introdujo la mutación sacU(Hy) (Henner y col., J. Bacter., vol. 170, pág. 296-300 (1988)) mediante transducción mediada por PBS-1 (Hoch, J. Bact., vol. 154, pág. 1513-1515 (1983)).

30 Las amilasas segregadas fueron recuperadas de forma rutinaria de cultivos de *Bacillus subtilis* como se indica a continuación: el sobrenadante del cultivo se ajustó a 20% de sulfato de amonio saturado y se agitó durante una hora a 4°C. Tras centrifugar, el sobrenadante resultante fue ajustado al 70% de sulfato amonio saturado y se agitó durante una hora a 4°C. Tras centrifugación del sobrenadante, la partícula resultante fue redisuelta en acetato sódico 50 mM, pH 6,0, cloruro cálcico 5 mM, y fue filtrado en condiciones de esterilidad.

Ejemplo 5

Ensayo para Determinar la Actividad de α -Amilasa

40 *Ensayo de Sustrato Soluble:* se desarrolló un ensayo cinético basado en un kit de ensayo de punto final suministrado por Megazyme (Aust.) Pty. Ltd. Se disolvió un vial de sustrato (maltoheptaósido dep-nitrofenilo, BPNPG7) en 10 mL de agua esterilizada seguido de una dilución 1:4 en tampón de ensayo (tampón de maleato 50 mM, pH 6,7, cloruro cálcico 5 mM, Tween20 al 0,002%). Los ensayos se realizaron mediante la adición de 10 μ L de amilasa a 790 μ L del sustrato en una cubeta a 25°C. Se midieron las velocidades de hidrólisis como la velocidad de cambio de la absorbancia a 410 nm, tras un retraso de 75 segundos. El ensayo fue lineal hasta velocidades de 0,2 unidades de absorción/min.

La concentración de proteína de α -amilasa se midió usando el Ensayo Bio-Rad estándar (Bio-Rad Laboratorios), basado en el método de Bradford, Anal. Biochem., vol. 72, pág. 248 (1976), usando patrones de albúmina de suero bovino.

50 *Ensayo de Hidrólisis de Almidón:* se determinó la actividad de α -amilasa sobre almidón mediante un ensayo que depende de la capacidad del almidón para formar un complejo de color azul con yodo, y de la desaparición de dicho color cuando el almidón se hidroliza para dar moléculas de dextrina más cortas. La actividad de α -amilasa se definió en términos del tiempo de digestión requerido para producir un cambio de color que denote un estado definitivo de la dextrinación del almidón.

Los reactivos usados fueron los que se indican a continuación:

60 *Tampón de fosfato:* se disolvió dihidrogenofosfato potásico (340 g) e hidróxido sódico (25,3 g) en agua y se diluyó hasta dos litros. Se enfrió el tampón hasta temperatura ambiente y se ajustó el pH a $6,2 \pm 0,1$. Se diluyó el tampón hasta dos litros en un matraz volumétrico.

65 *Sustrato de almidón:* se suspendieron diez gramos (sustancia seca) de almidón lintner en 50 mL de agua y fueron lavados en 300 mL de agua hirviendo. Se llevó de nuevo la disolución a ebullición y se hirvió durante cinco minutos manteniendo una agitación constante. Se enfrió la disolución de almidón con agitación constante hasta temperatura ambiente y se añadieron 125 mL de tampón de fosfato. La disolución se diluyó hasta 500 mL con agua. El sustrato de almidón se renovó diariamente.

ES 2 268 708 T3

Disolución de yodo de reserva: Se disolvieron cristales de yodo (5,5 g) y yoduro potásico (11,0 g) en agua y se diluyeron volumétricamente hasta 250 mL. La disolución se mantuvo apartada de la luz.

5 *Disolución de yodo diluida:* se disolvió yoduro potásico (20 g) y dos mL de disolución de yodo de reserva en agua y se diluyó hasta 500 mL. La disolución se renovó a diario.

Disolución de dilución de enzima: se disolvió cloruro cálcico (1,1 g) en cuatro litros de agua. El agua utilizada para todos los reactivos era destilada o desionizada.

10 Se diluyó una muestra de α -amilasa hasta 10-15 UL/mL (tal como se definen más adelante) con disolución de dilución de enzima. Para muchas preparaciones comerciales de α -amilasa se descubrió que una relación de dilución adecuada era de 2000 a 1. Se dispensaron alícuotas de cinco mililitros de disolución de yoduro diluida en tubos de ensayo de 13 x 100 mm, y se colocaron 10 mL de sustrato de almidón en un tubo de ensayo de 23 x 200 mm. Todos los tubos fueron llevados al baño de agua a 30°C. Se usó un comparador Hellige equipado con un disco de color de α -amilasa especial (número de catálogo 620-s5) para realizar las lecturas. Se mezclaron cinco mililitros de enzima diluida (también a 30°C) con el sustrato de almidón y se comenzó con la medida del tiempo. A intervalos de tiempo apropiados, por ejemplo intervalos de un minuto al principio de la reacción y a intervalos de 15 segundos al final, se transfirieron alícuotas de un mililitro de la mezcla enzima-sustrato a un tubo que contenía la disolución de yoduro diluida. La disolución de yoduro de almidón se mezcló y se transfirió a un tubo cuadrado de precisión de 13 mm, y se comparó el color con el disco de color de α -amilasa patrón del comparador Hellige. Cuando se alcanzó el punto final, se extrajeron las muestras a intervalos de 0,25 minutos.

25 Se registró el tiempo requerido para que los colores de las muestras y el del disco de color coincidieran, y se calculó la actividad (en unidades de licuefacción por gramo o por mL) de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$UL/mL \text{ ó } UL/g = \left\{ \frac{570}{V_{xt}} \right\} \times D$$

30 donde:

UL = unidad de licuefacción.

35 V = volumen de enzima (5 mL o 5 gramos).

t = tiempo de dextrinización (minutos).

40 D = factor de dilución: volumen de dilución dividido por los mL o por los g de enzima diluida.

45 Las α -amilasas mutantes de acuerdo con la invención preparadas según los Ejemplos 1-4 fueron evaluadas para determinar su actividad específica sobre almidón y sustrato soluble. Los resultados, mostrados en la Tabla 1, muestran que la amilasa mutante de acuerdo con la invención proporciona un perfil de actividad superior con ambos sustratos, en comparación con la α -amilasa natural AA20.

TABLA 1

Actividad Específica de Determinadas α -Amilasas sobre Sustrato Soluble y Almidón en Porcentaje de Actividad Natural		
α -Amilasa	Ensayo de Sustrato Soluble	Ensayo de Hidrólisis de Almidón
Spezyme® AA20	100	100
M15T/N188S	212	166

60 Ejemplo 6

Condiciones de Licuefacción de Almidón - Determinación de ED (Equivalentes de Dextrosa) de Almidón Licuado

65 La licuefacción de almidón se llevó a cabo usando un reactor compuesto por 15,26 m de tubo de acero inoxidable de 0,6096 cm de diámetro (0,5334 cm de diámetro interno) enrollado en una bobina de aproximadamente 25,4 cm de diámetro y 13,97 cm de alto. Se equipó la bobina con un mezclador en línea estático de 29,1 cm (Cole-Palmer n°G-04669-60) montado a 1,22 m del extremo anterior. El extremo posterior de la bobina fue equipado con una válvula

ES 2 268 708 T3

de alivio de presión ajustable en línea Swagelok (n° SS-4CA-3) fijada en un presión de rotura de aproximadamente 1,37 bar. Se alimentó la mezcla de almidón a la bobina con un caudal de 70 mL/minuto con una bomba de pistón. Se mantuvo la temperatura del reactor de bobina a 105,5°C sumergiéndolo en un baño de glicero-agua. Se mantuvo la temperatura del baño usando un controlador de temperatura/calefactor de recirculación (Fisher Scientific modelo 7305).

