



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 278 210**

51 Int. Cl.:
C12N 9/30 (2006.01)
C12N 15/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03779740 .4**
86 Fecha de presentación : **16.12.2003**
87 Número de publicación de la solicitud: **1576152**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.09.2005**

54 Título: **Alfa-amilasas termoestables.**

30 Prioridad: **17.12.2002 DK 2002 01928**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.08.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.08.2007

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

72 Inventor/es: **Tang, Lan;**
Wu, Wenping;
Duan, Junxin y
Johannesen, Pia, Francke

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

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

Alfa-amilasas termoestables.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a alfa-amilasas termoestables, en particular con termoestabilidad mejorada a pH ácido. La invención también se refiere al uso de tales alfa-amilasas.

10 **Antecedentes**

Alfa-amilasas (alfa-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.

15 Hay un cuerpo muy extenso de patente y bibliografía científica acerca de esta clase de enzimas industrialmente muy importante. A varias alfa-amilasas se les hace referencia como "alfa-amilasas de tipo Termamyl®" y variantes de las mismas son conocidas de, p. ej., WO 90/11352, WO 95/10603, WO 95/26397, WO 96/23873 y WO 96/23874. Las alfa-amilasas de tipo Termamyl® son muy termoestables y en consecuencia adecuadas para procesos realizados a temperaturas altas tales como licuefacción del almidón en procesos de producción de la dextrosa.

20 A otro grupo de alfa-amilasas se les hace referencia como "alfa-amilasas de tipo Fungamyl™", que son alfa amilasas relacionadas u homólogas a la alfa-amilasa derivada de *Aspergillus oryzae*. Las alfa-amilasas de tipo Fungamyl tienen una termoestabilidad relativamente baja. El producto comercial vendido con el nombre comercial FUNGAMYL™ por Novozymes A/S, Dinamarca, tiene una termoestabilidad óptima alrededor de 55°C, y no es adecuado para procesos realizados a temperaturas altas. Las alfa-amilasas de tipo FUNGAMYL™ se utilizan actualmente para hacer jarabes para, p. ej., la industria cervecera.

Claramente, sería ventajoso proporcionar una alfa-amilasa con aumentada termoestabilidad preferiblemente a un pH ácido. Ésta no es una nueva forma de realización, pero en realidad hay mucha necesidad en la técnica. Ya en 30 1980, Somkuti y Steinberg describieron una alfa-amilasa extracelular termoacidofílica de *Rhizomucor pusillus* (*Mucor pusillus*), la cual lograron aislar y caracterizar. Establecieron que: "a una temperatura elevada, el uso de amilasas termoestables y estables en ácido de origen microbiano con fines industriales está recomendado", y continúan para concluir acerca de la amilasa de *Rhizomucor* que: "Aparentemente es el primer ejemplo de alfa-amilasa fúngica que presenta acidofilia y termofilia al mismo tiempo. En consecuencia, la alfa-amilasa de *M. pusillus* debería ser 35 de importancia económica". (Somkuti GA, Steinberg DH (1980) Thermoacidophilic extracellular amylase of *Mucor pusillus*. Dev Indust Microbiol 21:327-337).

No obstante, a pesar de las conclusiones muy claras de Somkuti y Steinberg también en el año 1980, el gen que codifica la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* no ha sido clonado o secuenciado hasta el momento, y la amilasa no 40 ha sido producida recombinantemente hasta el momento en cantidades industrialmente relevantes. En 1987 un método de purificación mejorado fue proporcionado, pero sólo para la enzima producida por el tipo salvaje de *Rhizomucor pusillus* (Turchi SL y Becker T (1987) Curr Microbiol 15:203- 205).

45 **Resumen de la invención**

Un problema a resolver por esta invención es cómo proporcionar una alfa-amilasa recombinante termoacidofílica. Los presentes inventores han aislado de manera exitosa un gen de *Rhizomucor pusillus* que codifica una alfa-amilasa a la que han denominado AM782, han introducido exitosamente el gen de codificación en un sistema industrial de expresión fúngica filamentosa recombinante, y han producido la alfa-amilasa. La caracterización de la amilasa ha 50 demostrado ser una alfa-amilasa altamente termoacidofílica que tiene una actividad muy interesante según ha sido demostrado por el perfil del azúcar a partir de la hidrólisis de la maltodextrina por la amilasa AM782.

La amilasa AM782 puede funcionar a una temperatura muy alta, al menos hasta 70°C. La amilasa AM782 tiene una velocidad de reacción muy rápida; cuando se compara en la misma dosificación con FUNGAMYL™ 800 L, la 55 amilasa AM782 puede conseguir en aproximadamente 3 horas, lo que el FUNGAMYL™ tarda de 24 a 48 horas. Además, la amilasa AM782 puede degradar DP3 en DP2 y DP1, así da un resultado de DP1 más alto.

En consecuencia, en un primer aspecto la invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido con actividad alfa-amilasa, el polipéptido seleccionado del grupo que se 60 compone de: a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad con los aminoácidos 22 a 450 de la SEC ID NO:4, preferiblemente el 75%, más preferiblemente el 80%, incluso más preferiblemente el 85%, además más preferiblemente el 90%, más preferiblemente el 95%, y más preferiblemente al menos el 97% de identidad con los aminoácidos 22 a 450 de la SEC ID NO:4; b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 70% de identidad con el polipéptido codificado por la amilasa que 65 codifica parte del polinucleótido insertado en un plásmido presente en el huésped de *E. coli* depositado según el tratado de Budapest con DSMZ bajo el número de accesión DSM 15334, preferiblemente el 75%, más preferiblemente el 80%, incluso más preferiblemente el 85%, aún más preferiblemente el 90%, más preferiblemente el 95%, y más

preferiblemente al menos el 97% de identidad con el polipéptido codificado por la amilasa que codifica parte del polinucleótido insertado en un plásmido presente en el huésped de *E. coli* depositado según el tratado de Budapest con DSMZ bajo el número de accesoión DSM 15334; c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos el 70% de identidad con la secuencia mostrada desde la posición 68 a la 1417 en la SEC ID NO:3, preferiblemente el 75%, más preferiblemente el 80%, incluso más preferiblemente el 85%, aún más preferiblemente el 90%, más preferiblemente el 95%, y más preferiblemente al menos el 97% de identidad con la secuencia mostrada desde la posición 68 a la 1417 en la SEC ID NO:3; y d) un fragmento de (a), (b) o (c) con actividad alfa-amilasa.

En un segundo aspecto la invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido tal y como se define en el primer aspecto operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped adecuado.

Un tercer aspecto se refiere a un vector de expresión recombinante que comprende un constructo de ácidos nucleicos tal y como se define en el segundo aspecto.

En un cuarto aspecto la invención se refiere a una célula huésped recombinante que comprende un constructo de ácidos nucleicos tal y como se define en el segundo aspecto, o al menos una copia de un vector de expresión tal y como se define en el tercer aspecto.

La producción industrial de la amilasa AM782 con homólogos y variantes es por supuesto muy interesante.

En consecuencia, en un quinto aspecto la invención se refiere a un método para la producción de un polipéptido con actividad alfa-amilasa codificada por un polinucleótido tal y como se define en el primer aspecto, el método comprendiendo: (a) el cultivo de una célula huésped recombinante tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 12 - 16 bajo unas condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) la recuperación del polipéptido.

Hay algunas aplicaciones para una amilasa tal como la amilasa AM782, una visión de conjunto de algunas de las más importantes está proporcionada en la presente, e incluye pero no se limita a: la industria del almidón, la industria del procesamiento de los alimentos, la industria textil, y la industria de los detergentes.

En consecuencia, unos aspectos adicionales de la invención se refieren a un método para producir un derivado de almidón enzimáticamente modificado, donde un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método como se ha definido en el quinto aspecto se utiliza para la licuefacción y/o sacarificación del almidón; y a un método para producir jarabes con alto contenido en maltosa, donde un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en el quinto aspecto se usa para la licuefacción del almidón; un método para el descolado textil, donde un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en el quinto aspecto se usa para el tratamiento textil; y a un proceso de fabricación, donde un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en el quinto aspecto se añade durante la fermentación del mosto; y a un proceso de producción de alcohol, donde un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en el quinto aspecto se usa para la licuefacción del almidón en una mezcla triturada para destilería; y a un proceso, donde un producto amasado que comprende un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en el quinto aspecto es horneado.

Varios usos de la amilasa AM782 junto con homólogos y variantes están también contemplados en la presente invención.

En consecuencia, varios aspectos no limitativos de la invención se refieren al uso de un polipéptido con actividad alfa amilasa producido según un método tal y como se define en el quinto aspecto en un proceso de conversión del almidón para la licuefacción y/o sacarificación; al uso de un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en el quinto aspecto para la licuefacción del almidón en un proceso de producción de jarabe rico en maltosa; al uso de un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en el quinto aspecto para el descolado textil; al uso de un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en el quinto aspecto para producir alcohol; al uso de un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en el quinto aspecto para la fabricación de cerveza; y al uso de un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en el quinto aspecto para la cocción al horno.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1 muestra el perfil de pH de la amilasa purificada AM782.

Fig. 2 muestra el perfil de la temperatura de la amilasa purificada AM782.

Fig. 3-1 a 3-3 muestran la actividad residual de AM782 a pH 5 y 60°C, 70°C y 80°C, respectivamente.

Fig. 4-1 a 4-3 muestran la actividad residual de AM782 a pH 6 y 60°C, 70°C y 80°C, respectivamente.

Fig. 5-1 a 5-3 muestran la actividad residual de AM782 a pH 7 y 60°C, 70°C y 80°C, respectivamente.

Fig. 6 muestra el plásmido de expresión pDAu71.

Fig. 7 muestra el plásmido de expresión pPFJo143.

Fig. 8 muestra los resultados de ejemplo 4.

Definiciones

Homología y alineamiento de las secuencias

Para objetivos de la presente invención, los alineamientos de secuencias y el cálculo de los niveles de homología pueden hacerse usando un alineamiento completo de Smith-Waterman, útil tanto para alineamientos de las proteínas como del ADN. Las matrices del marcado por defecto BLOSUM50 y la matriz de identidad son usadas para los alineamientos de proteínas y del ADN respectivamente. La penalización para el primer residuo en un espacio es de -12 para las proteínas y de -16 para el ADN, mientras que la penalización para los residuos adicionales en un espacio es de -2 para las proteínas y de -4 para el ADN. El alineamiento puede hacerse con la versión v20u6 del paquete FASTA (W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448, y W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA", Methods in Enzymology, 183:63-98).

Los alineamientos múltiples de secuencias proteínicas pueden ser hechos usando "ClustalW" (Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22:4673-4680). El alineamiento múltiple de secuencias de ADN puede ser hecho usando el alineamiento de la proteína como molde, sustituyendo los aminoácidos con el codón correspondiente de la secuencia de ADN.

Polinucleótido substancialmente puro

El término "polinucleótido sustancialmente puro" como se utiliza en este caso se refiere a una preparación de polinucleótidos, donde el polinucleótido ha sido eliminado de su medio natural genético, y así está libre de otras secuencias de codificación extrañas o indeseadas y está en una forma adecuada para el uso dentro de los sistemas de producción de proteínas creados por ingeniería genética. Así, un polinucleótido substancialmente puro contiene como mucho el 10% en peso de otro material polinucleótido con el cual está originalmente asociado (porcentajes inferiores de otro material polinucleótido son preferidos, p. ej. como mucho el 8% en peso, como mucho el 6% en peso, como mucho el 5% en peso, como mucho el 4% como mucho el 3% en peso, como mucho el 2% en peso, como mucho el 1% en peso, y como mucho el 1/2% en peso). Un polinucleótido substancialmente puro puede, no obstante, incluir regiones sin traducir de origen natural 5' y 3', tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido substancialmente puro tenga al menos el 92% de pureza, es decir que el polinucleótido constituya al menos el 92% en peso del material polinucleótido total presente en la preparación, y porcentajes más altos son preferidos tales como al menos el 94% de pureza, al menos el 95% de pureza, al menos el 96% de pureza, al menos el 96% de pureza, al menos el 97% de pureza, al menos el 98% de pureza, al menos el 99%, y como mucho el 99.5% de pureza. Los polinucleótidos descritos en la presente están preferiblemente en una forma substancialmente pura. En particular, se prefiere que los polinucleótidos descritos aquí estén en "forma esencialmente pura", es decir que la preparación del polinucleótido esté esencialmente libre de otro material polinucleótido con el cual está originalmente asociada. Aquí, la expresión "polinucleótido sustancialmente puro" es sinónima de la expresión "polinucleótido aislado" y "polinucleótido en forma aislada".

ADNc

El término "ADNc" cuando se usa en el presente contexto, se destina a cubrir una molécula de ADN que puede ser preparada por transcripción inversa desde una molécula de ARNm madura empalmada derivada de una célula eucariótica. El ADNc carece de las secuencias del intrón que están normalmente presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito de ARN inicial primario es un precursor de ARNm y atraviesa una serie de eventos de procesamiento antes de aparecer como ARNm maduro dividido. Estos eventos incluyen la eliminación de secuencias del intrón por un proceso llamado empalme. Cuando el ADNc es derivado del ARNm en consecuencia carece de secuencias del intrón.

Descripción detallada

El primer aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido con actividad alfa-amilasa, el polipéptido seleccionado del grupo que se compone de: a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad con los aminoácidos 22 a 450 de la SEC ID NO:4; b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos el 70% de identidad con el polipéptido codificado por la amilasa que codifica parte del polinucleótido insertado en un plásmido presente en el huésped de *E. coli* depositado según el tratado de Budapest con DSMZ bajo el número de accesión DSM 15334; c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos

el 70% de identidad con la secuencia mostrada desde la posición 68 a la 1417 en la SEC ID NO:3; y d) un fragmento de (a), (b) o (c) con actividad alfa-amilasa.

Las técnicas usadas para aislar o donar una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido son conocidas en la técnica e incluyen el aislamiento de ADN genómico, preparación de ADNc, o una combinación de los mismos. La clonación de las secuencias de nucleótidos de la presente invención a partir de este ADN genómico puede ser efectuada, p. ej., usando la reacción en cadena de la polimerasa bien conocida (PCR) o selección de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos donados de ADN con características compartidas estructurales. Ver, p. ej., Innis *et al.*, 1990, PCR: *A Guide to Methods and Application*, Academic Press, New York. Otros procedimientos para la amplificación tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la transcripción activada ligada (LAT) y la amplificación basada en secuencias de nucleótidos (NASBA) pueden ser usados. La secuencia de nucleótidos puede ser donada a partir de una cepa de *Rhizomucor*, u otro organismo relacionado y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de las especies de la región que codifica polipéptido de la secuencia de nucleótidos.

La secuencia de nucleótidos puede ser obtenida por procedimientos de clonación estándares usados en ingeniería genética para recolocar la secuencia de nucleótidos desde su ubicación natural hasta un sitio diferente donde será reproducida. Los procedimientos de clonación pueden implicar escisión y aislamiento de un fragmento deseado comprendiendo la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, inserción del fragmento en una molécula del vector, e incorporación del vector recombinante en una célula huésped donde se replicarán copias múltiples o clones de la secuencia de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

Los términos “variante polipeptídica”, “variante proteínica”, “variante enzimática”, o simplemente “variante” se refieren a un polipéptido de la invención que comprende una o más alteración(es), tal como sustitución(es), inserción(es), deleción(es), y/o truncamiento(s) de uno o más residuo(s) aminoácidos específicos en una o más posición(es) específica(s) en el polipéptido. El número total de tales alteraciones es normalmente no superior a 10, p. ej. uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, o nueve de dichas alteraciones. Además, la variante de la invención puede incluir otras modificaciones de la enzima madre, normalmente no más de 10, p. ej. no más de 5 de tales modificaciones. La variante generalmente tiene cierta identidad de secuencia con el polipéptido genitor de al menos el 80%, p. ej. al menos el 85%, normalmente al menos el 90%, o al menos el 95%.

Los términos “polipéptido genitor”, “proteína genitora”, “enzima genitora”, “enzima estándar”, o simplemente “genitor” se refieren al polipéptido sobre el cual se basaba la variante. Estos términos también se refieren al polipéptido con el cual una variante es comparada y alineada. El genitor puede ser un polipéptido de origen natural (tipo salvaje), o puede a ser a su vez incluso una variante del mismo, preparada por cualquiera de los medios adecuados. Por ejemplo, la proteína precursora puede ser una variante de un polipéptido de origen natural que ha sido modificado o alterado en la secuencia de aminoácidos. Un genitor puede también ser una variante alélica que es cualquiera de dos o más formas de la alternativa de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación, y puede resultar en polimorfismo dentro de poblaciones como está bien descrito en la técnica. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por la variante alélica correspondiente de un gen.

