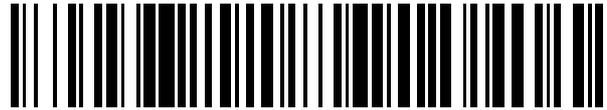


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 425 351**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/16** (2006.01)

**C12N 9/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2004 E 04778502 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013 EP 1675941**

54 Título: **Polipéptidos que tienen actividad de alfa-amilasa y polinucleótidos que codifican los mismos**

30 Prioridad:

**25.06.2003 US 482589 P**  
**25.06.2003 DK 200300949**  
**24.10.2003 DK 200301568**  
**27.10.2003 US 514854 P**  
**12.11.2003 US 519554 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.10.2013**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (50.0%)**  
**Krogshøjvej 36**  
**2880 Bagsvaerd, DK y**  
**NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HOFF, TINE;**  
**ANDERSEN, CARSTEN;**  
**SPENDLER, TINA;**  
**PEDERSEN, SVEN;**  
**VIKSO-NIELSEN, ANDERS;**  
**SCHAFFER, THOMAS y**  
**LIU, JIYIN**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 425 351 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Polipéptidos que tienen actividad de alfa-amilasa y polinucleótidos que codifican los mismos

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a polipéptidos que tienen actividad de alfa-amilasa y polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos que codifica para los polipéptidos. La invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores y células huésped que comprenden los constructos de ácidos nucleicos al igual que a métodos para producir y usar los polipéptidos.

Antecedentes de la invención

15 [0002] Durante años, las enzimas de alfa-amilasa se han usado para una variedad de fines diferentes, los más importantes de ellos son la licuefacción de almidón, el desencolado textil, la modificación de almidón en la industria del papel y de la pulpa y la elaboración de cerveza y el horneado. Otro uso de las alfa-amilasas es la eliminación de manchas amiláceas durante el lavado con un detergente de pH alcalino.

20 [0003] La WO2002/068589 divulga polipéptidos que tienen actividad de alfa-amilasa y polinucleótidos que codifican las alfa-amilasas. Además, también se proporciona el diseño de nuevas alfa-amilasas y métodos de uso de las mismas. Las alfa-amilasas aumentan su actividad y su estabilidad en pH ácido y alcalino y en temperatura aumentada. Es un objeto de la presente invención proporcionar alfa-amilasas con un rendimiento adecuado para aplicaciones específicas.

Resumen de la invención

25

[0004] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido con actividad de alfa-amilasa y afinidad de enlace a carbohidratos, donde dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99% de identidad con los aminoácidos 1 a 586 de SEQ ID N°: 2.

30 [0005] En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad con la secuencia de los nucleótidos 100 a 1857 de SEQ ID N°: 1 y codifica para el polipéptido de la invención.

35 [0006] En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para el polipéptido de la invención, operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped adecuado.

[0007] En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos de la invención.

40

[0008] En un quinto aspecto, la presente invención se refiere a una célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos de la invención.

45 [0009] En un sexto aspecto, la presente invención se refiere al uso del polipéptido de la invención o una composición de la invención para tratar tejidos, telas, hilo o prendas, por ejemplo, para el desencolado de tejidos, telas, hilos o prendas.

[0010] La invención también se refiere al uso de un polipéptido de la invención para licuefacción de almidón y en la producción de etanol.

50 [0011] Otros aspectos de la presente invención se harán evidentes a partir de la descripción siguiente y de las reivindicaciones anexas.

Breve descripción de las figuras

55

[0012]

La figura 1 muestra la consistencia de la miga de pan durante 21 días de almacenamiento con y sin AMY1048 de la invención y/o alfa-amilasa maltogénica.

60 La figura 2 muestra la elasticidad de la miga de pan durante 21 días de almacenamiento con y sin AMY1048 de la invención y/o alfa-amilasa maltogénica.

65 La figura 3 muestra el efecto de AMY1048 de la invención en la cantidad de agua libre con y sin AMY1048 de la invención y/o alfa-amilasa maltogénica. La clasificación de la pequeña evaluación sensorial se da en círculos junto a cada curva. La clasificación máxima se da al pan más húmedo.

## Definiciones

[0013] Antes de discutir la presente invención con más detalle, se definirán primero los siguientes términos y usos:

[0014] Polipéptido substancialmente puro: en el presente contexto, el término "polipéptido substancialmente puro" se refiere a una preparación polipeptídica que contiene como mucho 10% en peso de otro material polipeptídico con el cual está originalmente asociado (se prefieren porcentajes inferiores de otro material polipeptídico, por ejemplo, como mucho 8% en peso, como mucho 6% en peso, como mucho 5% en peso, como mucho 4%, como mucho 3% en peso, como mucho 2% en peso, como mucho 1% en peso y como mucho 0,5% por peso). Así, se prefiere que el polipéptido substancialmente puro sea al menos 92% puro, es decir, que el polipéptido constituya al menos 92% en peso del material polipeptídico total presente en la preparación, y se prefieren porcentajes más altos, tales como al menos 94% puro, al menos 95% puro, al menos 96% puro, al menos 96% puro, al menos 97% puro, al menos 98% puro, al menos 99% y como mucho 99,5% puro. Los polipéptidos descritos en la presente están preferiblemente en una forma substancialmente pura. En particular, se prefiere que los polipéptidos descritos en la presente estén en "forma esencialmente pura", es decir, que la preparación polipeptídica esté esencialmente libre de otro material polipeptídico con el cual esté originalmente asociado. Esto se puede conseguir, por ejemplo, por la preparación del polipéptido mediante métodos recombinantes bien conocidos. Aquí, el término "polipéptido substancialmente puro" es sinónimo de los términos "polipéptido aislado" y "polipéptido en forma aislada".