Normalmente la licuefacción de almidón a escala de planta piloto se llevó a cabo usando un propulsor de vapor M 103-M equipado con una bobina de retraso de 2,5 litros detrás de la cámara de mezcla y con una válvula de presión trasera terminal. Se alimentó almidón al propulsor mediante una bomba Moyno y se suministró vapor mediante una línea a 10,27 bar, reducida hasta 6,16-6,84 bar. Se instalaron sondas de temperatura justo después del chorro hidrocafeactor y justo antes de la válvula de presión trasera. Se introdujo almidón al propulsor con un caudal de aproximadamente 350 mL/min. Se mantuvo la temperatura del chorro en 105-107°C. Se transfirieron muestras de almidón desde el horno del chorro hasta una segunda etapa de licuefacción a 95°C y se mantuvieron durante 90 minutos.

Se obtuvo almidón granular con un molino de maíz en húmedo y se usó en los dos días siguientes a su obtención. Se diluyó el almidón hasta un nivel de sólidos deseado de aproximadamente 30-35% en sólido seco con agua desionizada, y se ajustó el pH con NaOH al 2,5% o con HCl al 6%, según se requiriese. Se añadió calcio en forma de CaCl₂·2H₂O. Las condiciones de licuefacción típicas fueron:

Almidón	30%-35% en sólidos
Calcio	40-60 ppm (30 ppm añadidas)
pH	5,0-6,0
α-amilasa	12-14 UL/g de carbohidrato (en base seca)

Las muestras de almidón fueron transferidas desde el reactor hasta una segunda etapa de baño de licuefacción a 95°C y se mantuvieron durante 90 minutos. Se midió el grado de licuefacción de almidón inmediatamente después de la segunda etapa de licuefacción determinando el equivalente de dextrosa (ED) de la muestra de acuerdo con el método descrito en *Standard Analytical Methods of the Member Companies of the Corn Refiners Association, Inc.*, sexta edición, Analytical Procedure Committee (1980).

Ejemplo 7

Comparación de M15T/N188S y de α-Amilasa Natural en la Licuefacción a 105,5°C

Se comparó α-amilasa que comprende la sustitución M15T/N188S hecha como se indica en los Ejemplos 1-4 con α-amilasa natural derivada de *Bacillus licheniformis* (Spezyme® AA20, disponible comercialmente en Genencor Internationl, Inc.) en la licuefacción a 105,5°C. Tal como se muestra en la Tabla 2, las enzimas mutantes proporcionaron unas prestaciones significativamente mejoradas en la licuefacción en chorro de almidón, especialmente a pH bajo. La licuefacción a escala de planta piloto se llevó a cabo con una primera etapa de licuefacción a 105,5°C y una segunda etapa de licuefacción a 95°C. Se añadió amilasa a 12 UL/g de carbohidrato (base seca).

TABLA 2

Comparativa de Prestaciones de Licuefacción de α-Amilasas a 105,5°C		
Amilasa	pH	ED
Spezyme® AA20 (Media de Dos Experimentos)	6,0	9,85
G11 (Media de Cuatro Experimentos)	6,0	12,2
Spezyme® AA20	5,5	5,4
G11 (Media de Dos Experimentos)	5,5	8,7
Spezyme® AA20	5,2	1,8
G11	5,2	3,0

ES 2 268 708 T3

Ejemplo 8

Comparación de M15T/N188S y de α -Amilasa Natural en la Licuefacción a 107,0°C

5 Se comparó α -amilasa que comprende la sustitución M15T/N188S hecha como se indica en los Ejemplos 1-4 con α -amilasa natural derivada de *Bacillus licheniformis* (Spezyme® AA20, disponible comercialmente en Genencor International, Inc.) en la licuefacción a 107°C. Tal como se muestra en la Tabla 3, las enzimas mutantes proporcionaron unas prestaciones significativamente mejoradas en la licuefacción en chorro de almidón, especialmente a pH bajo, tal como demuestra el valor de ED, durante el proceso de licuefacción. La licuefacción a escala de planta piloto se llevó a cabo con una primera etapa de licuefacción a 107°C y una segunda etapa de licuefacción a 95°C. Se añadió amilasa a 12 UL/g de carbohidrato (base seca).

TABLA 3

Comparativa de Prestaciones de Licuefacción de α -Amilasas a 107°C		
Variante	pH	ED
AA20	6,0	7,4
G11	6,0	11,6
AA20	5,5	3,5
G11	5,5	6,0
AA20	5,2	0
G11	5,2	1,1

35 Ejemplo 9

Análisis Estadístico de los Resultados de Licuefacción correspondientes a α -Amilasa Mutante y Natural

40 Se investigó intensivamente las prestaciones de licuefacción relativas del Spezyme® AA20 y de la variante M15T/N188S con un diseño de experimentos estadístico. Usando el programa "X-STAT", Versión 2.0 (Copyright, Wiley Scientific and Technical Software, John Wiley & Sons, Nueva Cork, (1992)), se diseñó un experimento factorial Box-Behnken; variando la temperatura de licuefacción primaria entre 106°C y 110°C, el pH de licuefacción entre pH 5,3 y pH 6,0, y el nivel de calcio total del sustrato de almidón entre 30 ppm y 90 ppm. Los datos de las Tablas 4 y 5, que forman la base de este experimento, se generaron con 15 licuefacciones de escala planta piloto, usando 12 UL/gramo de sustrato sólido seco de Spezyme® AA20 y M15T/N188S. A continuación los datos se ajustaron a modelos cuadráticos. Para la variante M15T/N188S, los datos se ajustaron a la ecuación $ED = 842,41 + 28,374 \times \text{pH} - 17,557 \times \text{Temperatura} + 1,5005 \times \text{Concentración de Calcio} + 1,6243 (\text{pH} \times \text{Temperatura}) - 0,081506 (\text{pH} \times \text{Concentración de Calcio}) - 0,0092099 (\text{Temperatura} \times \text{Concentración de Calcio}) - 16,841 (\text{pH})^2 + 0,038379 (\text{Temperatura})^2 - 0,000124 (\text{Concentración de Calcio})^2$, con un error estándar sobre la regresión de 1,313 y con una variación explicada sobre la media (R^2) de 93,99%. Para el Spezyme® AA20, los datos se ajustaron a la ecuación $ED = -652,0 + (132,35 \times \text{pH}) - (4,716 \times \text{Temperatura}) + (1,3989 \times \text{Concentración de Calcio}) - 0,050515 (\text{pH} \times \text{Temperatura}) - 0,019603 (\text{pH} \times \text{Concentración de Calcio}) - 0,011118 (\text{Temperatura} \times \text{Concentración de Calcio}) - 10,206 (\text{pH})^2 + 0,02104 (\text{Temperatura})^2 - 0,000522 (\text{Concentración de Calcio})^2$. Con un error estándar sobre la regresión de 0,5772 y con una variación explicada sobre la media (R^2) de 98,69%, estas ecuaciones se usaron para preparar figuras de ED frente al pH, frente a la Concentración de Calcio y frente a la Temperatura. Las representaciones bidimensionales de los datos a 107°C y a 60 ppm de Ca⁺ se presentan en las Figura 10-12, respectivamente. Como se muestra en las Figuras 10-12, la amilasa mutante supera a la amilasa natural permitiendo una licuefacción más eficaz del almidón a pH bajo, bajos niveles de calcio y alta temperatura.