El término “biblioteca aleatoria”, “biblioteca variante”, o simplemente “biblioteca” se refiere a una biblioteca de polipéptidos variantes. La diversidad en la biblioteca variante puede ser generada mediante mutagénesis de los genes que codifican las variantes a nivel del triplete de ADN, de manera que los codones individuales sean alterados p. ej. usando cebadores de la secuencia parcialmente aleatorizada en una reacción PCR. Diferentes técnicas han sido descritas, por las cuales se puede crear una biblioteca combinatoria diversa mediante la alteración de diferentes posiciones de los nucleótidos en un gen y recombinándolas, por ejemplo cuando estas posiciones están demasiado alejadas para ser cubiertas por un único cebador oligonucleótido (adicionado o dopado). Estas técnicas incluyen el uso de la recombinación *in vivo* de los segmentos del gen diversificado individualmente como se describe en WO 97/07205 en página 3, líneas 8 a 29 (Novozymes A/S). También incluyen el uso de técnicas de redistribución del ADN para crear una biblioteca de genes de longitud total, donde diferentes segmentos del gen son combinados, y donde cada segmento puede ser diversificado p. ej. por mutagénesis adicionada, (Stemmer, Nature 370, págs. 389-391, 1994 y US 5.811.238; US 5.605.793; y US 5.830.721). Se puede usar un gen que codifica un “esqueleto” de proteína (polipéptido genitor de tipo salvaje) como un polinucleótido molde, y combinarlo con uno o más oligonucleótidos de cadena mono o bicatenaria como se describe en WO 98/41623 y en WO 98/41622 (Novozymes A/S). Los oligonucleótidos monocatenarios podrían ser parcialmente aleatorizados durante la síntesis. Los oligonucleótidos bicatenarios podrían ser productos de la PCR que incluyen diversidad en una zona específica. En ambos casos, se puede diluir la diversidad con los segmentos correspondientes que codifican la secuencia del esqueleto de la proteína para limitar el número medio de cambios que son introducidos.

Los métodos también han sido establecidos para diseñar las proporciones de mezclas de nucleótidos (A; C; T; G) para ser insertadas en las posiciones del codón específico durante la síntesis de oligo o polinucleótidos, para introducir un sesgo para aproximarse a una distribución de frecuencias deseada hacia un grupo de uno o más aminoácidos deseados que será codificado por los codones particulares. Puede ser interesante producir una biblioteca variante, que comprenda permutaciones de varias modificaciones del aminoácido conocido en localizaciones diferentes en la secuencia primaria del polipéptido. Estas podrían ser introducidas de forma postraduccional o por sitios de modificación química, o bien podrían ser introducidas a través de mutaciones en los genes de codificación. Las modificaciones por sí mismas pueden haber sido indicadas previamente como provechosas por una razón o por otra (p. ej. disminución de la

antigenicidad, o mejora de la actividad específica, rendimiento, estabilidad, u otras características). En tales ejemplos, puede ser deseable primero crear una biblioteca de combinaciones diversas de las secuencias conocidas. Por ejemplo, si doce mutaciones individuales son conocidas, se podría combinar (al menos) doce segmentos del gen de codificación de la proteína precursora, donde cada segmento está presente de dos formas: una con, y una sin la mutación deseada.

5 Variando las cantidades relativas de estos segmentos, se podría diseñar una biblioteca (de tamaño 212) para que el número medio de mutaciones por gen pueda ser predicho. Ésta puede ser una vía útil de combinar mutaciones, que por sí mismas producen algún efecto, pero no lo bastante suficiente, sin recurrir a bibliotecas muy grandes, como es frecuentemente el caso cuando se usa la “mutagénesis adicionada”. Otro modo de combinar estas “mutaciones conocidas” podría ser usando la familia que redistribuye el ADN oligomérico que codifica las mutaciones conocidas con

10 fragmentos de la secuencia de tipo salvaje de longitud completa.

En consecuencia, una forma de realización preferida de la invención se refiere a un polinucleótido del primer aspecto, donde el polipéptido es una variante artificial que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene uno o más truncamiento(s), y/o al menos una sustitución, delección, y/o inserción de un aminoácido en comparación con los

15 aminoácidos 22 a 450 de la SEC ID NO:4.

Será evidente para los expertos en la técnica que tales modificaciones pueden ser hechas fuera de las regiones fundamentales para la función de la molécula y además resultan en un polipéptido activo. Los residuos aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de la invención, y en consecuencia preferiblemente no sujeto a modificaciones, como por ejemplo sustitución, pueden ser identificados según procedimientos conocidos en la técnica, como por ejemplo mutagénesis sitio dirigida o mutagénesis de barrido de alanina (ver, p. ej., Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En ésta técnica, las mutaciones son introducidas a cada residuo cargado positivamente en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes son evaluadas por la actividad amilasa para identificar los residuos aminoácidos que son fundamentales para la actividad de la molécula.

25 Los sitios de interacción enzima-sustrato pueden también ser determinados por análisis de la estructura tridimensional según está determinado por tales técnicas como el análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcado por fotoafinidad (ver, p. ej., de Vos *et al.*, 1992, *Science* 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, *Journal of Molecular Biology* 224: 899-904; Wlodaver *et al.*, 1992, *FEBS Letters* 309: 59-64).

Además, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser modificada mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos, pero que corresponden al uso del codón del organismo huésped destinado a la producción de la enzima.

La introducción de una mutación en la secuencia de nucleótidos para intercambiar un nucleótido por otro nucleótido puede ser realizada por mutagénesis sitio dirigida usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Particularmente útil es el procedimiento que utiliza un vector de ADN bicatenario superenrollado con una inserción de interés y dos cebadores sintéticos que contienen la mutación deseada. Los cebadores oligonucleótidos, cada uno complementario de las cadenas opuestas del vector, se extienden durante la variación de la temperatura por la *Pfu* ADN polimerasa. Con la incorporación de los cebadores, se genera un plásmido mutado que contiene mellas en bisel. Después de la variación de la temperatura, el producto es tratado con *DpnI* que es específico para el ADN metilado y hemimetilado para digerir el molde de ADN parental y para seleccionar para el ADN sintetizado conteniendo la mutación. Otros procedimientos conocidos en la técnica pueden también ser usados. Para una descripción general sobre la sustitución de nucleótidos, ver, p. ej., Ford *et al.*, 1991, *Protein Expression and Purification* 2: 95-107.

45

Otra forma de realización preferida se refiere a un polinucleótido del primer aspecto, donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad con los aminoácidos 22 a 450 de la SEC ID NO:4, preferiblemente al menos el 75%, más preferiblemente el 80%, aún más preferiblemente el 85%, incluso más preferiblemente el 90%, más preferiblemente el 95%, y más preferiblemente al menos el 97% de identidad con los aminoácidos 22 a 450 de la SEC ID NO:4.

50

Otra forma de realización preferida se refiere a un polinucleótido del primer aspecto, donde el polipéptido comprende los aminoácidos 22 a 450 de la SEC ID NO:4.

En una forma de realización preferida la invención se refiere a un polinucleótido del primer aspecto, donde el polipéptido consiste en los aminoácidos 22 a 450 de la SEC ID NO:4.

55

Otra forma de realización preferida de la invención se refiere a un polinucleótido del primer aspecto, donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad con el polipéptido codificado por la amilasa que codifica parte de la secuencia de nucleótidos insertada en un plásmido presente en el huésped de *E. coli* depositado conforme al Tratado de Budapest con DSMZ bajo número de accesoión DSM 15334, preferiblemente al menos el 80% de identidad, al menos el 85% de identidad, al menos el 90% identidad, al menos el 95% de identidad, o al menos el 97% de identidad con el polipéptido codificado por la amilasa que codifica parte de la secuencia de nucleótidos insertada en un plásmido presente en el huésped de *E. coli* depositado conforme al Tratado de Budapest con DSMZ bajo el número de accesoión DSM 15334; preferiblemente el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos codificada por la amilasa que codifica parte de la secuencia de nucleótidos insertada en un plásmido presente en el huésped de *E. coli* depositado conforme al Tratado de Budapest con DSMZ bajo el número de accesoión DSM 15334; además más preferiblemente el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos codificada por la

65

amilasa que codifica parte de la secuencia de nucleótidos insertada en un plásmido presente en el huésped de *E. coli* depositado conforme al Tratado de Budapest con DSMZ bajo el número de accesión DSM 15334.

Otra forma de realización preferida se refiere al polinucleótido del primer aspecto, donde el polipéptido es una variante artificial que comprende una secuencia de aminoácidos con uno o más truncamiento(s), y/o al menos una sustitución, delección, y/o inserción de un aminoácido en comparación con la secuencia de aminoácidos codificada por la amilasa que codifica parte de la secuencia de nucleótidos insertada en un plásmido presente en el huésped de *E. coli* depositado según el tratado de Budapest con DSMZ bajo el número de accesión DSM 15334.

10 *Constructo de ácidos nucleicos*

Cuando se usa en la presente, el término “constructo de ácidos nucleicos” significa una molécula de ácido nucleico, bien mono o bicatenaria, que está aislada de un gen de origen natural o modificado para contener segmentos de ácidos nucleicos de modo que de lo contrario no existiría en la naturaleza.

El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término “casete de expresión” cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia de codificación de la presente invención. Una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser manipulada de varias maneras para proporcionar la expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia de nucleótidos antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesario dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias de nucleótidos utilizando métodos de ADN recombinantes son bien conocidas en la técnica.

La expresión “secuencias de control” se define aquí como incluyendo todos los componentes, que son necesarios o ventajosos para la expresión de un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o externa a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, una secuencia líder, secuencia de poliadenilación, secuencia propéptida, promotor, secuencia del péptido señal, y terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcionales y traduccionales. Las secuencias de control pueden estar provistas de enlaces para introducir sitios de restricción específicos que faciliten la unión de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

La expresión “operativamente enlazado” se define aquí como una configuración donde una secuencia de control está apropiadamente colocada en una posición con respecto a la secuencia de codificación de la secuencia de ADN de manera que la secuencia de control dirige la expresión de un polipéptido.

Cuando se usa aquí el término “secuencia de codificación” se destina a cubrir una secuencia de nucleótidos, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los límites de la secuencia de codificación están generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que normalmente empieza con el codón de iniciación ATG. La secuencia de codificación normalmente incluye ADN, ADNc, y secuencias de nucleótidos recombinantes.

Un aspecto de la invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido tal y como se define en el primer aspecto operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped adecuado.

Vector de expresión

En el presente contexto, el término “expresión” incluye cualquier fase implicada en la producción del polipéptido que incluye, pero no se limita a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional, y secreción.

En el contexto presente, el término “vector de expresión” cubre una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de la invención, y que está operativamente enlazado a segmentos adicionales los cuales permiten su transcripción.

Un aspecto de la invención se refiere a un vector de expresión recombinante que comprende un constructo de ácidos nucleicos tal y como se define en el aspecto anterior.

Según la invención, un polinucleótido que codifica una amilasa de la invención puede ser expresado usando un vector de expresión el cual normalmente incluye secuencias de control tales como un promotor, un operador, un sitio de unión del ribosoma, una señal de iniciación de la traducción, y opcionalmente un gen represor, o varios genes activadores. El vector de expresión recombinante que transporta el polinucleótido que codifica una alfa-amilasa de la invención puede ser cualquier vector que puede ser sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que debe ser introducido. El vector puede ser uno que, al introducirse 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. Ejemplos de vectores de expresión adecuados incluyen pMT838.

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 derivar de genes que codifican proteínas bien homólogas o heterólogas a la célula huésped.

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

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

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

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

25 Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN que codifica una variante de la alfa-amilasa de la invención, especialmente en un huésped bacteriano, son el promotor del operón *lac* de *E. coli*, los promotores del gen de agarasa *dagA* de *Streptomyces coelicolor*, los promotores del gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, los promotores del gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*,
30 los promotores de alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, los promotores de los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis* etc. para la transcripción en un huésped fúngico, ejemplos no limitativos de promotores útiles son aquellos derivados del gen que codifica la TAKA amilasa de *A. oryzae*, el promotor TPI (isomerasa de triosa fosfato) de *S. cerevisiae* (Alber *et al.* (1982), J. Mol. Appl. Genet 1, p. 419-434, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *A. Niger*, la alfa-amilasa estable ácida de *A. Niger*, la glucoamilasa de *A. niger*, la lipasa de
35 *Rhizomucor miehei*, la proteasa alcalina de *A. oryzae*, la triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae* o la acetamidasa de *A. nidulans*, y, los promotores mutados truncados, y/o híbridos de los mismos.

Ejemplos de terminadores preferidos para células huéspedes filamentosas fúngicas son obtenidos a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus*
40 *nidulans*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

La secuencia de control puede también ser una secuencia líder adecuada, una región no-traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está operativamente enlazada al término 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula
45 huésped de elección puede ser usada en la presente invención.

Los líderes preferidos para células huéspedes filamentosas fúngicas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y de la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

50 La secuencia de control puede también ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al término 3' de la secuencia de nucleótidos y la cual, al ser transcrita, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped de elección puede ser usada en la presente invención.

55 Las secuencias de poliadenilación preferidas para células huéspedes filamentosas fúngicas son obtenidas a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.

La secuencia de control puede también ser una región de codificación del péptido señal que codifica para una
60 secuencia de aminoácidos enlazada al término amino de un polipéptido y dirige el polipéptido codificado en la vía segregadora de la célula. El extremo 5' de la secuencia de codificación de la secuencia de nucleótidos puede intrínsecamente contener una región de codificación del péptido señal naturalmente enlazada en el marco de lectura de la traducción con el segmento de la región de codificación que codifica el polipéptido segregado. De forma alternativa, el extremo 5' de la secuencia de codificación puede contener una región de codificación del péptido señal que es externa
65 a la secuencia de codificación. La región de codificación del péptido señal externa puede ser requerida cuando la secuencia de codificación naturalmente no contiene una región de codificación del péptido señal. De forma alternativa, la región de codificación del péptido señal externa puede simplemente reemplazar la región de codificación del péptido señal natural para aumentar la secreción del polipéptido. No obstante, cualquier región de codificación del péptido

señal que dirige el polipéptido expresado en la vía segregadora de una célula huésped de elección puede ser usada en la presente invención.

Las regiones de codificación del péptido señal eficaces para las células huéspedes bacterianas son las regiones de codificación del péptido señal obtenidas a partir de los genes para amilasa maltogénica NCIB 11837 de *Bacillus*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (*nprT*, *nprS*, *nprM*), y *prsA* de *Bacillus subtilis*. Otros péptidos señales adicionales están descritos por Simonen y Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.

Las regiones de codificación del péptido señal eficaces para células huéspedes filamentosas fúngicas son las regiones de codificación del péptido señal obtenidas a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens*, y lipasa de *Humicola lanuginosa*.

La secuencia de control puede también ser una región de codificación del propéptido que codifica para una secuencia de aminoácidos situada en el término amino de un polipéptido. El polipéptido resultante es conocido como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y puede ser convertido en un polipéptido maduro activo por seccionamiento catalítico o autocatalítico del propéptido del propolipéptido. La región de codificación del propéptido puede ser obtenida a partir de los genes para la proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (*aprE*), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (*nprT*), alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y la casa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836). Cuando ambas regiones del péptido señal y del propéptido están presentes en el término amino de un polipéptido, la región del propéptido está situada junto al término amino de un polipéptido y la región del péptido señal está situada junto al término amino de la región del propéptido.

Puede también ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido relativa al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son los que causan la expresión del gen para ser activados o desactivados en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en los sistemas procarióticos incluyen los sistemas del operador *lac*, *tac*, y *trp*. En hongos filamentosos, el promotor TAKA de alfa-amilasa, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* pueden ser usados como secuencias reguladoras.

Otros ejemplos de secuencias reguladoras son las que tienen en cuenta la amplificación génica. En los sistemas eucarióticos, estos incluyen el gen de la dihidrofolato-reductasa que es amplificado en presencia de metotrexato, y los genes de la metalotioneina que son amplificados con metales pesados. En estos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido sería operativamente enlazada con la secuencia reguladora. 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 elemento extracromosómico, un minicromosoma, o un cromosoma artificial.

El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. De forma alternativa, el vector puede ser uno que al introducirse en la célula huésped, se integre en el genoma y se replique con el(los) cromosoma(s) donde haya sido integrado. Además, se puede usar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total para ser introducido en el genoma de la célula huésped, o en un transposón.

Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o más marcadores seleccionables que permiten una fácil selección de las células transformadas. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares. Ejemplos de marcadores bacterianos seleccionables son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o de *Bacillus licheniformis*, o los marcadores que confieren resistencia a los antibióticos tal como resistencia a la ampicilina, a la canamicina, al cloranfenicol o a la tetraciclina. Los marcadores seleccionables para el uso en una célula huésped filamentosa fúngica incluyen, pero no se limitan a, *amdS* (acetamidasa), *argB* (omitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hygB* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-d Descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa), *trpC* (antranilato sintasa), así como equivalentes de los mismos.