ES 2 268 708 T3

TABLA 4

	pH	Temperatura (°C)	Calcio (ppm)	Equivalentes de Dextrosa Observados (M15T/N188S)
5	6,00	110,2	60,0	9,8
	6,00	105,9	60,0	11,7
10	5,30	110,2	60,0	2,1
	5,30	106,5	60,0	8,1
	6,00	108,0	90,0	11,3
15	6,00	107,6	30,0	10,3
	5,30	108,4	90,0	5,9
	5,30	108,5	30,0	1,7
20	5,65	110,2	90,0	9,5
	5,65	109,8	30,0	9,9
25	5,65	106,0	90,0	11,9
	5,65	105,5	30,0	9,9
	5,65	107,8	60,0	9,5
30	5,65	108,1	60,0	9,6
	6,00	108,3	60,0	11,6

35

TABLA 5

	pH	Temperatura (°C)	Calcio (ppm)	Equivalentes de Dextrosa Observados (Spezyme® AA20)
40	6,00	110,0	60	7,4
	6,00	106,2	60	9,9
	5,30	109,7	60	0,6
45	5,30	105,8	60	2,9
	6,00	108,3	90	8,5
50	6,00	108,4	30	7,8
	5,30	108,6	90	1,2
	5,30	107,5	30	0,4
55	5,65	110,0	90	4,1
	5,65	109,5	30	4,0
	5,65	106,8	90	8,6
60	5,65	106,0	30	6,4
	5,65	107,8	60	6,1
65	5,65	109,0	60	5,9
	5,65	109,0	60	5,9

ES 2 268 708 T3

Aunque la invención se ha descrito en términos de diversas realizaciones preferidas, el especialista en la técnica apreciará que se pueden realizar diversas modificaciones, sustituciones, omisiones y cambios sin alejarse del espíritu y del alcance la misma. Del mismo modo, se pretende que el alcance de la presente invención esté limitado únicamente por el alcance de las reivindicaciones mostradas más adelante, incluyendo aspectos equivalentes de las mismas.

5

Ejemplo 10

Preparación y Evaluación de la Estabilidad Térmica de Alfa-Amilasas Mutantes Adicionales

10

Se prepararon alfa-amilasas mutantes que presentaban sustituciones en una o más posiciones V128E, H133Y, S187D y/o A209V, generalmente de acuerdo con los procedimientos proporcionados en los Ejemplos 1-4, excepto que se proporcionaron los primeros PCR apropiados para efectuar las mutaciones deseadas. Se purificaron las amilasas hasta un punto en el que la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* natural mostró una actividad específica de 1087 UL/mg de proteína. La concentración de proteína se determinó mediante absorción a 278 nm, usando un coeficiente de Extinción Molar de enzima natural de $143.255 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

15

Se midieron las velocidades de desactivación térmica correspondientes a los diversos mutantes de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se sometió a diálisis disoluciones de reserva de amilasa de forma intensiva en acetato de amonio 20 mM, CaCl_2 4 mM, pH 6,5. Para medir la estabilidad, esta reserva se diluyó en >50 veces en acetato de amonio 50 mM, CaCl_2 5 mM, Tween 20 al 0,02%, pH 5,0, hasta una concentración final de entre 30 y 50 $\mu\text{g/mL}$. Se colocaron seis alícuotas de 100 μL en tubos eppendorf y se llevaron a un baño de agua a 83°C. Los tubos eppendorf se retiraron a intervalos de tiempo medidos regulares de entre 30 segundos y 5 minutos, y se colocaron en hielo para detener la desactivación. Se determinó la actividad residual usando un sustrato soluble tal como se describe en el Ejemplo 5. Se representó el logaritmo natural de la actividad frente al tiempo de incubación, y se obtuvo la constante cinética de la desactivación a partir de la pendiente de la línea recta. En la Tabla 6 se proporcionan los resultados correspondientes a varios mutantes.

25

30

TABLA 6

Amilasa	Constante de Desactivación, k (min^{-1})	Vida Media ($\ln 2/k$) (min)	Mejora sobre la variante natural
Natural	1,2	0,56	1,0
M15T/N188S	0,81	0,86	1,5
M15L/N188S	0,76	0,91	1,6
M15T/H133Y	0,39	1,8	3,2
M15T/H133Y/N188S	0,31	2,2	4,0
M15T/N188S/A209V	0,27	2,5	4,5
M15T/H133Y/N188S/A209V	0,054	13	23

50

Ejemplo 11

Prestaciones de Licuefacción a pH Bajo de α -Amilasas Variantes

55

Se prepararon α -amilasas que comprenden las sustituciones M15T/N188S ó M15T/H133Y/N188S como se indica en los Ejemplos 1-4 y 10, y se compararon en estudios de licuefacción como en el Ejemplo 6. La licuefacción se llevó a cabo a 105,5°C con una etapa secundaria de 90 minutos a 95°C en condiciones que incluyen 94 ppm de SO_2 con amilasa en una concentración de 16 UL/g de carbohidrato (en base seca). Los resultados se presentan en la Tabla 7, mostrada a continuación.

60

65

ES 2 268 708 T3

TABLA 7

	Amilasa	pH	ED
5	M15T/N188S	5,50	11,6
	M15T/H133Y/N188S	5,50	13,9
10	M15T/N188S	5,35	7,8
	M15T/H133Y/N188S	5,35	10,0
15	M15T/N188S	5,20	3,2
	M15T/H133Y/N188S	5,20	5,0

20 Ejemplo 12

Prestaciones de Licuefacción a pH Bajo de M15T/H133Y/N188S, M15T/H133Y/N188S y M15T/N188S a Niveles de Calcio Variables

25 Se prepararon α -amilasas que comprenden diversas sustituciones como se indica en los Ejemplos 1-4 y 10, y se compararon en estudios de licuefacción como en el Ejemplo 6. La licuefacción se llevó a cabo a 105,5°C en condiciones que incluyen un pH de 5,50, 95 ppm de SO₂ con amilasa en una concentración de 12 UL/g de carbohidrato (en base seca). Los resultados se presentan en la Tabla 8, mostrada a continuación.

30

TABLA 8

	Amilasa	Calcio Añadido	ED
35	M15T/V128E/H133Y/N188S	44	11,8
	M15T/H133Y/N188S	44	12,4
40	M15T/N188S	44	9,9
	M15T/V128E/H133Y/N188S	0	8,9
	M15T/H133Y/N188S	0	7,6
45	M15T/N188S	0	4,9

50 Ejemplo 13

Prestaciones de Licuefacción a pH Bajo de M15T/H133Y y M15T/H133Y/A209V a Niveles de pH Variables

55 Se prepararon α -amilasas que comprenden diversas sustituciones como se indica en los Ejemplos 1-4 y 10, y se compararon en estudios de licuefacción como en el Ejemplo 6. La licuefacción se llevó a cabo a 105,5°C en condiciones que incluyen 98 ppm de SO₂ con amilasa en una concentración de 19 UL/g de carbohidrato (en base seca). Se mezcló almidón de maíz secado (almidón de maíz Clinton Brand 106-B Pearl, ADM Corn Processing, Clinton, Iowa) con agua desionizada (aproximadamente 23 Kg en aproximadamente 50 litros), y se dejó hidratar durante 16 horas. Los resultados se presentan en la Tabla 9, mostrada a continuación.

60

65

ES 2 268 708 T3

TABLA 9

	Amilasa	pH	ED
5	M15T/H133Y/N188S	5,00	6,8
	M15T/H133Y/N188S/A209V	5,00	10,0
10	M15T/H133Y/N188S	5,25	11,6
	M15T/H133Y/N188S/A209V	5,25	13,2
	M15T/H133Y/N188S	5,50	14,3
15	M15T/H133Y/N188S/A209V	5,50	15,9

Ejemplo 14

Prestaciones Mejoradas de Licuefacción de la α -Amilasa Variante en Comparación con la Natural

Se prepararon α -amilasas que comprenden la sustitución en M15T/S187D/ N188S como se indica en los Ejemplos 1-4 y 10, y se compararon en estudios de licuefacción como en el Ejemplo 6. Se mezcló almidón de maíz secado (almidón de maíz Clinton Brand 106-B Pearl, ADM Corn Processing, Clinton, Iowa) con agua desionizada (aproximadamente 23 Kg en aproximadamente 50 litros), y se dejó hidratar durante 16 horas. La licuefacción se llevó a cabo a 105,6°C con niveles iguales de proteína de amilasa a 9,0 μ g de amilasa/g de carbohidrato (en base seca) (3,1 mg de amilasa/litro de mezcla de almidón al 35% en sólidos). Debido al beneficio en la actividad específica derivado de la alfa amilasa mutante, la actividad de las amilasas fue de 11 UL/g de carbohidrato (en base seca) para la amilasa natural y de 24 UL/g de carbohidrato para la mutante. Las actividades medidas demostraron que la amilasa mutante presentaba un aumento en la actividad del 410% sobre heptamaltosa respecto a la natural, y del 219% sobre almidón respecto a la natural. Los resultados se presentan en la Tabla 10, mostrada a continuación.