Para el uso en una célula de *Aspergillus* se prefieren los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o de *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen un(os) elemento(s) que permite(n) la integración estable del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración estable del vector en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. De forma alternativa, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped. Las secuencias de nucleótidos adicionales permiten que el vector sea integrado en el genoma de la célula huésped en una(s) localización(es) precisa(s) en el(los) cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa,

los elementos integracionales deberían preferiblemente contener un número suficiente de nucleótidos, tal como de 100 a 1.500 pares de bases, preferiblemente de 400 a 1.500 pares de bases, y más preferiblemente de 800 a 1.500 pares de bases, que son altamente homólogos a la secuencia meta correspondiente para aumentar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia meta en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos no codificantes o codificantes. En cambio, el vector puede ser integrado en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

Para la replicación autónoma, el vector puede además comprender un origen de replicación que permita que el vector se replique de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322; pUC19; pACYC177, y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110; pE194; pTA1060, y pAM β 1 que permiten la replicación en *Bacillus*. Un ejemplo de una secuencia que asegura un mantenimiento autónomo en una célula huésped filamentosa fúngica es la secuencia AMA1. El origen de replicación puede ser uno que tenga una mutación que haga su funcionamiento termosensible en la célula huésped (ver, p. ej., Ehrlich, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75:1433).

Más de una copia de una secuencia de nucleótidos de la presente invención puede ser insertada en la célula huésped para aumentar la producción del producto genético. Un aumento en el número de copias de la secuencia de nucleótidos puede ser obtenido mediante la integración de al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o mediante la inclusión de un gen marcador seleccionable amplificable con la secuencia de nucleótidos donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y por lo tanto las copias adicionales de la secuencia de nucleótidos, pueden ser seleccionadas mediante el cultivo de las células en presencia del agente apropiado seleccionable.

25 Células huéspedes

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

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

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

La célula huésped puede también ser un hongo filamentoso, p. ej., una cepa perteneciente a una especie de *Aspergillus*, más preferiblemente de *Aspergillus oryzae* o de *Aspergillus Niger*, o una cepa de *Fusarium*, tal como una cepa de *Fusarium oxysporium*, *Fusarium graminearum* (en el estado perfecto denominada *Gibberella zeae* previamente *Sphaeria zeae*, sinónimo de *Gibberella roseum* y *Gibberella roseum f. sp. cerealis*), o *Fusarium sulphureum* (en el estado perfecto denominada *Gibberella purpuris*, sinónimo de *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium sambucium*, *Fusarium roseum*, y *Fusarium roseum var. graminearum*), *Fusarium cerealis* (sinónimo de *Fusarium crockwellense*), o *Fusarium venenatum*.

En una forma de realización preferida de la invención la célula huésped es una cepa carente de proteasa o sin proteasa. Ésta por ejemplo puede ser la cepa carente de proteasa del género *Aspergillus*, en particular una cepa de *A. oryzae*, tal como JaL 125 de *A. oryzae* que tiene el gen de la proteasa alcalina denominado "alp" deletado. Esta cepa está descrita en WO 97/35956 (Novo Nordisk).

Las células de hongos filamentosos pueden ser transformadas por un proceso que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguido de la regeneración de la pared celular en cierto modo conocido *per se*. El uso de *Aspergillus* como un microorganismo huésped está descrito en EP 238 023 (Novo Nordisk), cuyos contenidos están incorporados en la presente por referencia.

Un aspecto de la invención se refiere a una célula huésped recombinante que comprende un constructo de ácidos nucleicos tal como se ha definido anteriormente, o al menos una copia de un vector de expresión tal como se ha definido anteriormente.

Una forma de realización preferida se refiere a una célula del aspecto precedente, que es un microorganismo; preferiblemente una célula que es una bacteria o un hongo; más preferiblemente una célula que es una bacteria grampositiva tal como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amylolicuefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus* o *Bacillus thuringiensis*; o más preferiblemente una célula que es una cepa carente de proteasa del hongo *Aspergillus*, en particular *A. oryzae*.

Método para producir una variante de la alfa-amilasa de la invención

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

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

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

Varios métodos para usar tales amilasas producidas, así como otros usos más específicos están perfilados en otros aspectos de la invención como se ha mencionado anteriormente en el resumen de esta invención.

La presente invención proporciona un método de utilización de alfa-amilasa codificada por los polinucleótidos de la invención para producir glucosa o maltosa o similares a partir de almidón.

Generalmente, el método incluye las fases de hidrólisis parcial del almidón precursor en presencia de la alfa-amilasa y después hidrólisis adicional de la liberación de D-glucosa desde los extremos no reductores del almidón o moléculas oligo y polisacáridas relacionadas en presencia de glucoamilasa seccionando los enlaces alfa-(1→4) y alfa-(1→6) glucosídicos.

La hidrólisis parcial del precursor del almidón que utiliza alfa-amilasa proporciona una ruptura inicial de las moléculas del almidón al hidrolizar los enlaces alfa-(1→4) internos. En aplicaciones comerciales, la hidrólisis inicial usando alfa-amilasa se realiza a una temperatura de aproximadamente 105°C. Una concentración muy alta de almidón es procesada, normalmente del 30% al 40% de sólidos secos. La hidrólisis inicial es normalmente realizada durante aprox. cinco minutos a esta temperatura elevada. El almidón parcialmente hidrolizado puede después ser transferido a un segundo tanque e incubado durante aproximadamente una hora a una temperatura de 85° a 90°C para derivar en un equivalente de dextrosa (D.E) de 10 a 15.

La fase de hidrólisis adicional de la liberación de D-glucosa de las extremidades no reducidas del almidón o moléculas oligo y polisacáridas relacionadas en presencia de glucoamilasa es normalmente realizada en un tanque separado a una temperatura reducida entre 30° y 60°C. Preferiblemente la temperatura del líquido del sustrato cae entre 55° y 60°C. El pH de la solución cae de 6 - 6.5 a una gama entre 3 y 5.5. Preferiblemente, el pH de la solución es de 4 a 4.5. La glucoamilasa es añadida a la solución y la reacción se realiza durante 24-72 horas, preferiblemente 36-48 horas.

Las alfa-amilasas codificadas por los polinucleótidos de la invención pueden también ser usados en los procesos de fabricación de la cerveza. Además, la alfa-amilasa codificada por los polinucleótidos de la invención pueden ser usados para la producción de la maltosa. El jarabe rico en maltosa es normalmente producido como sigue. Para producir "jarabe rico en maltosa" (conteniendo 50-55% de maltosa), el almidón es licuado hasta un DE 10-20. El pH y la temperatura del almidón licuado se ajusta a 65°C y a un pH alrededor de 5.0, respectivamente, y está sujeto a la actividad de la alfa-amilasa maltogénica (p. ej., amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, tal como Maltogenase™ 4000 L, 0.4 L/T DS (Novozymes)), actividad pululanasa (p. ej., pululanasa de *Bacillus*, tal como Promozyme™ 600 L, 0.3 L/T DS (Novozymes) y actividad alfa-amilasa (p. ej., BAN 240 L o Termamyl™ 120 L, tipo LS, 0.4 kg/T DS (Novozymes) durante 24-41 horas. El tiempo de procesamiento específico depende de la consecución del espectro del sacárido deseado. Mediante el aumento de la dosificación de la alfa-amilasa maltogénica y del contenido de pululanasa, el contenido en maltosa puede ser aumentado.

De forma alternativa, "jarabe rico en maltosa" puede ser producido primero mediante la licuefacción del almidón hasta un DE 10-20 y luego ajustando el pH y la temperatura a 55°C o superior y a un pH alrededor de 5.5 o inferior, y luego sometiendo el almidón licuado a una actividad alfa-amilasa fúngica (p. ej., amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, tal como Fungamyl™ 800L (Novozymes) durante 22-44 horas. La dosificación de Fungamyl™ 800L fúngico depende del tiempo de sacarificación previsto, p. ej., 200 g/T DS durante 44 horas y 400 g/T DS durante 22 horas. Las alfa-amilasas codificadas por los polinucleótidos de la invención pueden sustituir el Fungamyl™ 800L en el proceso

ES 2 278 210 T3

anterior, y luego la temperatura puede ser incluso más alta, y el pH incluso inferior, dando como resultado un nivel de conversión más rápido, y así una mejor economía global.

Para producir “jarabe rico en maltosa”, el almidón con contenido en maltosa del 55-65% de almidón es licuado hasta DE 10-20. La temperatura y el pH del almidón licuado es ajustado a 60°C o superior, y a un pH alrededor de 6 o inferior, y está sujeto a la actividad alfa-amilasa maltogénica (p. ej., Maltogenase™ 4 000 L, 0.25-1.0 L/T d S (Novozymes)), y actividad alfa-amilasa fúngica (p. ej., amilasa de *Aspergillus*, tal como Fungamyl™ 800 L, 0.4-1.0 kg/T DS (Novo Nordisk) durante 24-48 horas; o la alfa-amilasa codificada por el polinucleótido de la invención durante un tiempo más corto.

La variante de la alfa-amilasa de la invención puede también ser usada en procesos de cocción. En un aspecto la invención se refiere al uso de una variante de la invención para la conversión del almidón, la producción del alcohol, la fabricación de la cerveza, y la cocción al horno.

La invención también se refiere a un proceso de producción de jarabe de maltosa que incluye las etapas de: 1) licuefacción del almidón en presencia de una alfa-amilasa; 2) dextrinización en presencia de una variante de alfa-amilasa fúngica de la invención; y 3) recuperación del jarabe; y purificación opcional del jarabe.

La alfa-amilasa usada para la licuefacción en la fase 1) puede ser cualquier alfa-amilasa. Las alfa-amilasas preferidas son las alfa-amilasas de *Bacillus*, tal como una alfa-amilasa del tipo Termamyl, que incluya la alfa-amilasa de *B. licheniformis* (comercialmente disponible como Termamyl™ (Novo Nordisk)), la alfa-amilasa de *B. amylicoluefaciens* (vendida como BAN (Novo Nordisk)), la alfa-amilasa de *B. stearothermophilus* (vendida como Termamyl™ 120 L tipo S), las alfa-amilasas derivadas de una cepa de *Bacillus sp.* NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 o DSM 9375, todas ellas descritas con detalle en WO 95/26397, y la alfa-amilasa descrita por Tsukamoto *et al.*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 151 (1988), pp. 25-31. Las alfa-amilasas dentro de la definición de “alfa-amilasa de tipo Termamyl” están definidas por ejemplo en WO 96123874 (Novo Nordisk).

En otro aspecto la invención se refiere a un proceso de producción de maltosa que incluye las etapas de: 1) licuefacción del almidón a una temperatura de 140-160°C a un pH de 4-6, 2) dextrinización a una temperatura en la gama de 60-95°C, en particular a 65-85°C, tal como 70-80°C, a un pH 4-6 en presencia de una variante de alfa-amilasa fúngica de la invención; y 3) recuperación del jarabe; y purificación opcional del jarabe.

En una forma de realización de la invención, se añade una cantidad eficaz de glucoamilasa en la fase 2). El jarabe en esta forma de realización (incluyendo el tratamiento con una glucoamilasa) no es jarabe de maltosa, sino jarabe con un perfil de azúcar diferente. La glucoamilasa puede ser una glucoamilasa de *Aspergillus*, en particular una glucoamilasa de *Aspergillus Niger*.

De forma alternativa, el proceso incluye las etapas de: 1) licuefacción del almidón a una temperatura de 95-110°C a un pH de 4-6 en presencia de una alfa-amilasa de *Bacillus*; 2) licuefacción a una temperatura en la gama de 70-95°C a un pH 4-6 en presencia de una alfa-amilasa codificada por un polinucleótido tal y como se define en el primer aspecto de la invención, seguido de la recuperación y/o purificación opcional del producto obtenido.

Finalmente, algunos aspectos de la invención se refieren a varios usos de detergentes. Un aspecto se refiere a un aditivo detergente que comprende una alfa-amilasa codificada por un polinucleótido tal y como se define en el primer aspecto, opcionalmente en forma de un granulado no pulverulento, líquido estabilizado o enzima protegida. Una forma de realización preferida de este aspecto se refiere a un aditivo detergente que contiene 0.02-200 mg de proteína enzimática/g de aditivo. Otra forma de realización preferida se refiere a un aditivo de detergente según el aspecto precedente, que adicionalmente comprende otra enzima tal como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, otra enzima amilolítica y/o una celulasa. Otro aspecto se refiere a una composición de detergente que comprende una alfa-amilasa codificada por un polinucleótido tal y como se define en el primer aspecto, y una forma de realización preferida de este aspecto se refiere a una composición de detergente que adicionalmente comprende otra enzima tal como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, otra enzima amilolítica y/o una celulasa. Además otro aspecto se refiere a una composición de detergente para lavavajillas manual o automático que comprende una variante de la alfa-amilasa codificada por un polinucleótido tal y como se define en el primer aspecto. Una composición de detergente para lavavajillas preferido adicionalmente comprende otra enzima tal como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, otra enzima amilolítica y/o una celulasa. Un aspecto relacionado de detergente final es una composición para el lavado de la ropa manual o automático que comprende una variante de la alfa-amilasa codificada por un polinucleótido tal y como se define en el primer aspecto; y una composición para el lavado de la ropa preferida comprende adicionalmente otra enzima tal como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, una enzima amilolítica y/o una celulasa.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Purificación y caracterización de la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* NN046782

Esta alfa-amilasa denominada AM782 fue purificada del caldo de cultivo de la cepa termofílica fúngica NN046782, y demostró ser más estable que la amilasa BAN (*Bacillus amyloliquefaciens*) a 60, 70, y 80°C, a pH = 5.0, 6.0, y 7.0. Las características están resumidas como sigue:

10	Peso molecular (SDS)	≈50 kDa (SDS-PAGE)
	pI	pH 3.5
	Gama de pH activo	pH 3-9
15	pH óptimo	pH 4-5
	Gama de temperatura activa	30-80°C
	Temperatura óptima	70°C
	Estabilidad del pH	estable a pH = 5,6,7.

20 Medios para el crecimiento fúngico

YG: agar de glucosa-levadura

25	5.0 g extracto de levadura en polvo Difco; 20.0 g de agar; Autoclave a 121°C durante 15-20 min.	10.0 g de glucosa 1000 ml de agua corriente
----	---	--

30 Medios FG-4 50 ml/matraz

30	30 g harina de soja, 5 g peptona, 1 g de aceite de oliva (2 gotas/matraz)	15 g maltosa 1000 ml de H ₂ O
----	---	---

35 50 ml en 500 ml matraz de Erlenmeyer con 2 deflectores. Autoclave a 121°C durante 30 min.

Los hongos fueron dejados crecer en una placa de agar YG (4.5 cm diámetro) durante 3 días a 45°C en la oscuridad y usados para inocular un matraz de agitación. Las placas con cultivos completamente desarrollados fueron almacenadas a 4°C antes del uso.

Para la producción enzimática, 4-6 tapones de agar con cultivos fúngicos completamente desarrollados en las placas anteriores fueron usados para inocular un matraz de agitación con FG-4 y dejados crecer a 45°C, a 160 rpm durante 72 horas, luego se cosecharon por centrifugado del caldo de cultivo a 8000 rpm y 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante fue recogido y usado para la purificación enzimática.

Productos químicos y reactivos

50 BAN estándar y Fungamyl™ 800 L (Novozymes A/S, Dinamarca) fueron usados como punto de referencia. AZCL-amilosa (Megazyme) fue usada para el ensayo enzimático.

Otros productos químicos y tampones incluyen:

55 25 mM de Tris-HCl, pH 7.0, 25 mM de tris-HCl; 1 M de NaCl, pH 7.0, 0.1 M de Na₃PO₄/Ácido cítrico, pH 5.5; sulfato amónico; 0.1 M de NaAc, pH 5.0, 0.1 M de MES, pH 6.0, 0.1 M de tris-HCl, pH 7.0 tampón para perfil del pH; 100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 mM de CaCl₂, 150 mM de KCl, 0.01% de Tritón X-100 ajustado a valores de pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 y 11.0 con HCl o NaOH.

60 Pruebas de actividad enzimática

Ensayo en placas de microtitulación

65 Los sobrenadantes fueron evaluados por su actividad alfa-amilasa por un ensayo en placas de microtitulación. Una solución del 0.2% de la AZCL-amilosa del sustrato azul (Megazyme) fue suspendida en un 0.1 M de tampón fosfato-citrato (pH 5.5) o tampón tris-HCl (pH 7) bajo agitación. La solución fue distribuida bajo agitación a una placa de microtitulación (200 µl para cada pocillo), 20 µl de muestra enzimática fueron añadidos y las placas fueron incubadas

ES 2 278 210 T3

en un termomezclador Eppendorf durante 15-30 minutos a 50°C y 650 rpm. La muestra de la enzima desnaturalizada fue preparada a 100°C hirviéndola durante 20 min. y luego usada como controles blancos. Tras la incubación, la solución coloreada fue separada del sólido por centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Luego 150 µl de sobrenadante fue transferido a una placa de microtitulación y la absorbencia fue medida en un lector de microplacas BioRad a 595 nm.

Ensayo en tubo Eppendorf

Una solución del 0.2% de sustrato azul AZCL-amilosa (Megazyme) fue suspendida en tampones a diferentes valores de pH bajo agitación. Las soluciones fueron distribuidas bajo agitación en tubos Eppendorf de 1.5 ml (900 µl para cada uno), se añaden 100 µm de muestra enzimática a cada tubo y éstos fueron luego incubados al baño maría durante 10-60 min. a 50°C. Las muestras de la enzima desnaturalizada (preparadas por ebullición a 100°C durante 20 min) fueron usadas como controles blancos. Tras la incubación la solución coloreada fue separada del sólido por centrifugado a 5000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Luego 200 µl de sobrenadante fueron transferidos a una placa de microtitulación y la absorbencia fue medida en un lector de microplacas BioRad a 595 nm.

Isoelectroenfoque

El isoelectroenfoque se efectuó en una placa PAG Ampholine a pH 3.5-9.5 (Pharmacia, Suecia) según las instrucciones del fabricante. Las muestras fueron aplicadas por triplicado y después de la electroforesis el gel fue dividido en tres. Una sobrecapa que contenía el 1% de agarosa y el 0.4% de AZCL-amilosa en un tampón a pH 5-7 fue vertida sobre cada parte del gel que fue incubado a 45°C durante 12-16 horas. La actividad enzimática y el pI de la proteína enzimática fueron identificados por las zonas azules.

SDS-PAGE

Para controlar la purificación y determinar el peso molecular de la amilasa purificada, 30 µl de muestras enzimáticas fueron aplicadas al 12% de la electroforesis en gel SDS-poli acrilamida. El gel fue realizado a 100 V durante 1.5 hrs y coloreado con azul de Coomassie.

Purificación enzimática

300 ml de sobrenadante de la cepa NN046782 fueron precipitados con sulfato amónico (80% de saturación) y redisoluertos en 20 ml de 25 mM de tampón tris-HCl, pH 7.0, luego dializados contra el mismo tampón y filtrados a través de un filtro de 0.45 µm, el volumen final fue 200 ml. La solución fue aplicada a una columna de 35 ml Source 15Q (Pharmacia) equilibrada en 25 mM de tampón tris-HCl, pH 7.0, y las proteínas fueron eluidas con un gradiente del NaCl lineal (0 -0.3 M). Las fracciones de la columna fueron analizadas por la actividad amilasa en AZCL-amilosa a pH 5.5. Las fracciones con actividad amilasa fueron agrupadas. Luego la solución agrupada fue ultrafiltrada, la solución concentrada fue aplicada a una columna de 180 ml Superdex75 equilibrada con 25 mM de tris-HCl, pH 7.0, las proteínas fueron eluidas con el mismo tampón. Las fracciones conteniendo la amilasa fueron analizadas por SDS-PAGE y las fracciones puras fueron agrupadas.

Caracterización enzimática

Perfil de pH

20 µl de muestra enzimática y 200 µl 0.2% de AZCL-amilosa en el sistema del tampón siguiente (100 mM de ácido succínico, 100 mM de HEPES, 100 mM de CHES, 100 mM de CABS, 1 mM de CaCl₂, 150 mM de KCl, 0.01% de Triton X-100 ajustado a los valores de pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 y 11.0 con HCl o NaOH) con diferente pH fueron mezclados en una placa de microtitulación y colocados en hielo antes de la reacción. El ensayo fue iniciado transfiriendo la placa de microtitulación a un termomezclador Eppendorf, que fue preparado a una temperatura de ensayo de 50°C. La placa fue incubada durante 20 minutos en el termomezclador Eppendorf a un nivel de agitación de 650 rpm. La incubación fue detenida transfiriendo la placa de nuevo al baño de hielo. Luego la placa fue centrifugada en un centrifugador enfriado en hielo durante unos minutos y 150 µl de sobrenadante fueron transferidos a una nueva placa de microtitulación. La absorbencia, OD₅₉₅, fue leída como una medida de la actividad amilasa. Todas las reacciones fueron hechas por triplicado, y un tampón ciego fue incluido en el ensayo (en vez de la enzima). Las enzimas comerciales BAN y FungamylTM fueron usadas como controles positivos. Los resultados están mostrados en la figura 1.

Perfil de la temperatura

Tubos Eppendorf con 200 µl del 0.2% de AZCL-amilosa en 0.1 M de tampón Na₃PO₄/ácido cítrico pH 5.5 fueron preincubados a 20, 30, 40, 50, 55, 60, 70, 80°C. El ensayo fue iniciado mediante la mezcla de 20 µl de muestra enzimática con el tampón. Los tubos fueron incubados durante 10 minutos en el termomezclador Eppendorf a su nivel de agitación máximo (1400 rpm). La incubación fue detenida transfiriendo el tubo al baño de hielo. Luego los tubos fueron centrifugados en un centrifugador enfriado en hielo durante unos minutos y 150 µl de sobrenadante fueron transferidos a una placa de microtitulación. La OD₆₉₅ fue leída como una medida de la actividad amilasa. Toda la

ES 2 278 210 T3

reacción fue realizada por triplicado y un tampón ciego fue incluido en el ensayo (en vez de la enzima). BAN y Fungamyl™ fueron usados como control. Los resultados están mostrados en la figura 2.

Estabilidad del pH y de la temperatura

80 µl de muestra enzimática (diluidos con 0.1 M de NaAc pH 5.0, 0.1 M de MES pH 6.0, 0.1 M de tris-HCl pH 7.0 respectivamente) en un tubo Eppendorf fueron incubados durante 5, 10, 15 y 20 minutos en el termomezclador Eppendorf a 60, 70, 80°C y agitándose a 300 rpm. La incubación fue detenida transfiriendo el tubo de nuevo al baño de hielo. La muestra no incubada fue usada como control. Los 20 µl de la muestra incubada anterior fueron transferidos a una nueva placa de microtitulación y 200 µl del 0.2% de AZCL-amilosa fueron añadidos en 0.1 M de tampón Na₃PO₄/Cítrico pH 5.5. El ensayo fue iniciado transfiriendo la placa de microtitulación a un termomezclador Eppendorf, que fue preparado a la temperatura de ensayo de 50°C. La placa fue incubada durante 30 minutos en el termomezclador Eppendorf a un nivel de agitación de 650 rpm. La incubación fue detenida transfiriendo de nuevo la placa al baño de hielo. Luego la placa fue centrifugada en un centrifugador enfriado en hielo durante unos minutos y 150 µl de sobrenadante fueron transferidos a una placa de microtitulación nueva. La OD₅₉₅ fue leída como una medida de la actividad amilasa. Toda la reacción fue realizada por duplicado y un tampón ciego fue incluido en el ensayo (en vez de la enzima). BAN y Fungamyl™ fueron usados como control. Los resultados están mostrados en las Figuras 3-5.

Ensayo de la actividad secundaria

La amilasa purificada fue evaluada en los siguientes sustratos a pH 7.0: AZCL-galactomanano, AZCL-beta-glucano, AZCL-dextrano, AZCL-xiloglucano, AZCL-patata galactano, AZCL-arabinano, AZCL-pululano, AZCL-xilano, AZCL- he-celulosa, AZCL-caseína. No se detectó ninguna actividad secundaria en ninguno de los sustratos.

La pureza de la amilasa purificada fue controlada en el 12% de SDS-PAGE, el peso molecular de la enzima está alrededor de 50 kDa como se ha visto en SDS-PAGE, el pI de AM782 está alrededor de pH 3.5 según se ha determinado por IEF.

Ejemplo 2

Clonación del gen que codifica la alfa-amilasa AM782 de *Rhizomucor pusillus* NN046782

Cepa fúngica y su crecimiento

Rhizomucor pusillus NN046782 fue desarrollada a 45°C, 165 rpm durante 48 horas en un medio de FG4 con el 2% de almidón. El micelio fue cosechado por centrifugado a 7000 rpm durante 30 minutos. El micelio cosechado fue almacenado a -80°C antes del uso para la extracción del ARN.

Extracción del ARN total

El ARN total fue extraído de 100 mg micelio usando el RNeasy Mini Kit (Qiagen).

Cebadores específicos

Se descubrió que la amilasa AM782 de *Rhizomucor pusillus* NN046782 tenía la misma secuencia N-terminal que un gen codificador de amilasa que hemos identificado y secuenciado en un proyecto anterior a partir de otra cepa *Rhizomucor pusillus* NN101459. Así dos cebadores específicos fueron diseñados a partir de la secuencia de ADN previamente determinada, y éstos fueron usados para la clonación de la amilasa de NN046782.

Cebador AM298-CDSF (SEC ID NO:1): 5' tat cat gaa att cag cat

Cebador AM298-CDSR (SEC ID NO:2): 5' agt tca aaa tgg aca aag t

Se usó el sistema de reacción PCR y condiciones siguientes:

Pfu ADN polimerasa tampón 10 x PCR con MgSO ₄	5 µl
10 mM de mezcla dNTP	1 µl
Cebador AM298-CDSF (10 µM)	1 µl
Cebador AM298-CDSR (10 µM)	1 µl
Pfu ADN polimerasa (3 u/µl)	0.5 µl
Reacción de síntesis de ADNc (molde)	2 µl
Agua sometida a autoclave, destilada añadida a	50 µl

ES 2 278 210 T3

Condiciones:

5	95°C	3 min	40 ciclos
	95°C	30 seg	
	45 o 50 o 53°C	30 seg	
	72°C	3 min	
	72°C	7 min	

10 El producto de la PCR fue visto en gel de agarosa y una banda específica fue identificada y purificada. Así 0.3 μ l de este producto de la PCR fue usado como molde en una segunda PCR en las condiciones siguientes.

15	Pfu ADN polimerasa tampón 10 x PCR con MgSO ₄	5 μ l
	10 mM mezcla dNTP	1 μ l
	Cebador AM298-CDSF (10 μ M)	1 μ l
	Cebador AM298-CDSR (10 μ M)	1 μ l
	Pfu ADN polimerasa (3 u/ μ l)	0.5 μ l
20	reacción de síntesis de ADNc	0.3 μ l
	Agua sometida a autoclave, destilada añadida a	50 μ l

Condiciones:

25	95°C	3 min	40 ciclos
	95°C	30 seg	
	55°C	30 seg	
	72°C	3 min	
	72°C	7 min	

35 Una banda específica con el tamaño de aproximadamente 1.5 kb fue el resultado de esta amplificación. Una cola poliA fue añadida usando Taq ADN polimerasa (producto de la PCR 20 μ l, tampón 10 x 2 μ l, Mg 2+ 1 μ l, DATP (10 mM) 0.5 μ l, Taq polimerasa (5 unidad/ μ l) 0.3 μ l) e incubándose a 72°C durante 30 min. El fragmento con cola dA fue recuperado del gel con el kti GFX y rediseñado en 30 μ l de agua. Luego el fragmento purificado fue ligado en el vector pGEM-T (mezclando el tampón 2 x 10 μ l, T-vector (50 N g/l) 1 μ l, T4 ligasa (3 unidad/L) 1 μ l y el producto de la PCR purificado 8 μ l; luego se deja reposar durante toda la noche a 4 grados), y se transforma en las células competentes (condición de la transformación: 1 μ l de solución de enlace y 40 μ l de célula competente DH10B en una cubeta de 0.1 cm, 1.8 KV. 8 clones positivos fueron seleccionados por la colonia PCR.

Sistema Colonia PCR

45	Tampón 10 x PCR	5 μ l
	25 mM de MgCl ₂	3 μ l
	10 mM de mezcla dNTP	1 μ l
	AM298-CDSF	1 μ l
	AM298-CDSR	1 μ l
50	pfu polimerasa	1 μ l
	Agua sometida a autoclave, destilada añadida a	50 μ l

Una colonia blanca fue transferida directamente en una mezcla de PCR en la que sirvió como molde. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

55	94°C	3 min	30 ciclos
	94°C	30 seg	
	55°C	30 seg	
	72°C	1 min	
	72°C	10 min	

65 Después de la reacción PCR, 10 μ l de productos de la PCR fueron cargados en el 1% de agarosa en un tampón 0.5 x TBE y pasados a través del gel a 90 V durante 1 hora y luego visualizados por UV, todas las colonias dieron resultado positivo.

Luego el plásmido fue extraído de 3 de estos 8 clones con el Wizards Plus Minipreps DNA Purification System (Promega). Los plásmidos fueron ordenados usando el ET terminator kit (Amersham) con los dos cebadores AM298-CDSF y AM298-CDFR, y los 3 clones resultaron ser idénticos, la secuencia de longitud total está mostrada en la SEC ID NO:3.

Un plásmido comprendiendo una secuencia de ADN codificadora de la alfa-amilasa AM782 ha sido transformada en una cepa *Escherichia coli* DH10B que fue depositada por los Inventores conforme al Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para fines del Procedimiento en Materia de Patentes en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, República federal alemana, el 29 de Noviembre de 2002 con el número de depósito DSM 15334. El depósito fue realizado por Novozymes A/S. Está contemplado que la secuencia de ADN de este plásmido comprende la secuencia de ADN de la SEC ID NO: 3.

Un análisis adicional de las secuencias del clon de ADNc indicó que la secuencia contenía una región de codificación de 1413 nucleótidos. El producto de la traducción de la región de codificación es un péptido de 471 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos deducida codificada por este gen, con un péptido señal (de aa 1-21) y un péptido maduro (de aa 22-471) está mostrada en la SEC ID NO:4.

Ejemplo 3

Subclonación y expresión heteróloga de la amilasa AM782

Cepas y plásmidos

La cepa BECh2 de *A. oryzae* usada como huésped de la expresión tiene el siguiente genotipo: *amy⁻ alp⁻, Npr⁻, CPA⁻, KA⁻*. *E.coli* DH5alpha (Invitrogen™) fue usada como huésped de la donación en la construcción del vector de expresión. Se utilizó el plásmido de expresión pDAu71 (figura 6) conteniendo el gen *amdS* de *A. nidulans* como marcador de la selección en *Aspergillus* y el gen de resistencia a la ampicilina para la selección en *E. coli*, dos copias del promotor NA2 (amilasa neutra) de *A. Niger* con 3 sitios extra *amyR* + la parte 5' sin traducir del promotor TPI de *A. nidulans* para la expresión heteróloga y el terminador AMG de *A. niger*.

Amplificación por PCR

Tampón 10 x PCR (incl. MgCl ₂)	5 µl
2.5 mM de mezcla dNTP	5 µl
168/R.p. amy3-forw (10 µM)	5 µl
169/R.p. amy4-rev (10 µM)	5 µl
Polimerasa Expand High Fidelity (Roche)	0.5 µl
Molde de ADN	1 µl
Agua sometida a autoclave, destilada añadida a	50 µl

Condiciones:

95°C	1 min	1 ciclo
94°C	30 seg	
60°C	30 seg	20 ciclos
72°C	1.30 min	
72°C	2 min	1 ciclo

Construcción del plásmido pPFJo143 (figura 7): un fragmento de ADN conteniendo el gen AM782 fue amplificado por PCR a partir de un plásmido conteniendo el ADNc de longitud total con cebadores diseñados a partir de la secuencia completa:

Cebador 168/R.p. amy3-forw (SEC ID NO: 5): gaagatctaccatgaaattcagcatctctctc

Cebador 169/R.p. amy4-rev (SEC ID NO:6): ccgctcgagttaagcagaggtgaagatagc

Los cebadores tienen los sitios de restricción de la clonación *Bgl*III-*Xho*I, respectivamente, en los extremos. Una agrupación del producto de la PCR de reacciones PCR individuales fue usada para la clonación. El producto de la PCR fue digerido con *Bgl*III y *Xho*I y clonado en pDAu71, digerido con *Bam*HI y *Xho*I. El producto de la PCR fue secuenciado y se comprobó que era idéntico a la secuencia original.

La transformación de BECh2 fue realizada por un método que implicaba la formación de protoplastos y su transformación. Los procedimientos adecuados para la transformación en *Aspergillus* están descritos en EP 0 238 023 y en

ES 2 278 210 T3

Yelton *et al.*, 1984, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 1470-1474. Los transformantes fueron aislados y dejados crecer en recipientes Nunc en 10 ml de YPM (1% extracto de levadura, 2% Bacto-peptona, y 2% maltosa) durante 3 días a 30°C (rotados).

5 Electroforesis en gel SDS-PAGE: 10 μ l de muestras de sobrenadantes de los cultivos de 10 ml anteriormente descritos fueron sometidos a electroforesis en gel SDS. Los geles fueron coloreados con SYPRO Orange Protein Gel Stain (Molecular Probes).

10 La alfa-amilasa fue evaluada por PNP como sigue. Se realizó una solución de trabajo: 5 ml de solución de alfa-glucosidasa + 1 ml de solución de sustrato (PNP-sustrato). Se usó Termamyl™ como estándar (concentraciones de 0-100 NU/ml). Tampón para dilución: 50 mM de ácido acético, ácido bórico y ácido fosforoso y 0.1 mM de CaCl₂ + 0.25% de BRIJ35. 20 μ l de sobrenadante en una placa de microtitulación fueron incubados durante 2 mins. 200 μ l de solución de trabajo fueron añadidos. Cinética a 405 nm durante 3 min.