TABLA 10

	Amilasa	pH	ED
	Natural	6,00	8,9
	M15T/S187D/N188S	6,00	11,2

ES 2 268 708 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una α -amilasa que es el producto de expresión de una secuencia de ADN mutada que codifica α -amilasa, derivando la secuencia de ADN mutada de una α -amilasa de *Bacillus licheniformis* que presenta una eliminación o una sustitución de al menos uno o más residuos de asparagina, en la que dicha α -amilasa comprende una sustitución N188T ó N188S.
2. La α -amilasa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha α -amilasa comprende una sustitución N188T.
- 10 3. La α -amilasa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha α -amilasa comprende una sustitución N188S.
4. La α -amilasa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha α -amilasa comprende además la eliminación o la sustitución de un residuo de metionina o de triptófano.
- 15 5. La α -amilasa de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicha eliminación o sustitución de dicho residuo de metionina o de triptófano comprende una sustitución o una eliminación de M15, W138 ó M197.
- 20 6. La α -amilasa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha α -amilasa comprende además la eliminación o la sustitución de V128, H133, S187 ó A209.
- 25 7. Una α -amilasa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha α -amilasa comprende una sustitución M15T/N188S, M15L/N188S, M15T/H133Y/N188S, M15T/H133Y/N188S/A209V, M15T/N188S/A209V, M15T/V128E/H133Y/N188S, o M15T/S187D/N188S.
8. La α -amilasa de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dicha sustitución de dichos residuos de metionina o de triptófano comprende una sustitución M15T, W138Y o M197T.
9. Un ADN que codifica la α -amilasa de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2, 5, 6 ó 7.
- 30 10. Un vector de expresión que comprende el ADN de la reivindicación 9.
11. Una célula hospedante transformada con el vector de expresión de la reivindicación 10.
- 35 12. Una α -amilasa de acuerdo con las reivindicaciones 1, 6 ó 7, que presenta unas prestaciones mejoradas a bajo pH.
13. Una composición detergente que comprende la α -amilasa de acuerdo con las reivindicaciones 1, 6 ó 7.
- 40 14. La composición detergente de acuerdo con la reivindicación 13, en la que dicho detergente es útil para la limpieza de telas sucias, o para lavar platos sucios.
- 45 15. Un método para producir una α -amilasa mutada a partir de una α -amilasa precursora, en el que dicha α -amilasa mutada comprende una sustitución correspondiente a N188S o a N188T de *Bacillus Licheniformis*, que comprende las etapas de:
 - a. Seleccionar una secuencia de ADN de la α -amilasa precursora;
 - 50 b. Mutar la secuencia de ADN de la α -amilasa precursora de tal modo que codifique una α -amilasa que comprenda una sustitución correspondiente a N188S o a N188T de *Bacillus Licheniformis*;
 - c. Insertar la secuencia de ADN de la α -amilasa mutada en un vector de expresión;
 - d. Transformar una célula hospedante con el vector de expresión; y
 - 55 e. Expresar la α -amilasa mutada.

60

65

FIGURA 1

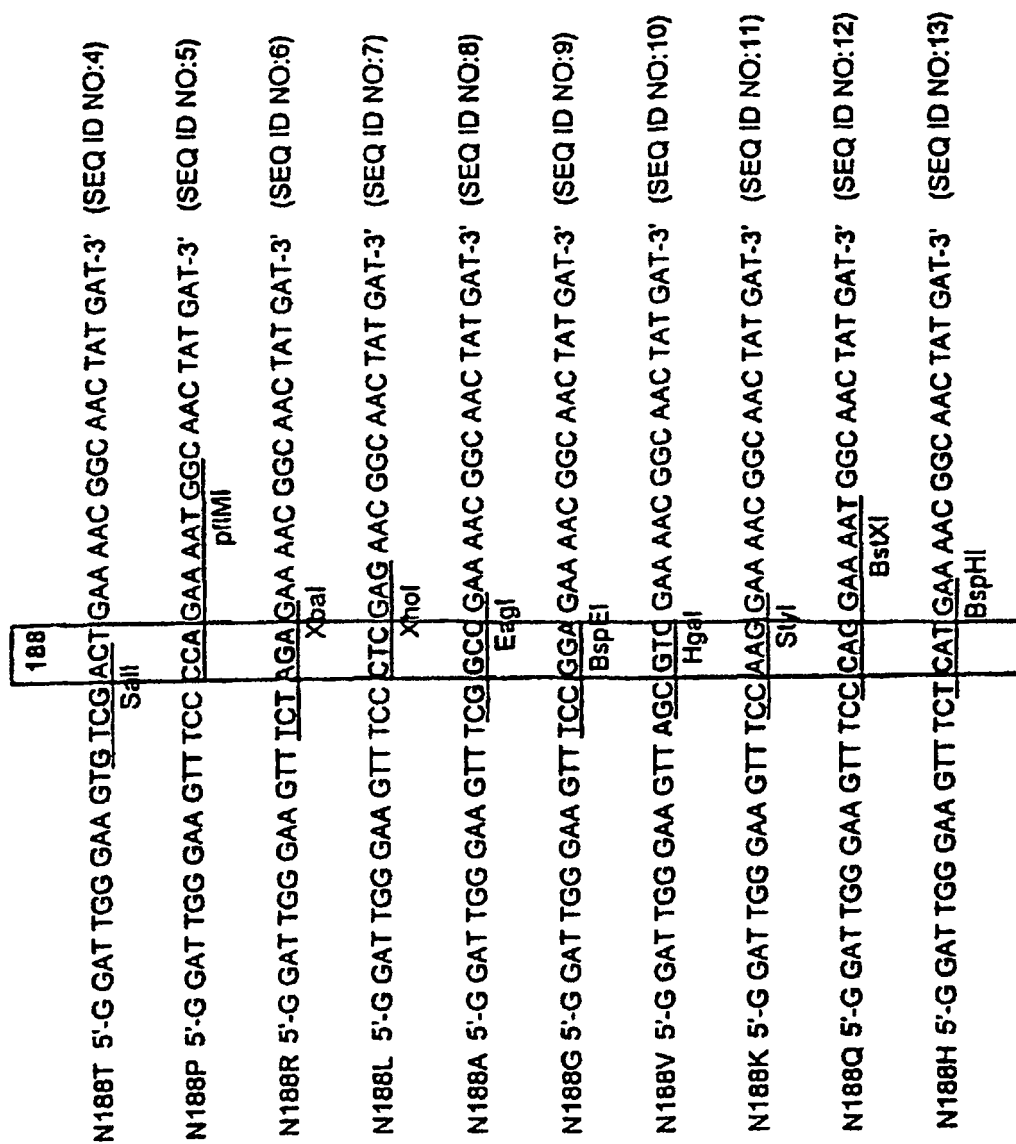


FIGURA 1 (cont.)