15 ORF amplificado por la PCR fue clonado en el vector de expresión pDAu71, dando como resultado pPFJo143 como se describe en Materiales y Métodos (figura 7). El plásmido fue transformado en BECh2 (*A. oryzae*). 10 transformantes fueron aislados, dejados crecer en YPM durante 3 días y los sobrenadantes fueron sometidos a SDS-PAGE. Estos niveles de expresión mostraron variables que varían entre muy poca y bastante buena expresión. El peso molecular está alrededor de 50 kDa, conforme al resultado encontrado para la enzima de tipo salvaje. Se eligió BECh2/pPFJo143-9
20 transformante para fermentar para una purificación de la amilasa a poca escala. Un ensayo de la alfa-amilasa fue realizado según Materiales y Métodos (tabla 1). Se realizó con Termamyl™ como estándar - y las unidades son NU/ml - lo que significa que sólo nos proporciona números relativos, pero podíamos ver que había una buena correlación entre actividad y cantidad de proteína.

25 TABLA 1

Los sobrenadantes de la fermentación de los 10 transformantes 143-1 a 143-10 fueron sometidos al ensayo de alfa-amilasa usando un sustrato de PNP. Los números son relativos

Transf.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NU/ml	155	192	241	195	166	240	107	212	342	205

Ejemplo 4

40 *Investigación del perfil del azúcar de la hidrólisis de la maltodextrina por la alfa-amilasa AM782*

Aparato

45 Equipo Neto lab en baño maría termostatzado DT1; peachímetro (Mettler MP220); sistema de HPLC Waters (A/P TSCN-QI-2411); pipeta electrónica; espectrofotómetro UV-1601; balanza (Mettler Ag 204); Refractómetro.

Vidrio de laboratorio

50 250 ml de matraz con tapa; anillos pesados para matraz; 500 ml de matraz volumétrico; 500 ml vaso de precipitación; 10 ml tubos de vidrio.

Enzimas

55 AM 782 alfa-amilasa a 0.225 FAU/ml, y como control una amilasa fúngica Fungamyl™ 800 L comercialmente disponible (Novozymes A/S. Dinamarca; AFN-000515) a 0.135 FAU/g.ds.

Actividad amilolítica

60 La actividad alfa-amilasa puede ser expresada en "Unidades de alfa-Amilasa Fúngica" (FAU). Una (1) FAU es la cantidad de enzima que bajo condiciones estándar (es decir a 37°C y pH 4.7) se fracciona en 5260 mg de almidón sólido (Amylum solubile, Merck) por hora. Un archivo AF 9.1/3, describiendo este ensayo FAU con más detalles, está disponible bajo pedido por Novozymes NS, Dinamarca, dicho archivo está incluido en la presente por referencia.

Sustrato

65 DE 11 maltodextrina FFS-99039.

ES 2 278 210 T3

Protocolo

Dos baños maría fueron preparados a una temperatura de 55°C y 70°C respectivamente. 53 g de maltodextrina fueron lentamente añadidos en 397 g de agua Milli-Q hirviendo en un vaso de precipitado de cristal y agitados con un agitador electrónico simultáneamente, hasta que toda la maltodextrina fue disuelta en el agua. El peso de la solución de maltodextrina fue observado, y se añadió más agua hirviendo hasta 450 g. La solución de maltodextrina fue transferida en el baño maría y enfriada hasta la temperatura de la hidrólisis. Luego la solución de maltodextrina fue dividida en dos partes iguales: una parte fue ajustada a pH 5.0 con 1 N de HCl; el resto fue mantenida a su pH natural (5.5). La concentración del sustrato fue controlada por refractómetro (DS aproximadamente el 10%).

Las soluciones de la maltodextrina fueron transferidas en cuatro frascos con tapas de 250 ml: Matraz #1 con 90 g de solución pH 5.5; Matraces #2 & #3 con 90 g de solución pH 5.0; matraz #4 con 95 g de solución pH 5.5. Los matraces fueron mantenidos al baños maría a la temperatura de la hidrólisis, los matraces #1-3 a 70°C, y el matraz #4 a 55°C.

10 ml de enzima AM782 diluida (6 ml de muestra de AM782 con 4 ml de agua Milli-Q) fueron añadidos a cada uno de los matraces #1-3 conteniendo 90 g de solución, y se añadieron 5 ml de Fungamyl™ diluido (0.04 g de Fungamyl en 100 ml de agua Milli-Q) al matraz #4 conteniendo 95 g de solución. De esta manera, se dosificó AM782 y Fungamyl™ al mismo nivel de actividad, es decir 0.135 FAU/g.ds.

El pH de cada matraz fue controlado y el DS de cada matraz fue medido por muestreo a T=0 horas. Después se tomaron muestras de 4 ml de cada matraz de agitación a T=3, 6, 9, 21, 24, 28, 45, y 48 horas tras la incubación al baño maría.

Las enzimas en las muestras de la hidrólisis fueron inactivadas inmediatamente después del muestreo hirviendo las muestras durante 15 minutos, y luego enfriándolas hasta la temperatura ambiente para el análisis de HPLC. Tras el enfriamiento, pH y DS fueron medidos por cada muestra para determinar la dilución de la muestra, y luego la muestra fue diluida con agua Milli-Q hasta una concentración de DS=5%. Las muestras fueron mezcladas con resina de intercambio iónico de lecho mezclado (Bio-Rad AG 501/X8 (D)) y se dejaron reposar durante 20 minutos, esto eliminó la ceniza y el N soluble de las muestras. Las muestras fueron luego filtradas a través de un filtro de 0.2 µM (Sartorius MINISART™ NML 0.2 micras) y las muestras filtradas fueron recogidas en botellas de HPLC y analizadas por HPLC. Los resultados están proporcionados en las tablas 2-4 a continuación, y en la figura 8.

TABLA 2

Matraz #1 con AM782 (0.135 FAU/g.ds.) a 70°C, y pH 5.5 inicial

Horas	PH	%DS	%DP1	%DP2	%DP3	%DP4
3	6.05		7.59	52.63	16.54	23.25
6	6.03		13.74	57.39	8.61	20.26
9	6.02		16.46	57.78	6.12	19.64
21	5.88		19.08	58.57	4.37	17.98
24	5.83		18.78	58.65	4.34	18.22
28	5.82		18.47	58.92	4.25	18.37
45	5.61		19.04	58.71	4.07	18.18
48	5.58	12.3	18.72	58.59	4.28	18.42

ES 2 278 210 T3

TABLA 3

Matraces #2 & #3 con AM782 (0.135 FAU/g.ds.) a 70°C y pH 5.0 inicial

Horas	PH	%DS	%DP1	%DP2	%DP3	%DP4
3	5.89		7.34	51.74	16.56	24.37
6	5.88		13.66	56.96	8.61	20.78
9	5.87		16.13	57.29	6.53	20.05
21	5.75		18.13	58.12	4.87	18.88
24	5.72		17.99	58.33	5.02	18.68
28	5.74		17.54	58.69	4.83	18.95
45	5.53		17.79	58.45	4.87	18.90
48	5.52	11.9	17.85	58.29	4.91	18.95

TABLA 4

Matraz #4 con Fungamyl™ 800L (0.135 FAU/g.ds.) a 55°C y pH 5.5 inicial

Horas	PH	%DS	%DP1	%DP2	%DP3	%DP4
20	6.12	10.8	1.41	45.27	28.19	25.13
24	6.05	10.9	1.73	45.39	27.67	25.21

Este experimento indicó que la amilasa AM782 puede funcionar a una temperatura muy alta, al menos hasta 70°C. La amilasa AM782 tiene una velocidad de reacción muy rápida; al compararse en la misma dosificación con Fungamyl™ 800 L, la amilasa AM782 puede conseguir en aproximadamente 3 horas, lo que el Fungamyl™ tarda de 24 a 48 horas. Además, la amilasa AM782 puede degradar DP3 en DP2 y DP1, así proporciona un resultado de DP1 mayor.

REIVINDICACIONES

1. Polinucleótido aislado que comprende un marco de lectura abierto que codifica un polipéptido con actividad alfa-amilasa, el polipéptido seleccionado del grupo que se compone de:

a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad con los aminoácidos 22 a 450 de la SEC ID NO:4;

b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad con el polipéptido codificado por la parte codificadora de la amilasa del polinucleótido insertado en un plásmido presente en el huésped de *E. coli* depositado conforme al Tratado de Budapest con DSMZ bajo el número de accesión DSM 15334;

c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 70% identidad con la secuencia mostrada desde la posición 68 a 1417 en la SEC ID NO:3; y

d) un fragmento de (a), (b) o (c) que tiene actividad alfa-amilasa.

2. Polinucleótido según la reivindicación 1, donde el polipéptido es una variante artificial que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene uno o más truncamiento(s), y/o al menos una sustitución, delección, y/o inserción de un aminoácido en comparación con los aminoácidos 22 a 450 de la SEC ID NO:4.

3. Polinucleótido según la reivindicación 1 o 2, donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 70% de identidad con los aminoácidos 22 a 450 de la SEC ID NO:4.

4. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el polipéptido comprende los aminoácidos 22 a 450 de la SEC ID NO:4.

5. Polinucleótido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el polipéptido consiste en los aminoácidos 22 a 450 de la SEC ID NO:4.

6. Constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 - 5 operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en una célula huésped adecuada.

7. Vector de expresión recombinante que comprende un constructo de ácidos nucleicos tal y como se define en la reivindicación 6.

8. Célula huésped recombinante que comprende un constructo de ácidos nucleicos tal y como se define en la reivindicación 6, o al menos una copia de un vector de expresión tal y como se define en la reivindicación 7.

9. Célula según la reivindicación 8, que es un microorganismo.

10. Célula según la reivindicación 9, que es una bacteria o un hongo.

11. Célula según la reivindicación 10, que es una bacteria grampositiva 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*.

12. Célula según la reivindicación 10, que es una cepa carente de proteasa del hongo *Aspergillus*, en particular *A. oryzae*.

13. Método para la producción de un polipéptido con actividad alfa-amilasa codificado por un polinucleótido tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5, el método comprendiendo:

(a) el cultivo de una célula huésped recombinante tal y como se define en cualquiera de las reivindicaciones 8-12 bajo las condiciones propicias para la producción del polipéptido; y

(b) la recuperación del polipéptido.

14. Método para producir un derivado de almidón modificado enzimáticamente, en el que se utiliza un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en reivindicación 13 para la licuefacción y/o sacarificación del almidón.

15. Método para producir jarabes ricos en maltosa, en el que se utiliza un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en reivindicación 13 para la licuefacción del almidón.

ES 2 278 210 T3

16. Método para desengomado textil, en el que se usa un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en reivindicación 13 para el tratamiento textil.

5 17. Proceso de fabricación, en el que se añade un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en reivindicación 13 durante la fermentación del mosto.

18. Proceso de producción de alcohol, en el que se usa un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en la reivindicación 13 para la licuefacción del almidón en una pasta de destilería.

10 19. Proceso, en el que un producto amasado que comprende un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en reivindicación 13 es horneado.

15 20. Uso de un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en la reivindicación 13 en un proceso de conversión del almidón para licuefacción y/o sacarificación.

21. Uso de un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en la reivindicación 13 para la licuefacción del almidón en un proceso de producción de jarabe rico en maltosa.

20 22. Uso de un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en la reivindicación 13 para el desengomado textil.

23. Uso de un polipéptido con actividad alfa-amilasa producida según un método tal y como se define en la reivindicación 13 para la producción de alcohol.

25 24. Uso de un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en la reivindicación 13 para la fabricación de la cerveza.

30 25. Uso de un polipéptido con actividad alfa-amilasa producido según un método tal y como se define en la reivindicación 13 para la cocción al horno.

35

40

45

50

55

60

65

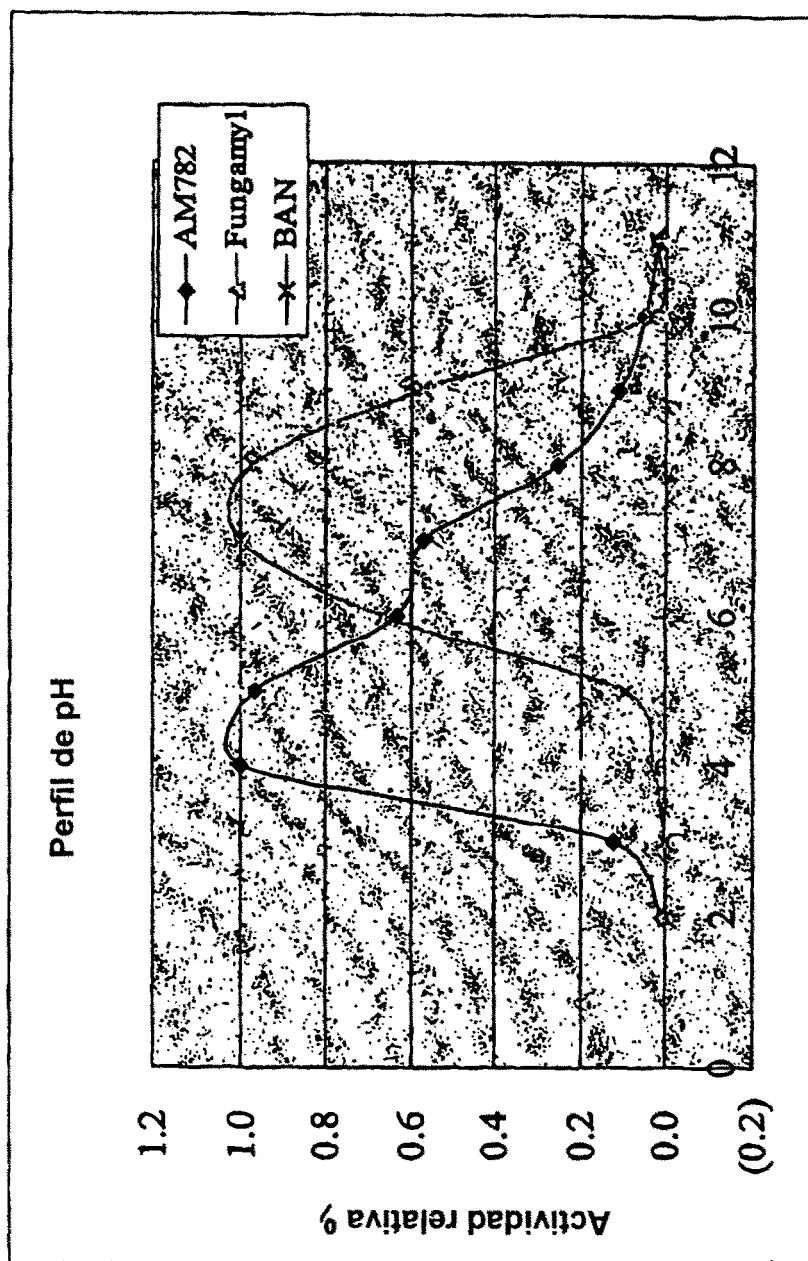


Figura 1

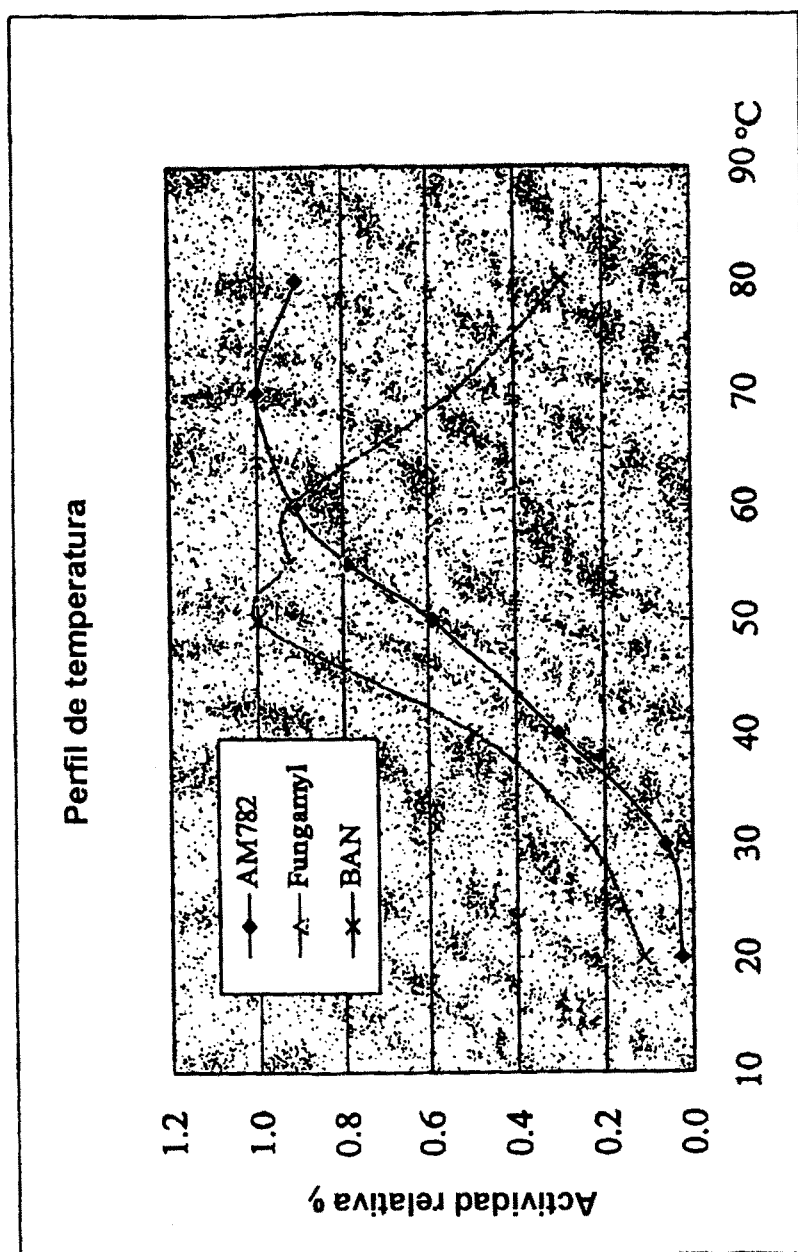


Figura 2

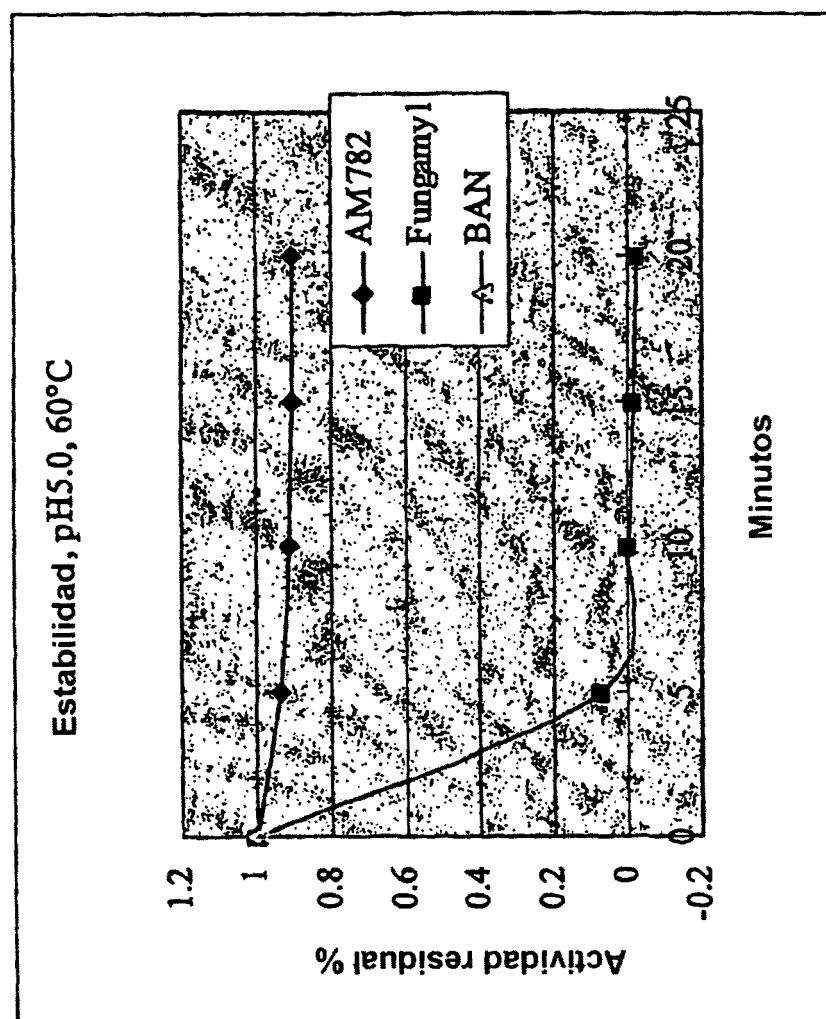


Figura 3-1

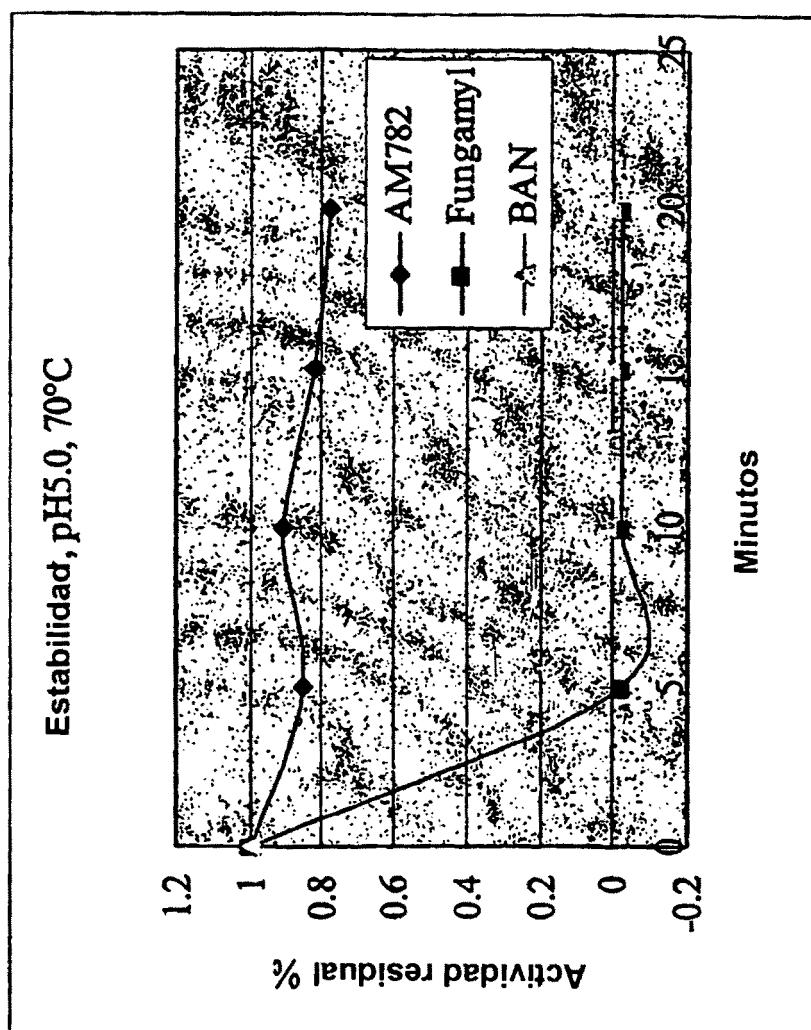


Figura 3-2

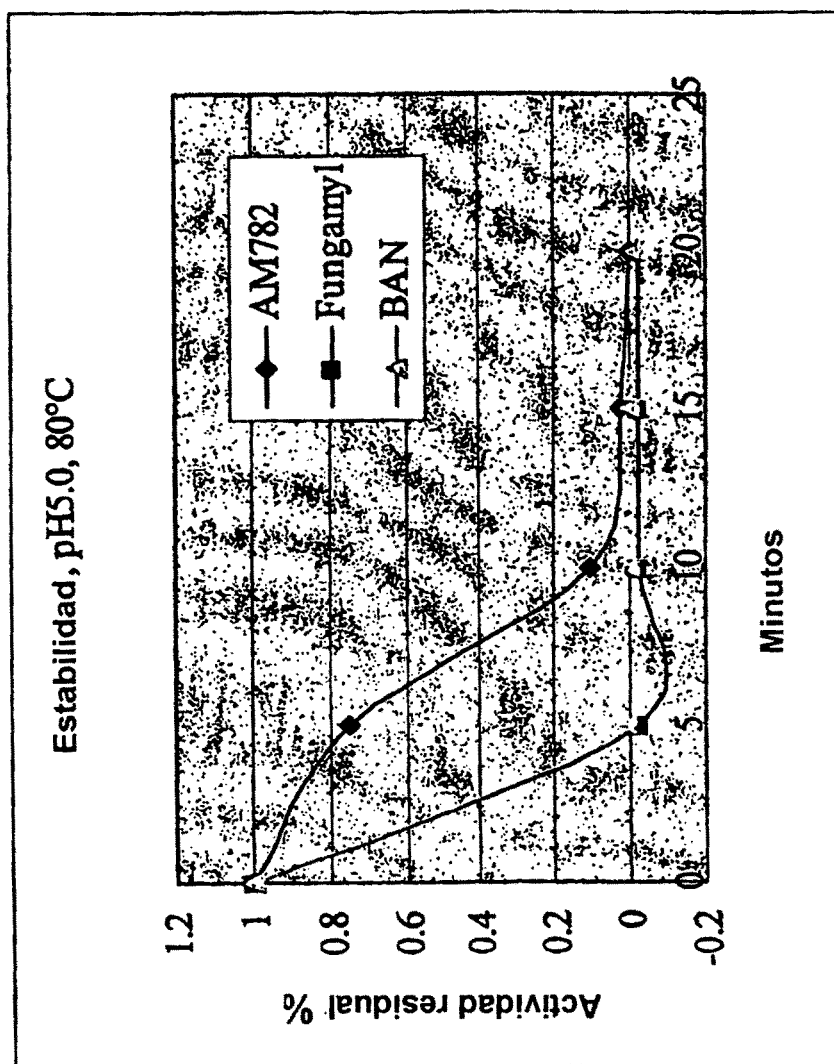


Figura 3-3

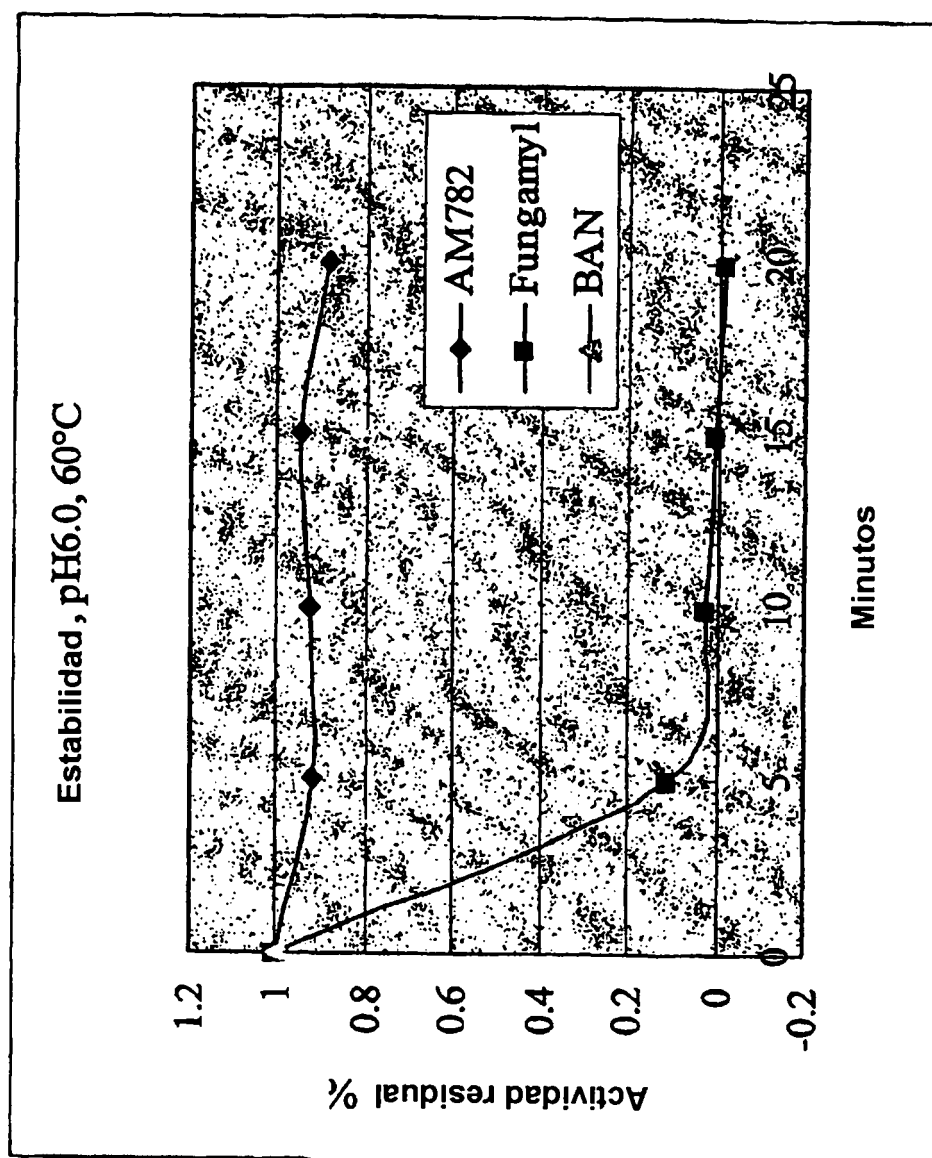


Figura 4-1

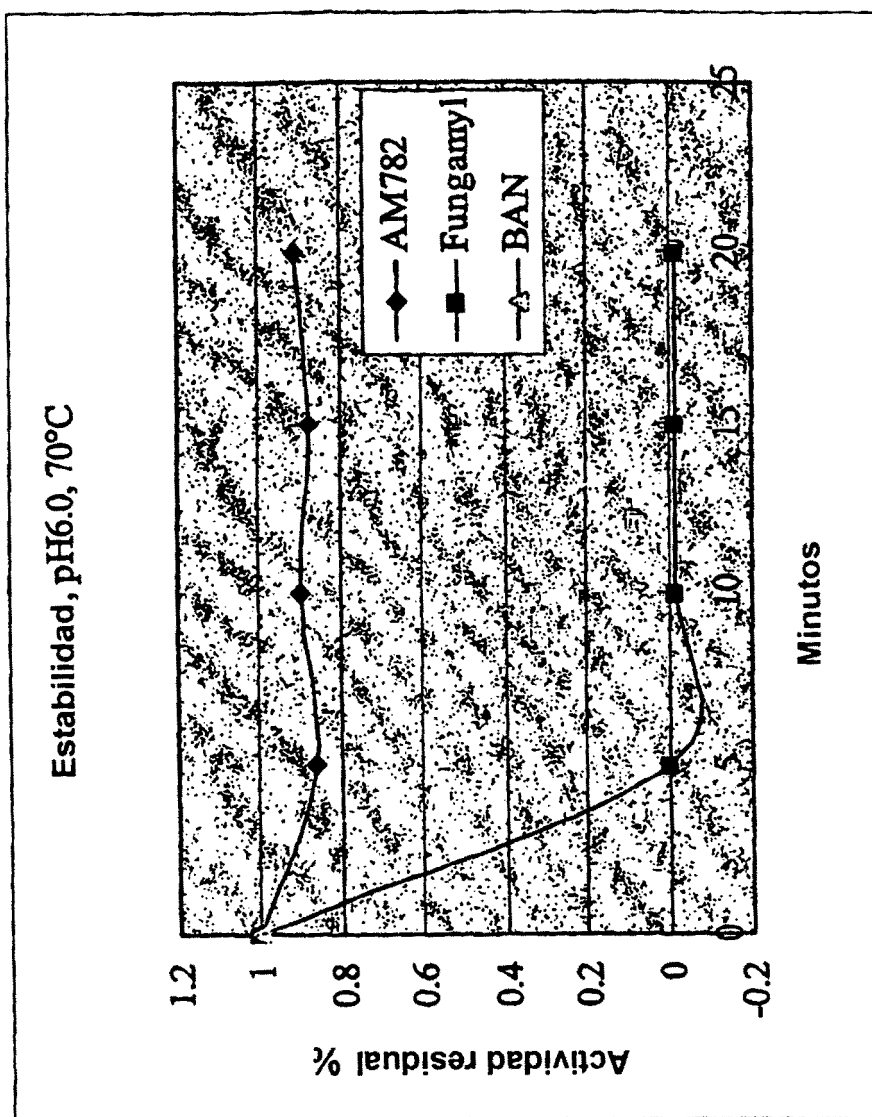


Figura 4-2

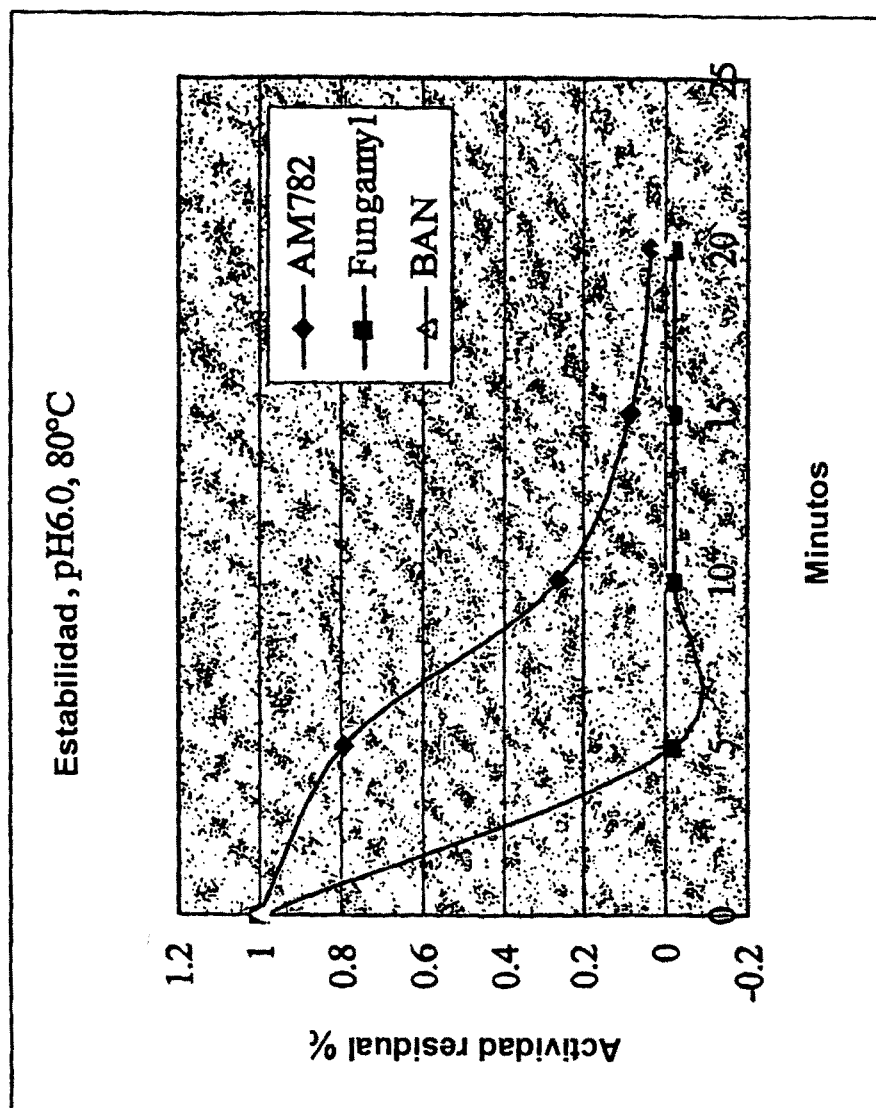


Figura 4-3

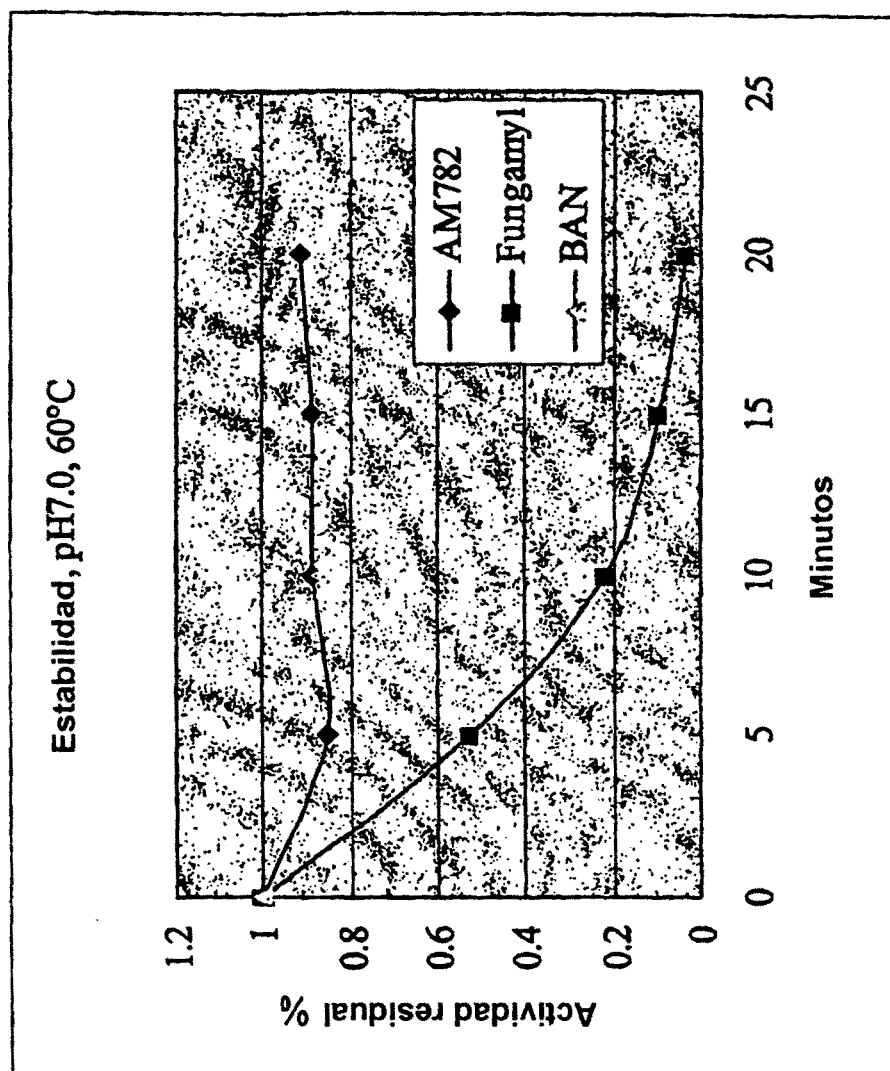


Figura 5-1

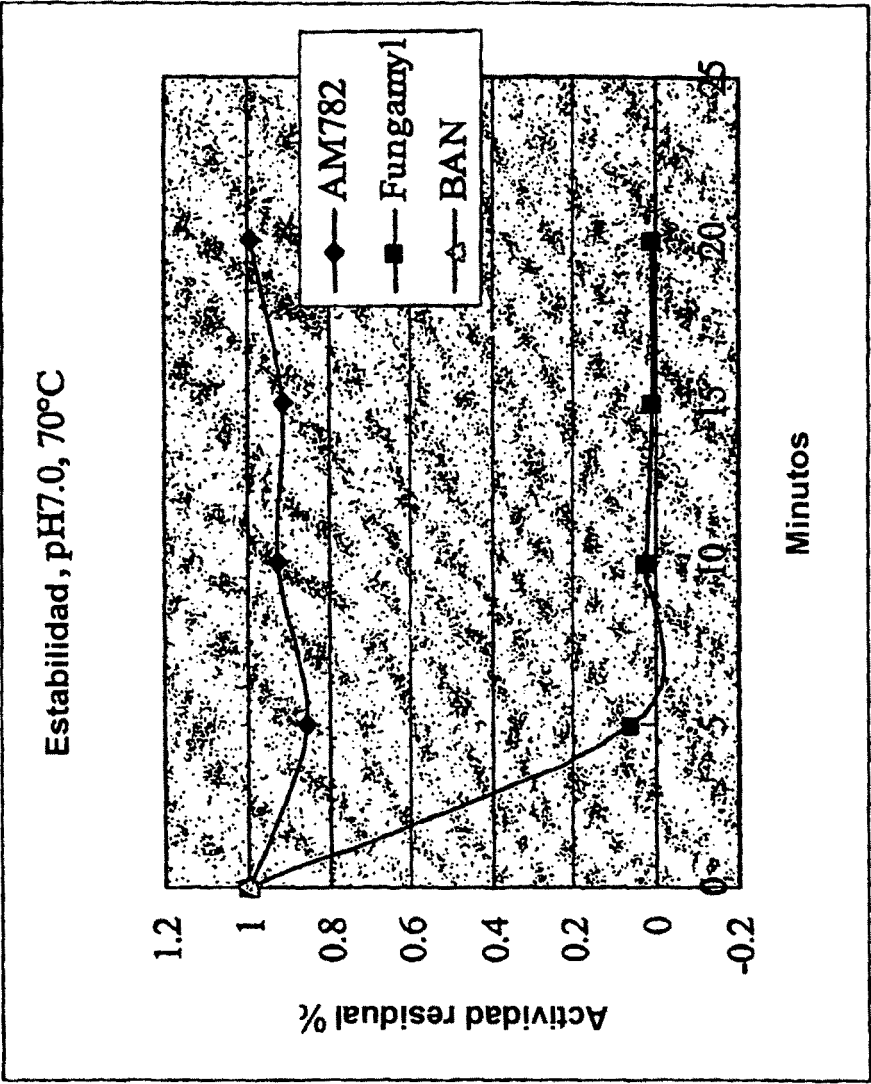


Figura 5-2

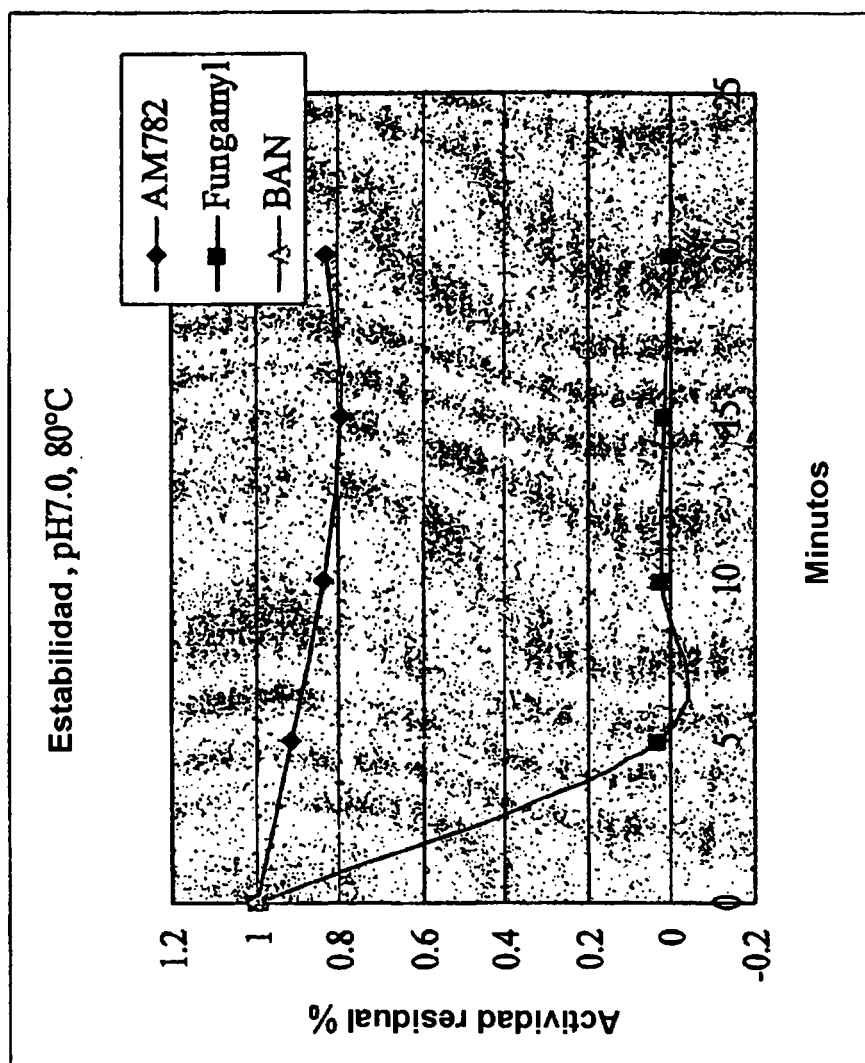


Figura 5-3

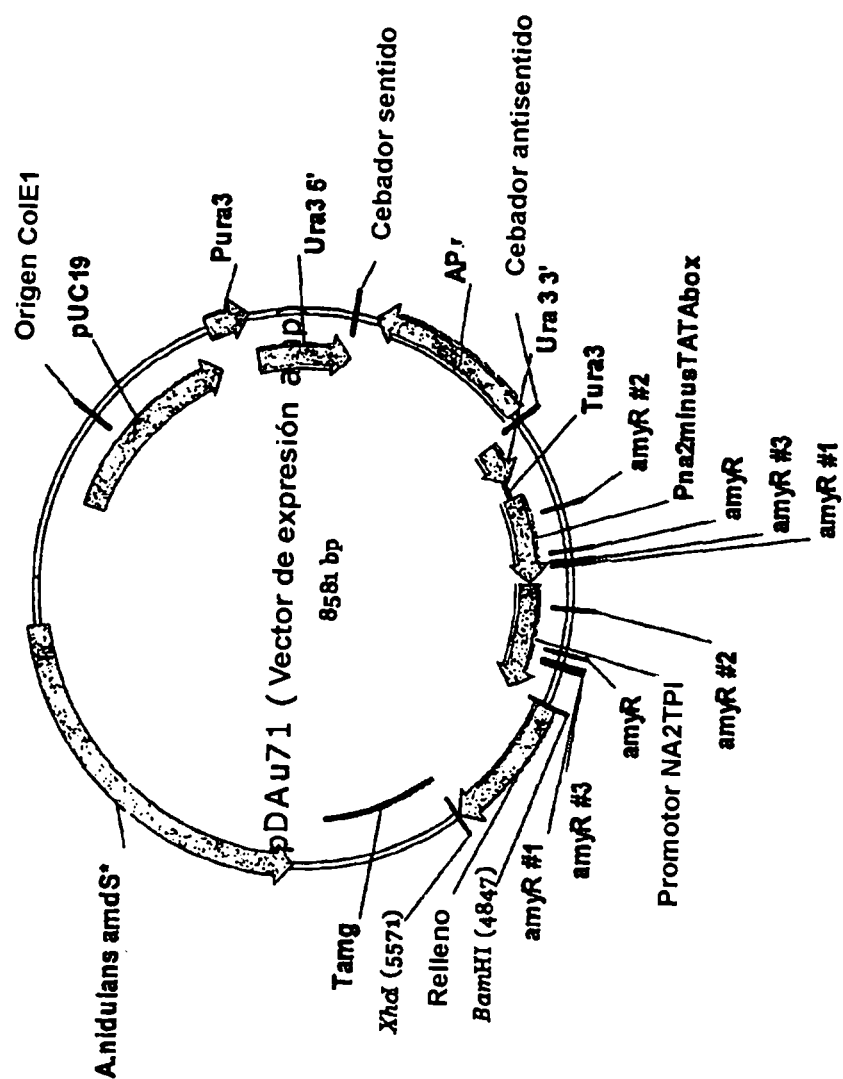


Figura 6

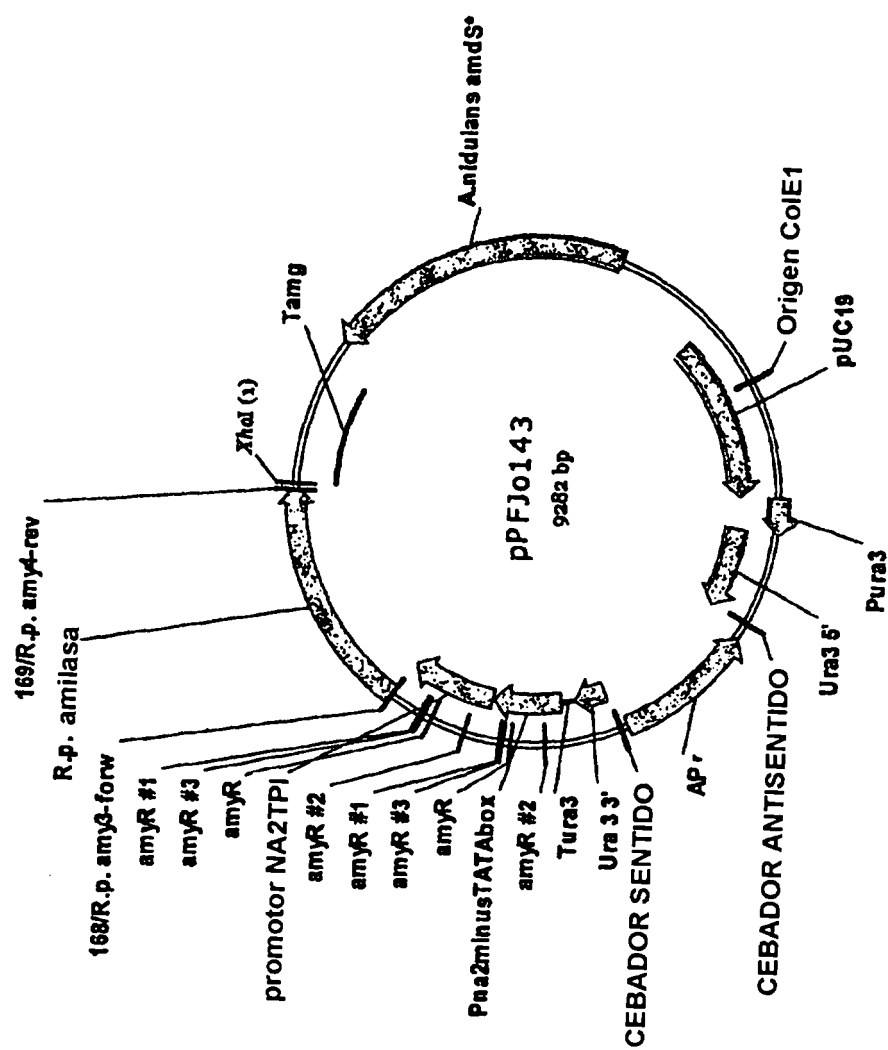


Figura 7

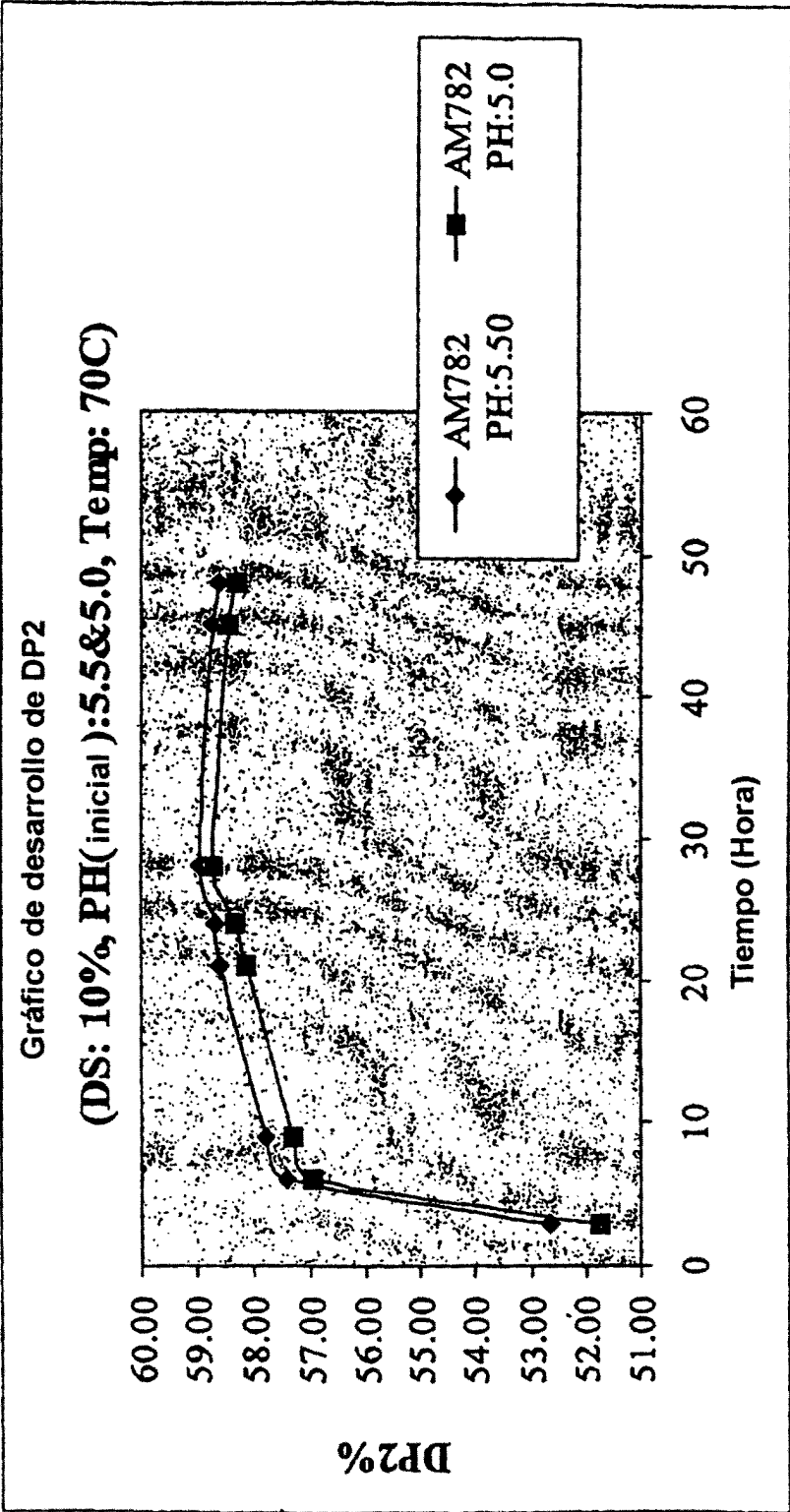


Figura 8

ES 2 278 210 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> Novozymes A/S Wu, Wenping Tang, Lan Duan, Junxin Johannesen, Pia Francke	
10	<120> Amilasas termoestables <130> 10348.000-DK <160> 6 <170> PatentIn version 3.1	
15	<210> 1 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador AM298-CDSF <400> 1	
25	tatcatgaaa ttcagcat	18
30	<210> 2 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador AM298-CDSR <400> 2	
40	agttcaaaat ggacaaagt	19
45	<210> 3 <211> 1438 <212> ADN <213> <i>Rhizomucor pusillus</i>	
50	<220> <221> CDS <222> (5)..(1417) <223> <220> <221> sig péptido	
55	<222> (5)..(68) <223> <220> <221> mat péptido	
60	<222> (68)..() <223>	
65		

ES 2 278 210 T3

<400> 3

	tatc atc aaa ttc agc atc tct ctc tcc gca gca att gta ctc ttc gcg	49
	Met Lys Phe Ser Ile Ser Leu Ser Ala Ala Ile Val Leu Phe Ala	
5	- -20 - -15 - -10 -	
	gcc gca aca agc ctt gca agc cct ttg ccc caa cag cag cga tat gcc	97
	Ala Ala Thr Ser Leu Ala Ser Pro Leu Pro Gln Gln Gln Arg Tyr Gly	
	-5 1 1 5 10	
10	aaa aga gca act tcc gat gac tgg aaa agc aag gcc att tat cag ctg	145
	Lys Arg Ala Thr Ser Asp Asp Trp Lys Ser Lys Ala Ile Tyr Gln Leu	
	15 20 25	
	ctt acc gat cga ttt gcc cgc gcc gat gac tca aca agc aac tgc tct	193
15	Ile Thr Asp Arg Phe Gly Arg Ala Asp Asp Ser Thr Ser Asn Cys Ser	
	30 35 40	
	aat tta tcc aac tac tgt ggt ggt acc tac gaa gcc att acg aag cat	241
	Asn Leu Ser Asn Tyr Cys Gly Gly Thr Tyr Glu Gly Ile Thr Lys His	
	45 50 55	
20	ctt gac tac att tcc ggt atg gcc ttt gat gct atc tgg ata tcc cca	289
	Leu Asp Tyr Ile Ser Gly Met Gly Phe Asp Ala Ile Trp Ile Ser Pro	
	60 65 70	
	att ccc aag aac tcc gat cga gcc tac cac gcc tac tgg gct aca gat	337
25	Ile Pro Lys Asn Ser Asp Gly Gly Tyr His Gly Tyr Trp Ala Thr Asp	
	75 80 85 90	
	ttc tac caa cta aac agc aac ttt ggt gat gaa tcc cag ctc aaa gcc	385
	Phe Tyr Gln Leu Asn Ser Asn Phe Gly Asp Glu Ser Gln Leu Lys Ala	
	95 100 105	
30	ctc atc cgc gcc gcc cat gaa cgt gat atg tat gtt atg ctt gat gtc	433
	Leu Ile Gln Ala Ala His Glu Arg Asp Met Tyr Val Met Leu Asp Val	
	110 115 120	
	gta gcc aat cat gca ggt ccc acc agc aat gcc tac tcc ggt tac aca	481