188	N188E 5'-G GAT TGG GAA GTT TCC GAA GAG AAC GGC AAC TAT GAT-3' (SEQ ID NO:14)	EarI
	N188D 5'-G GAT TGG GAA GTT TCC GAG GAG AAC GGC AAC TAT GAT-3' (SEQ ID NO:15)	BseRI
	N188Y 5'-G GAT TGG GAA GTT TCA TAT GAA AAC GGC AAC TAT GAT-3' (SEQ ID NO:16)	NdeI
	N188C 5'-G GAT TGG GAA GTC TCC TGC GAA AAC GGC AAC TAT GAT-3' (SEQ ID NO:17)	BsmAI
	N188F 5'-G GAT TGG GAA GTT TCC TTC GAA AAC GGC AAC TAT GAT-3' (SEQ ID NO:18)	BstBI
	N188I 5'-G GAT TGG GAA GTT TCG ATC GAA AAC GGC AAC TAT GAT-3' (SEQ ID NO:19)	PvuI
	N188M 5'-G GAT TGG GAA GTT TCC ATG GAA AAC GGC AAC TAT GAT-3' (SEQ ID NO:20)	
	N188W 5'-G GAT TGG GAA GTT TCC TGG GAA AAC GGC AAC TAT GAT-3' (SEQ ID NO:21)	BstNI
	N188S 5'-G GAT TGG GAA GTG AGC TCT GAA AAC GGC AAC TAT GAT-3' (SEQ ID NO:22)	SplI

FIGURA 2

PCR A+	¹⁷⁹ 5'-AGG AAA GGC TTG GGA TTG GGA AGT-3'	(SEQ ID NO:23)
PCR A-	5'-ACT TCC CAA TCC CAA GCC TTT CCT-3' ¹⁷⁹	(SEQ ID NO:24)
PCR B+	¹⁹¹ 5'-GGC AAC TAT GAT TAT TTG ATG TAT-3'	(SEQ ID NO:25)
PCR B-	5'-ATA CAT CAA ATA ATC ATA GTT GCC-3' ¹⁹¹	(SEQ ID NO:26)
PCR LAAfs5	⁹⁰ 5'-CTT CAT TCC CGC GAC ATT AAC-3'	(SEQ ID NO:27)
PCR ClaI-SalI	³⁵⁶ 5'-GA TTC CCT TGT GAG AAT AAA AG-3'	(SEQ ID NO:28)
PCR I+	²⁴⁶ 5'-AAT CAT GTC AGG GAA AAA <u>ACT GGG-3'</u> BsrI	(SEQ ID NO:29)
PCR I-	5'- <u>CCC AGI TTT TTC CCT GAC ATG ATT-3'</u> BsrI ²⁴⁶	(SEQ ID NO:30)
PCR J+	²⁵⁷ 5'-TTT ACG GTA GCT GAA TAT TGG CAG-3'	(SEQ ID NO:31)
PCR J-	5'-CTG CCA ATA TTC AGC TAC CGT AAA-3' ²⁵⁷	(SEQ ID NO:32)

FIGURA 3

10 30 50
 ACCTTGAAGAAGTGAAGAAGCAGAGAGCGCTATTGAATAAATGAGTAGAAAAGCGCCATATC
 70 90 110
 GCGCGTTTTCTTTTGGAAAGAAAATATAGCGAAAATCGTACTTCTTAAAAAATTCGGATAT
 130 150 170
 TTATACAACATCATATGTTTCACATTGAAAGCGGAGGAGATCATCAAACAACAAAACG
 M K Q Q K R
 190 210 230
 GCTTTACGCCCGATTGCTGACCGTGTIATTTGCGCTCATCTTCTTGCTGCCTCATTCTGC
 L Y A R L L T L L P A L I F L L P H S A
 250 270 290
 AGCAGCGGCGGCAAAJCTTAATGGGACCGCTGATCCAGTATTTTGAATGGTACATGCCCAA
 A A A A N L N G T L M Q Y F E W Y M P N
 310 330 350
 TGACGGCCAAACATTGGAAGCGTTTGCAAAACGACTCGGCATATTTGGCTGAACACGGTAT
 D G Q H W K R L Q N D S A Y L A E H G I
 370 390 410
 TACTGCCGTCTGGATTCCCCCGGCATATAACCGAACCGCAAGCCGATGTGGCGCTACCG
 T A V W I P P A Y K G T S Q A D V G Y G
 430 450 470
 TGCTTACGACCTTATGATTAGGGGAGTTTCATCAAAAAGGGACCGTTCCGACAAAGTA
 A Y D L Y D L G E F H Q K G T V R T K Y
 490 510 530
 CGGCACAAAAGGAGAGCTGCAATCTGCGATCAAAAAGTCTTCATTCCCGCGACATTAACGT
 G T K G E L Q S A I R S L H S R D I N V
 550 570 590
 TTACGGGGATCTGGTCATCAACCACAAAGCGCGCGCTGATGCGACCGAAGATGTAACCGC
 Y C D V V I N H K G G A D A T E D V T A
 610 630 650
 GGTGAAGTGGATCCCGCTGACCGCAAACCGGTAATTTTCAGGAGAACACCTAATTAAGC
 V E V D P A D R N R V I S G E H L I K A
 670 690 710
 CTGGACACATTTTCATTTTCCCGGGCGCGGCAGCACATACAGCGATTTTAAATGGCATTG
 W T H F H F P G R G S T Y S D F K W H W
 730 750 770
 GTACCATTTTCACCGCAACCGATTGGGACGAGTCCCGAAAGCTGAACCGCATCTATAAGTT
 Y H P D C T D W D E S R X L N R I Y K F
 790 810 830
 TCAAGCAAGCGCTTGGGATTGGGAAGTTTCCAAATGAAAACCGCAACTATGATTATTTGAT
 Q C K A W D W E V S N E N G N Y D Y L M

FIGURA 3 (cont.)

1750 1770 1790
TTTTATTTTCCCCGCTTATAAAATTTCTTTGATTACATTTATAATTAATTTTAACAAA
1810 1830 1850
CTGTCATCAGCCCTCAGGAAGGACTTGCTGCAGTTTGAATCCCATAGCTAAGCCCGGCA
1870 1890 1910
TGAAATGCCAACGTTATCTGATGTAGCAAAGCAAACCAATCTGTGAAAATGACCGTATC
1930 1950
GCGCGTGAATCAATCATCCTGAGACTGTGACCGATGAATTCAAAAAGCT

FIGURA 4

10 30 50
ANLNGTLMQYFEWYMPNDGQHWKRLQND SAYLAEHGITAVWIPPAYKGT SQADVGYGAYD

70 90 110
LYDLGEFHQKGTVRTKYGTRGELQSAIKSLESRDINVYGDVVINRKG GADATEDVTAVEV

130 150 170
DPADRRNRVISGEH LIKAWTHFHFPGRGSTYSDFKWHWYHFDGTDWDESRLNRIYKFOGK

190 210 230
AWDWEVSNENGN YDYIMYADIDYDHPDVA AEIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSF

250 270 290
LRDWVNHVREKTGKEMFTVAEYWQNDLGALENYLNKTNFNH SVFDVPLHYQFHAASTQGG

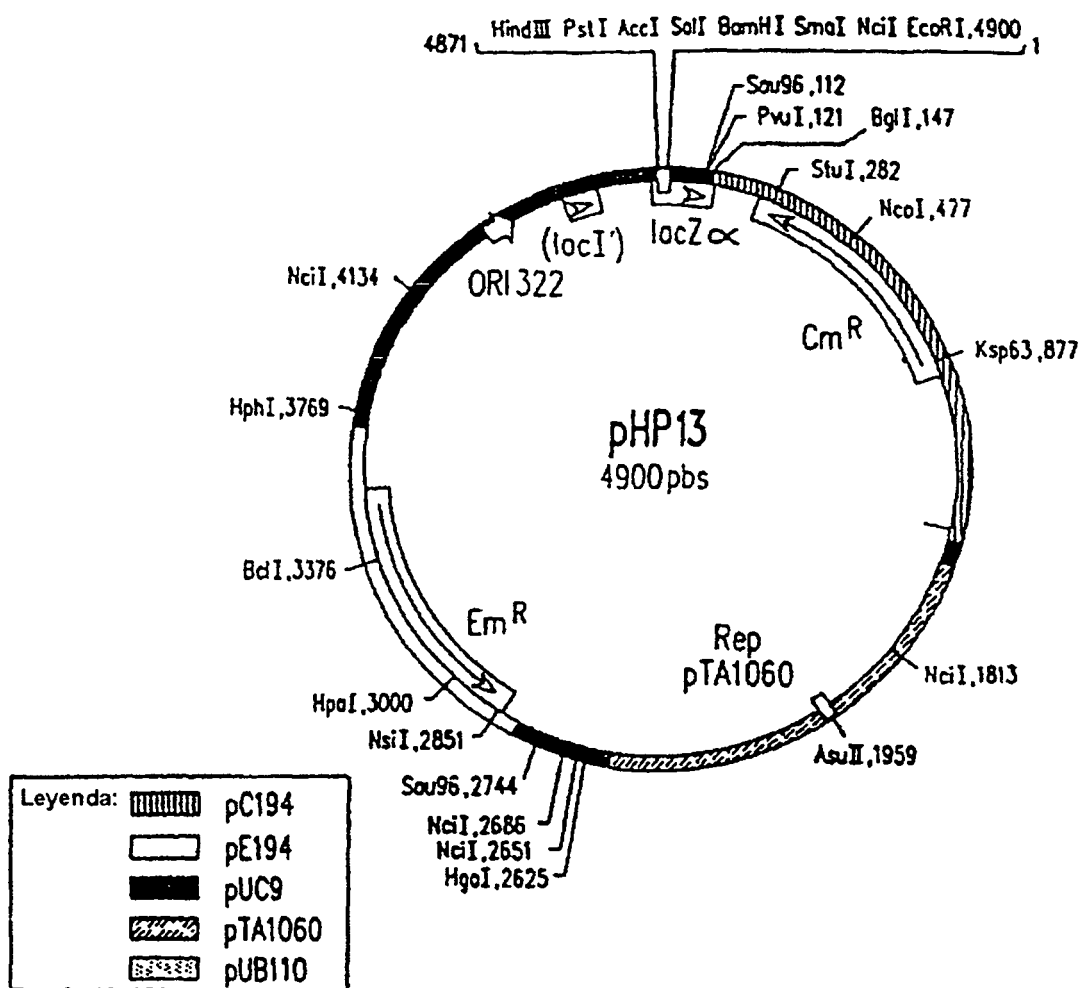
310 330 350
GYDMFKLLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTQPGQSLESTVQTFKPLAYAFILTRESGYPO