35	Val Ala Asn His Ala Gly Pro Thr Ser Asn Gly Tyr Ser Gly Tyr Thr	
	125 130 135	
	ttc gcc gat gca agt tta tat cat cct aaa tgc acc ata gat tac aat	529
	Phe Gly Asp Ala Ser Leu Tyr His Pro Lys Cys Thr Ile Asp Tyr Asn	
	140 145 150	
40	gat cag acg tct att gag caa tgc tgg gtt gct gac gag ttg cct gat	577
	Asp Gln Thr Ser Ile Glu Gln Cys Trp Val Ala Asp Glu Leu Pro Asp	
	155 160 165 170	
	att gac act gaa aat tct gac aac gtg gcc att ctc aac gac atc gtc	625
45	Ile Asp Thr Glu Asn Ser Asp Asn Val Ala Ile Leu Asn Asp Ile Val	
	175 180 185	
	tcc gcc tgg gtg cgt aac tat agc ttt gac gcc atc cgc att gat act	673
	Ser Gly Tyr Val Gly Asn Tyr Ser Phe Asp Gly Ile Arg Ile Asp Thr	
	190 195 200	
50	gtc aag cat att cgc aag gac ttt tgc aca gcc tac gca gaa gct gcc	721
	Val Lys His Ile Arg Lys Asp Phe Trp Thr Gly Tyr Ala Glu Ala Ala	
	205 210 215	
	gcc gta ttc gca acc gga gag gtc ttc aat ggt gat ccg gcc tac gtt	769
55	Gly Val Phe Ala Thr Gly Glu Val Phe Asn Gly Asp Pro Ala Tyr Val	
	220 225 230	
	gca cct tat caa aag tac ctg cca tct ctc atc aat tac cca atg tat	817
	Gly Pro Tyr Gln Lys Tyr Leu Pro Ser Leu Ile Asn Tyr Pro Met Tyr	
	235 240 245 250	
60	tac gct ttg aac gac gtc ttt gta tcc aaa agc aaa gga ttc agc cgc	865
	Tyr Ala Leu Asn Asp Val Phe Val Ser Lys Ser Lys Gly Phe Ser Arg	
	255 260 265	
	atc agc gaa atg cta gga tca aat cgc aat gcc ttt gag gat acc aac	913
65	Ile Ser Glu Met Leu Gly Ser Asn Arg Asn Ala Phe Glu Asp Thr Ser	
	270 275 280	

ES 2 278 210 T3

5 gta ctt aca acg ttt gta gac aac cat gac aat ccg cgc ttc ttg aac 961
 Val Leu Thr Thr Phe Val Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Phe Leu Asn
 285 290 295
 10 agt caa agc gac aag gct ctc ttc aag aac gct ctc aca tac gta ctg 1009
 Ser Gln Ser Asp Lys Ala Leu Phe Lys Asn Ala Leu Thr Tyr Val Leu
 300 305 310
 15 cta ggt gaa ggc atc cca att gtg tat tat ggt tct gag caa ggt ttc 1057
 Leu Gly Glu Gly Ile Pro Ile Val Tyr Tyr Gly Ser Glu Gln Gly Phe
 315 320 325
 20 agc gga gga ggc gat cct gct aac cgt gaa gtc ctg tgg acc acc aat 1105
 Ser Gly Gly Ala Asp Pro Ala Asn Arg Glu Val Leu Trp Thr Thr Asn
 335 340 345
 25 tat gat aca tcc agc gat ctc tac caa ttt atc aag ara gtc aac agt 1153
 Tyr Asp Thr Ser Ser Asp Leu Tyr Gln Phe Ile Lys Thr Val Asn Ser
 350 355 360
 30 gtc cgc atg aaa agc aac aag gcc gtc tac atg gat att tat gtt ggc 1201
 Val Arg Met Lys Ser Asn Lys Ala Val Tyr Met Asp Ile Tyr Val Gly
 365 370 375
 35 gac aat gct tac gcc ttc aag cac ggc gat gct ttc gtt gtt ctc aac 1249
 Asp Asn Ala Tyr Ala Phe Lys His Gly Asp Ala Leu Val Val Leu Asn
 380 385 390
 40 aac tat cga tca ggt tcc aca aac caa gtc agc ttc agc gtt agt ggt 1297
 Asn Tyr Gly Ser Gly Ser Thr Asn Gln Val Ser Phe Ser Val Ser Gly
 395 400 405 410
 45 aag ttc gat agc ggc gca agc ctc atg gat att gtc agt aac att acc 1315
 Lys Phe Asp Ser Gly Ala Ser Leu Met Asp Ile Val Ser Asn Ile Thr
 415 420 425
 50 acc acc ctg tcc tcc gat gga aca gtc act ttc aac ctt aaa gat gga 1393
 Thr Thr Val Ser Ser Asp Gly Thr Val Thr Phe Asn Leu Lys Asp Gly