370 390 410
VFYGD MYGTKGDSORE IPALKHKIEPILKARKQYAYGAQH DYFDHHDIVGWTREGDSSVA

430 450 470
NSGLAALI TDGPGGAKRMYVGRQNA GETWHDITGNRSEPVVINSEGWGEFHVNGGSVSIY

VQR

FIGURA 6



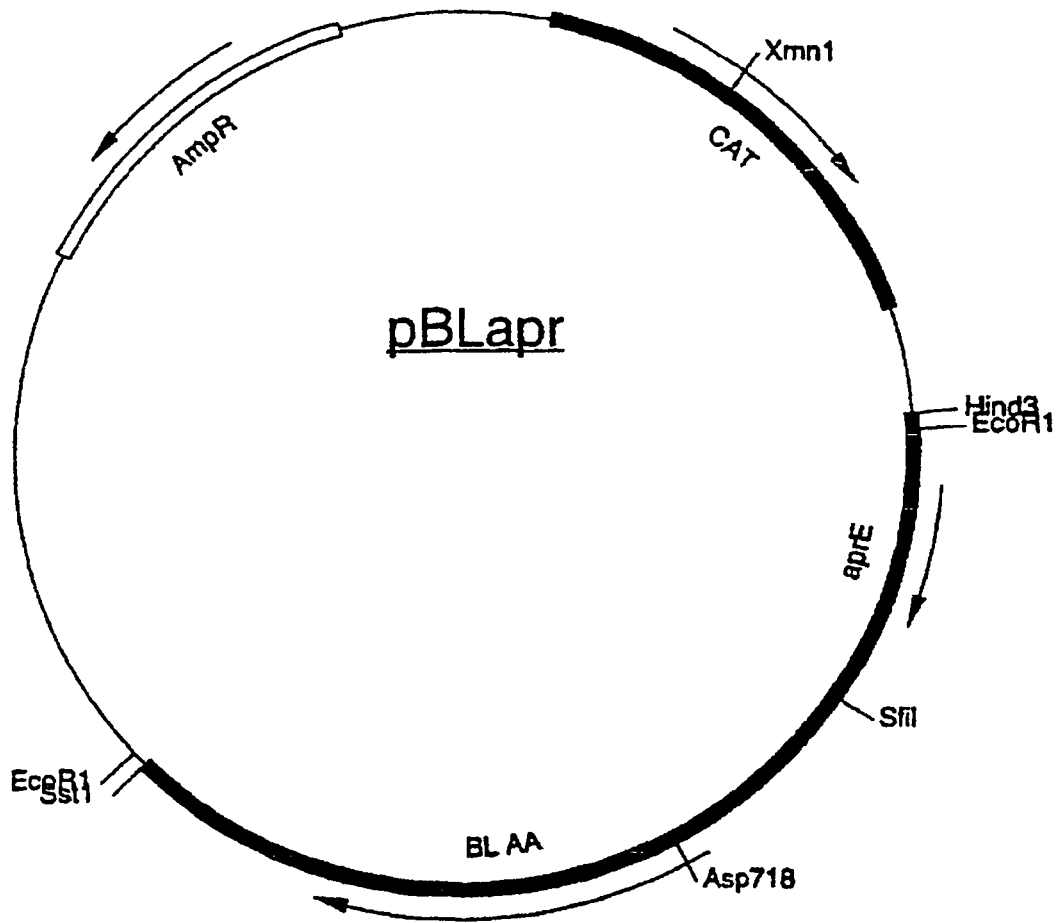
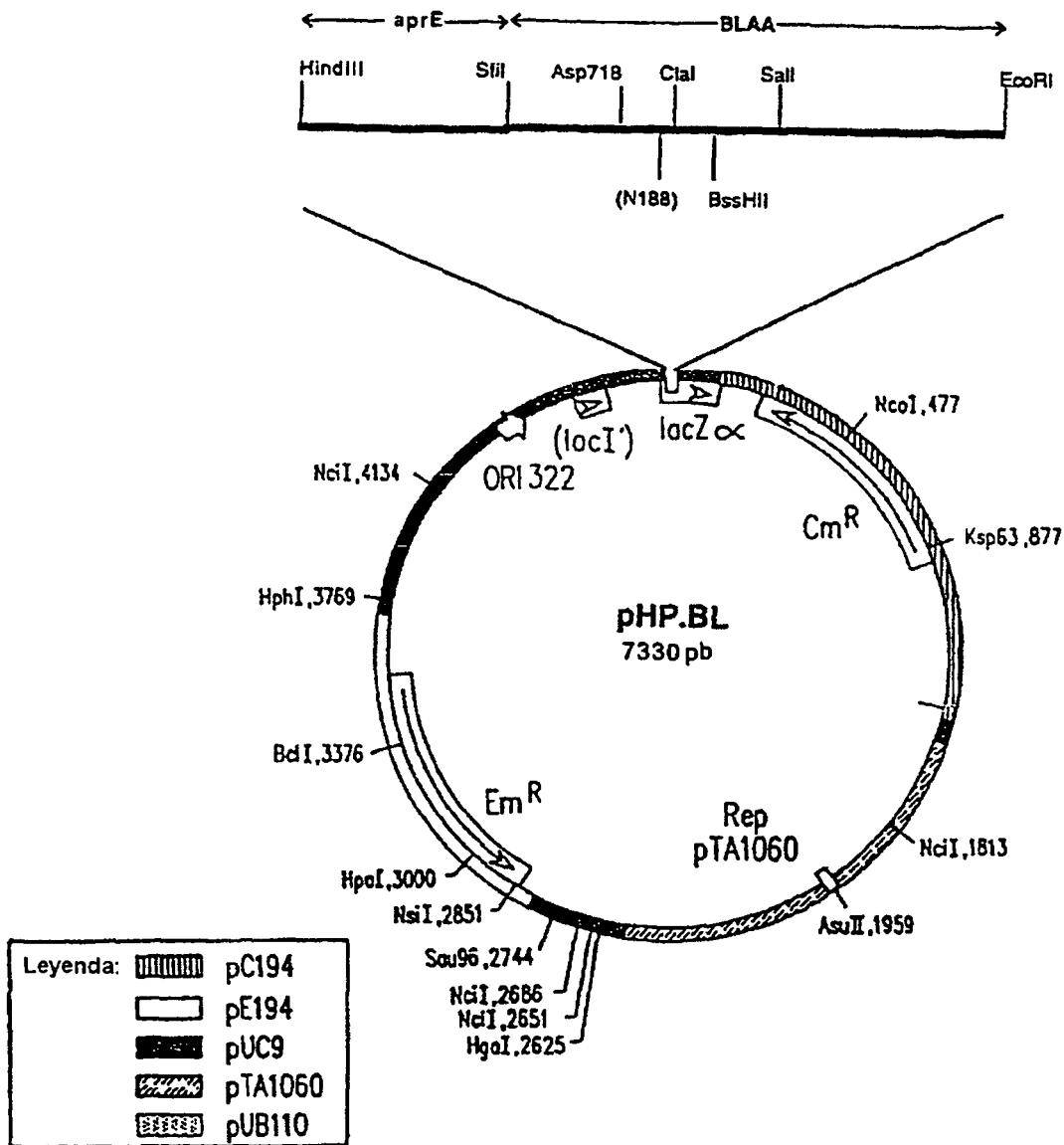