 430 435 440
 55 ctt ccg gct atc ttc acc tct gct taactttgtc cattttgaac t 1438
 Leu Pro Ala Ile Phe Thr Ser Ala
 445 450

<210> 4

45 <211> 471

<212> PRT

<213> *Rhizomucor pusillus*

<400> 4

50 Met Lys Phe Ser Ile Ser Leu Ser Ala Ala Ile Val Leu Phe Ala Ala
 -20 -15 -10
 55 Ala Thr Ser Leu Ala Ser Pro Leu Pro Gln Gln Gln Arg Tyr Gly Lys
 -5 -1 1 5 10
 60 Arg Ala Thr Ser Asp Asp Lys Lys Ser Lys Ala Ile Tyr Gln Leu Leu
 15 20 25
 65 Thr Asp Arg Phe Gly Arg Ala Asp Asp Ser Thr Ser Asn Cys Ser Asn
 30 35 40

ES 2 278 210 T3

5 Leu Ser Asn Tyr Cys Gly Gly Thr Tyr Glu Gly Ile Thr Lys His Leu
 45 50 55
 Asp Tyr Ile Ser Gly Met Gly Phe Asp Ala Ile Trp Ile Ser Pro Ile
 60 65 70 75
 10 Pro Lys Asn Ser Asp Gly Gly Tyr His Gly Tyr Trp Ala Thr Asp Phe
 80 85 90
 15 Tyr Gln Leu Asn Ser Asn Phe Gly Asp Glu Ser Gln Leu Lys Ala Leu
 95 100 105
 Ile Gln Ala Ala His Glu Arg Asp Met Tyr Val Met Leu Asp Val Val
 110 115 120
 20 Ala Asn His Ala Gly Pro Thr Ser Asn Gly Tyr Ser Gly Tyr Thr Phe
 125 130 135
 25 Gly Asp Ala Ser Leu Tyr His Pro Lys Cys Thr Ile Asp Tyr Asn Asp
 140 145 150 155
 30 Gln Thr Ser Ile Glu Gln Cys Trp Val Ala Asp Glu Leu Pro Asp Ile
 160 165 170
 Asp Thr Glu Asn Ser Asp Asn Val Ala Ile Leu Asn Asp Ile Val Ser
 175 180 185
 35 Gly Trp Val Gly Asn Tyr Ser Phe Asp Gly Ile Arg Ile Asp Thr Val
 190 195 200
 40 Lys His Ile Arg Lys Asp Phe Trp Thr Gly Tyr Ala Glu Ala Ala Gly
 205 210 215
 45 Val Phe Ala Thr Gly Glu Val Phe Asn Gly Asp Pro Ala Tyr Val Gly
 220 225 230 235
 Pro Tyr Gln Lys Tyr Leu Pro Ser Leu Ile Asn Tyr Pro Met Tyr Tyr
 240 245 250
 50 Ala Leu Asn Asp Val Phe Val Ser Lys Ser Lys Gly Phe Ser Arg Ile
 255 260 265
 55 Ser Glu Met Leu Gly Ser Asn Arg Asn Ala Phe Glu Asp Thr Ser Val
 270 275 280
 60 Leu Thr Thr Phe Val Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Phe Leu Asn Ser
 285 290 295
 65 Gln Ser Asp Lys Ala Leu Phe Lys Asn Ala Leu Thr Tyr Val Leu Leu
 300 305 310 315

ES 2 278 210 T3

Gly Glu Gly Ile Pro Ile Val Tyr Tyr Gly Ser Glu Gln Gly Phe Ser
 320 325 330
 5 Gly Gly Ala Asp Pro Ala Asn Arg Glu Val Leu Trp Thr Thr Asn Tyr
 335 340 345
 10 Asp Thr Ser Ser Asp Leu Tyr Gln Phe Ile Lys Thr Val Asn Ser Val
 350 355 360
 15 Arg Met Lys Ser Asn Lys Ala Val Tyr Met Asp Ile Tyr Val Gly Asp
 365 370 375
 20 Asn Ala Tyr Ala Phe Lys His Gly Asp Ala Leu Val Val Leu Asn Asn
 380 385 390 395
 25 Tyr Gly Ser Gly Ser Thr Asn Gln Val Ser Phe Ser Val Ser Gly Lys
 400 405 410
 30 Phe Asp Ser Gly Ala Ser Leu Met Asp Ile Val Ser Asn Ile Thr Thr
 415 420 425
 35 Thr Val Ser Ser Asp Gly Thr Val Thr Phe Asn Leu Lys Asp Gly Leu
 430 435 440
 40 Pro Ala Ile Phe Thr Ser Ala
 445 450

<210> 5

<211> 32

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador 168/R.p. amy3-forw

<400> 5

gaagatctac catgaaattc agcatctctc tc

32

<210> 6

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador 169/R.p. amy4-rev

<400> 6

ccgctcgagt taagcagagg tgaagatagc

30