FIGURA 7

FIGURA 8



pHP.BL = pHP13 con el injerto HindIII-EcoRI de 3460 pb de pBLapr

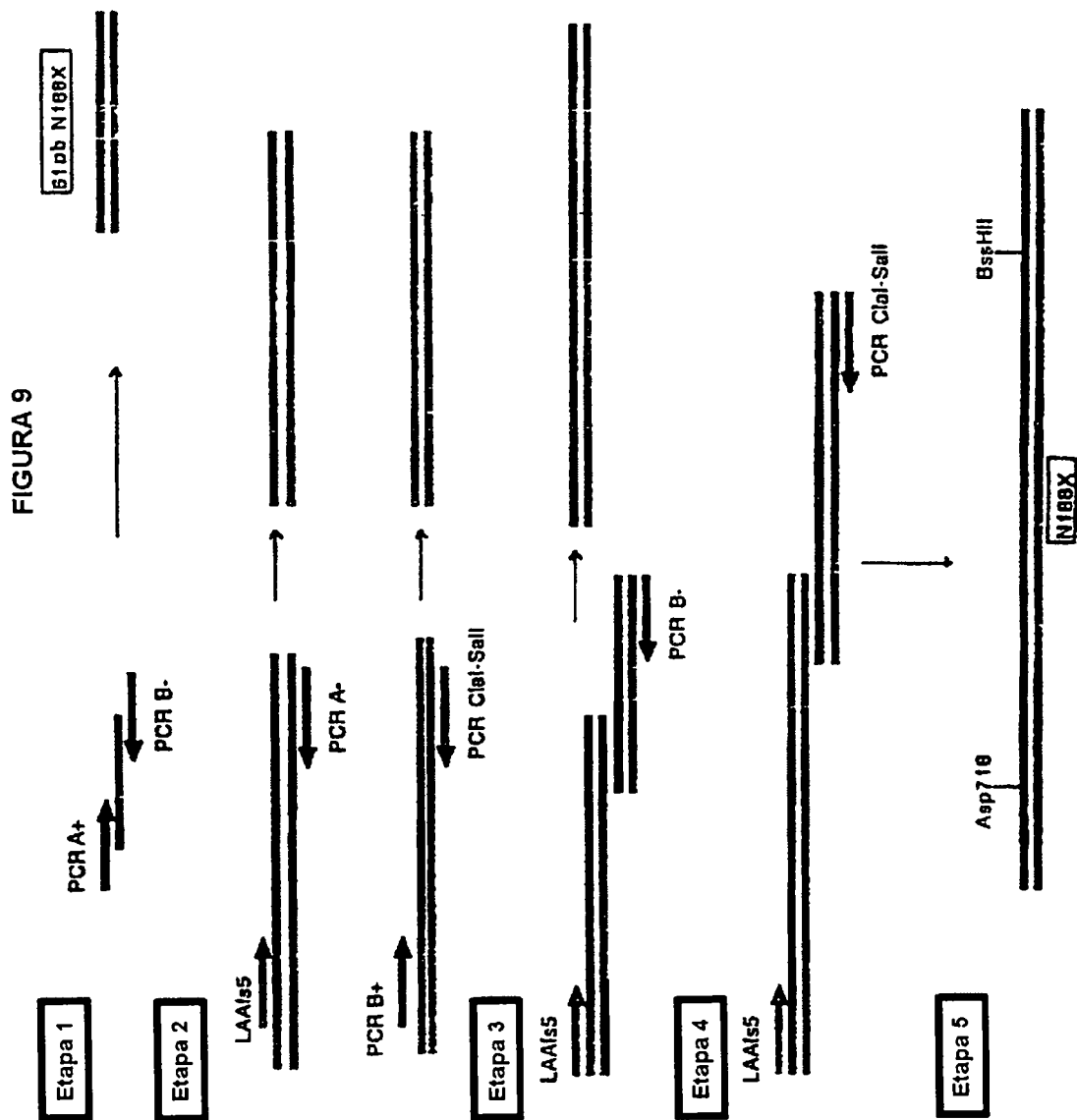


FIGURA 10

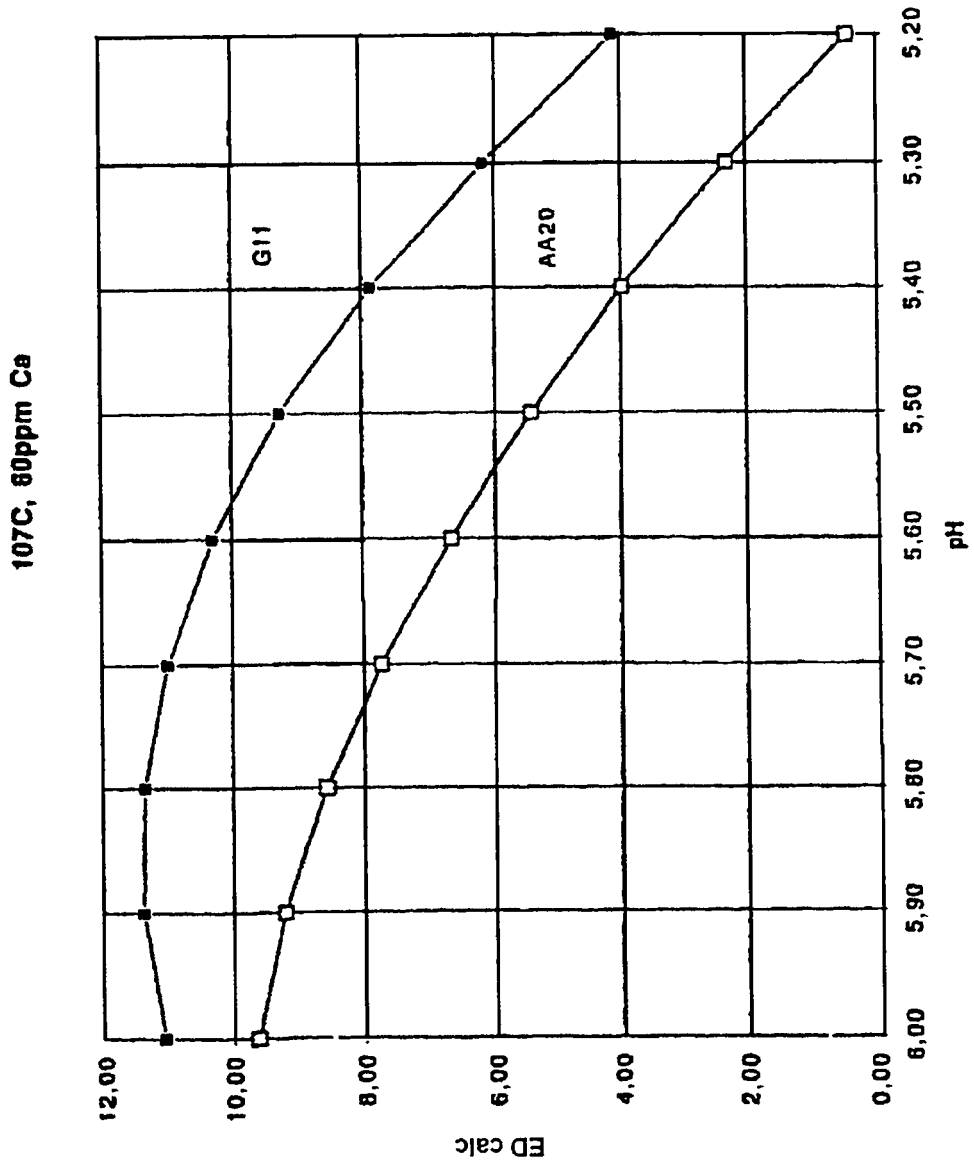


FIGURA 11

107C, pH6.0

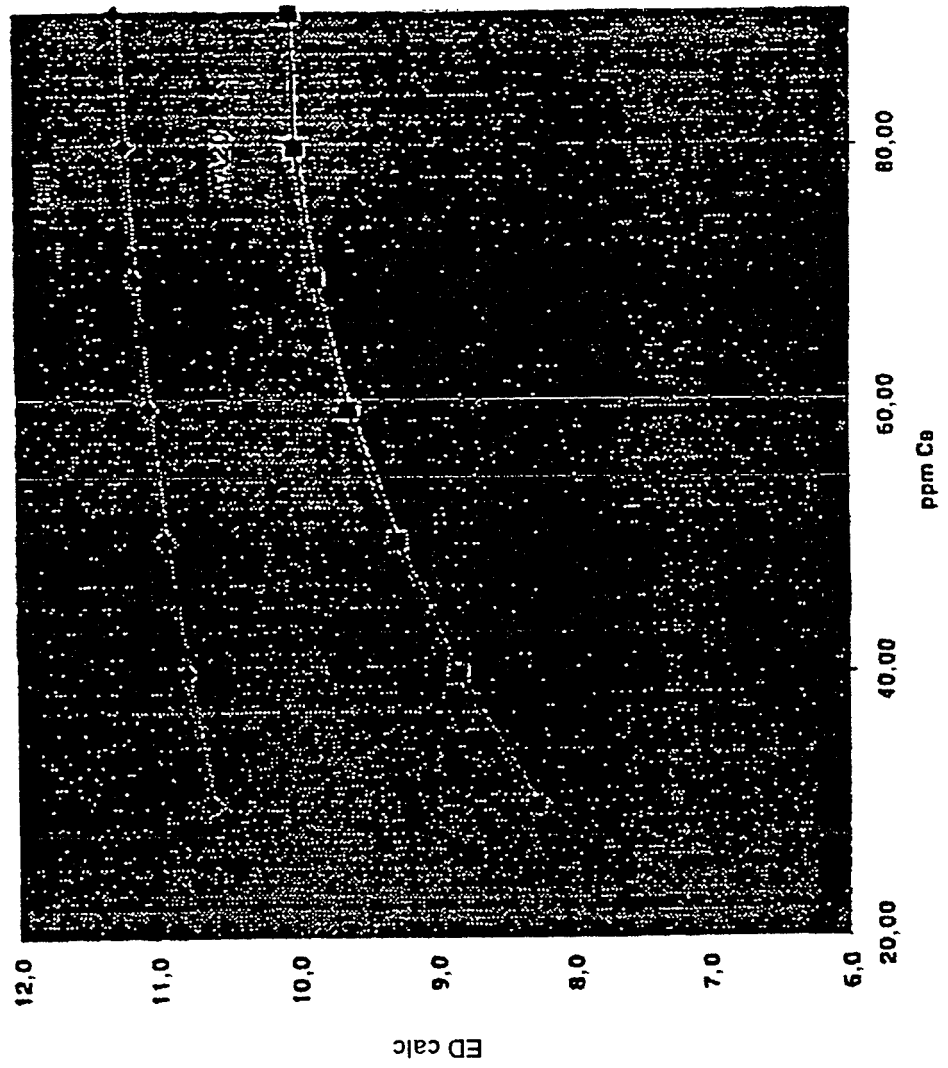


FIGURA 12

pH 6,0, 60 ppm Ca

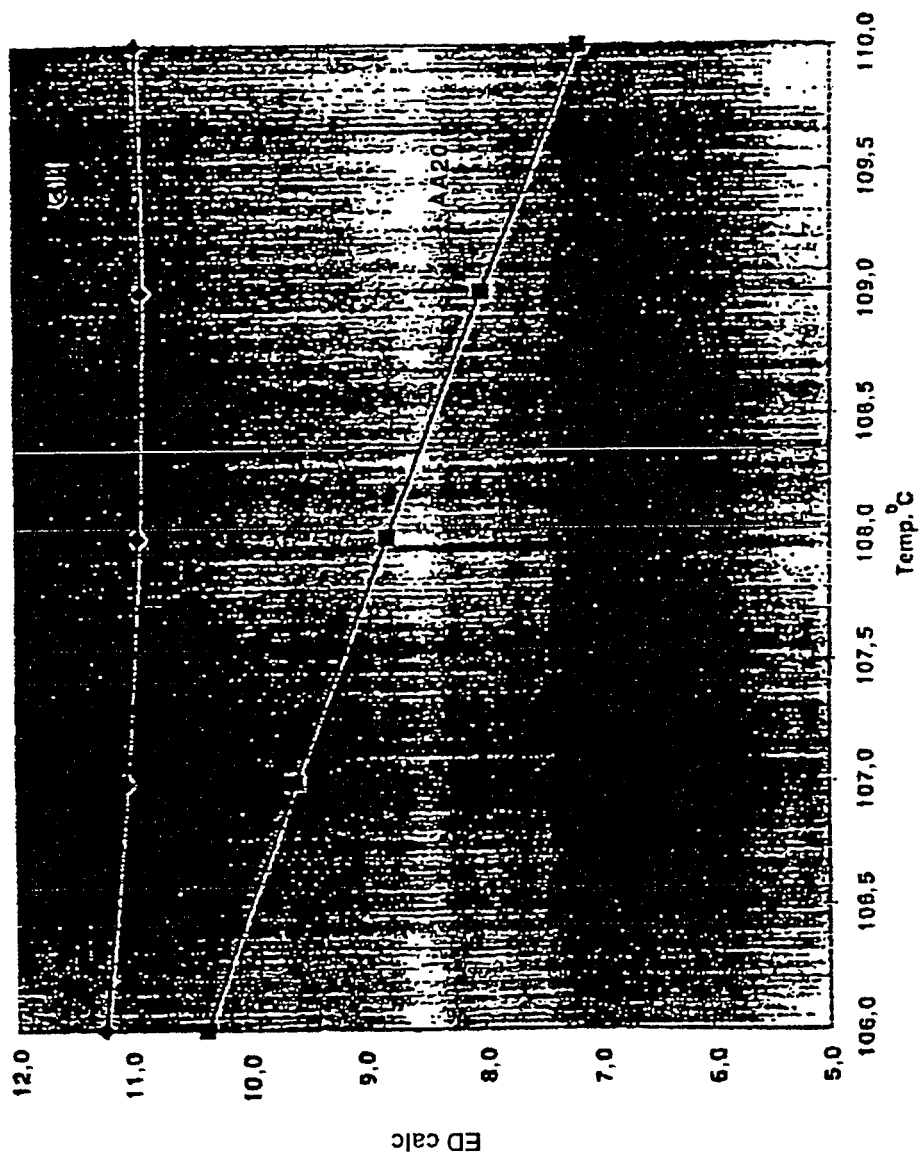


FIGURA 13

SECUENCIA SEÑAL - CRUCES DE PROTEÍNAS MADURAS EN:

B.licheniformis alfa-amilasa .

MKQQKRLTARLLTLLFALIFLLPHSAAAANL.....
(PstI)
↓

B.subtilis proteasa alcalina aprE.

MRSKTLWISLLFALTLIFTMAFSNMSAQAAGKS.....
(PstI)
↓

B.licheniformis alfa-amilasa en pBLapr.

MRSKTLWISLLFALTLIFTMAFSNMSAQAANL.....

(PstI) indica la localización de la posición de restricción en el gen
↓

NEGRITA indica el extremo N de la proteína segregada en
Bacillus.