[0015] Actividad de alfa-amilasa: las alfa-amilasas (alfa 1,4-alfa-D-glucano 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 ramificados y lineales. Para fines de la presente invención, la actividad de alfa-amilasa se determina usando el ensayo de PHADEBAS® o el ensayo pNPG7, descritos más adelante en la sección "Materiales y métodos".

[0016] Los polipéptidos de la presente invención deberían tener preferiblemente al menos 20% de la actividad de alfa-amilasa del polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos en la posición 1 a 586 de SEQ ID N°: 2.

[0017] En una forma de realización preferida particular, los polipéptidos deberían tener al menos 40%, tal como al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, tal como al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, tal como al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, tal como aproximadamente o al menos 100% de la actividad de alfa-amilasa del polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos en la posición 1 a 586 de SEQ ID N°: 2.

[0018] Identidad: en el presente contexto, la homología entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad".

[0019] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el programa FASTA incluido en la versión 2.0x del paquete de programa FASTA (véase 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). La matriz de puntuación usada fue BLOSUM50, la penalización de espacio fue -12 y la penalización de extensión del espacio fue -2.

[0020] El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el mismo algoritmo y paquete de software que se ha descrito anteriormente. La matriz de puntuación usada fue la matriz de identidad, la penalización de espacio fue -16 y la penalización de extensión del espacio fue -4.

[0021] Fragmento: cuando se usa en este caso, un "fragmento" de SEQ ID N°: 2 son los polipéptidos que tienen uno o más aminoácidos eliminados del amino y/o carboxilo terminal de esta secuencia de aminoácidos.

[0022] Variante alélica: en el presente contexto, el término "variante alélica" denota cualesquiera dos o más formas alternativas 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 las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0023] Polinucleótido substancialmente puro: el término "polinucleótido substancialmente puro", como se utiliza en este caso, se refiere a una preparación polinucleótida donde el polinucleótido ha sido eliminado de su ambiente genético natural y está así libre de otras secuencias de codificación indeseadas o extrañas y está en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteína creada genéticamente. Así, un polinucleótido substancialmente puro contiene como mucho 10% en peso de otro material polinucleótido con el cual está originalmente asociado (se prefieren porcentajes inferiores de otro material polinucleótido, por ejemplo, como mucho 8% en peso, como mucho 6% en peso, como mucho 5% en peso, como mucho 4%, como mucho 3% en peso, como mucho 2% en peso, como mucho 1% en peso y como mucho 0,5% en peso). Un polinucleótido substancialmente puro puede, no obstante, incluir regiones 5' y 3' de origen natural no traducidas, tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido

- 5 substancialmente puro sea al menos 92% puro, es decir, que el polinucleótido constituya al menos 92% en peso del material de polinucleótido total presente en la preparación, y se prefieren porcentajes más altos tales como al menos 94% puro, al menos 95% puro, al menos 96% puro, al menos 96% puro, al menos 97% puro, al menos 98% puro, al menos 99% y como mucho 99,5% puro. Los polinucleótidos descritos en la presente están preferiblemente en una forma substancialmente pura. En particular, se prefiere que los polinucleótidos descritos en la presente estén en "forma esencialmente pura", es decir, que la preparación polinucleótida esté esencialmente libre de otro material polinucleótido con el cual esté originalmente asociado. Aquí, el término "polinucleótido substancialmente puro" es sinónimo de los términos "polinucleótido aislado" y "polinucleótido en forma aislada".
- 10 [0024] Modificación(es): en el contexto de la presente invención, el término "modificación(es)" se refiere a cualquier modificación química del polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos en la posición 1 a 586 o 485 a 586 de SEQ ID N°: 2, al igual que a la manipulación genética del DNA que codifica los polipéptidos anteriormente mencionados. La modificación(es) puede ser sustitución(es) de la cadena(s) lateral de aminoácidos, sustitución(es), delección(es) y/o inserciones(s) en el aminoácido(s) de interés.
- 15 [0025] Variante artificial: cuando se usa en este caso, el término "variante artificial" se refiere a un polipéptido con actividad de alfa-amilasa y/o afinidad de enlace de carbohidratos, que ha sido producido por un organismo que expresa un gen modificado en comparación con SEQ ID N°: 1. El gen modificado, a partir del cual se produce dicha variante cuando se expresa en un huésped adecuado, se obtiene por intervención humana mediante la modificación de la secuencia de nucleótidos descrita en SEQ ID N°: 1.
- 20 [0026] cDNA: el término "cDNA", cuando se usa en el presente contexto, se destina a cubrir una molécula de DNA que se puede preparar por transcripción inversa de una molécula de mRNA empalmado, maduro, derivada de una célula eucariota. El cDNA carece de las secuencias de intrón que están normalmente presentes en el DNA genómico correspondiente. La transcripción inicial del RNA primario es un precursor del mRNA y pasa por una serie de eventos de procesamiento antes de aparecer como mRNA empalmado maduro. Estos eventos incluyen la eliminación de secuencias de intrón por un proceso llamado empalme. Cuando el cDNA es derivado de mRNA, éste, por lo tanto, carece de secuencias de intrón.
- 25 [0027] Constructo de ácidos nucleicos: cuando se usa en este caso, el término "constructo de ácidos nucleicos" se refiere a una molécula de ácido nucleico, uni- o bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o que ha sido modificada para contener segmentos de ácidos nucleicos de forma que de otra manera no existiría en la naturaleza. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término "cassette de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.
- 30 [0028] Secuencia de control: el término "secuencias de control" se define en la presente para incluir 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 foránea de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, 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 con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la ligadura de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.
- 35 [0029] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" se define en este caso como una configuración en la que una secuencia de control está apropiadamente colocada en una posición relativa a la secuencia codificante de la secuencia de DNA, de manera que la secuencia de control dirige la expresión de un polipéptido.
- 40 [0030] Secuencia codificante: cuando usada aquí, el término "secuencia codificante" se destina a cubrir una secuencia de nucleótidos que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los límites de la secuencia codificante están generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que comienza normalmente con el codón de inicio ATG. La secuencia codificante incluye típicamente DNA, cDNA y secuencias de nucleótidos recombinantes.
- 45 [0031] Expresión: en el presente contexto, el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido, incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.
- 50 [0032] Vector de expresión: en el presente contexto, el término "vector de expresión" cubre una molécula de DNA, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de la invención y que está operativamente enlazada con segmentos adicionales que proporcionan su transcripción.
- 55 [0033] Célula huésped: el término "célula huésped", como se utiliza en este caso, incluye cualquier tipo de célula que sea susceptible de transformación con un constructo de ácidos nucleicos.
- 60
- 65

[0034] Los términos "sonda de polinucleótidos", "hibridación", al igual que las diferentes condiciones de astringencia se definen en la sección titulada "Polipéptidos que tienen actividad de alfa-amilasa y/o afinidad de enlace de carbohidratos".

[0035] El término "afinidad de enlace" se refiere a la capacidad del dominio para enlazar con un sustrato en cuestión, en particular almidón. La "afinidad de enlace" puede ser determinada usando el método descrito en la sección "Materiales y método" que aparece más adelante.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos que tienen actividad de alfa-amilasa y/o afinidad de enlace de carbohidratos

[0036] En una primera forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen actividad de alfa-amilasa y afinidad de enlace de carbohidratos, donde los polipéptidos comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99% de identidad con los aminoácidos 1 a 586 de SEQ ID N°: 2.

[0037] En una forma de realización preferida, el polipéptido de la invención comprende los aminoácidos mostrados en la posición 1 a 586 de SEQ ID N°:2.

[0038] El término "polipéptido progenitor", "proteína progenitora", "enzima progenitora", "enzima estándar" o simplemente "progenitor" se refieren al polipéptido en el que se basó la variante. Este término también se refiere al polipéptido con el que se compara y alinea una variante. El progenitor puede ser un polipéptido (tipo salvaje) de origen natural, o puede ser a su vez incluso un variante del mismo, preparado por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, la proteína progenitora puede ser una variante de un polipéptido de origen natural que ha sido modificado o alterado en la secuencia de aminoácidos. Un progenitor también puede ser una variante alélica que es cualquiera de las dos o más formas alternativas 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 las 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.

[0039] En una forma de realización interesante, la secuencia de aminoácidos difiere en como mucho cinco aminoácidos (p. ej., en cinco aminoácidos), tal como en como mucho cuatro aminoácidos (p. ej., en cuatro aminoácidos), por ejemplo, en como mucho tres aminoácidos (p. ej., en tres aminoácidos) de los aminoácidos en la posición 1 a 586 de SEQ ID N°: 2.

[0040] En una forma de realización interesante particular, la secuencia de aminoácidos difiere en como mucho dos aminoácidos (p. ej., en dos aminoácidos), tal como en un aminoácido de los aminoácidos en la posición 1 a 586 de SEQ ID N°: 2.

[0041] El polipéptido de la invención puede ser una alfa-amilasa de tipo salvaje identificada y aislada a partir de una fuente natural. Tales polipéptidos de tipo salvaje pueden ser específicamente seleccionados por técnicas estándar conocidas en la técnica. Además, el polipéptido de la invención se puede preparar por la técnica de redistribución de DNA, tal como se describe en J.E. Ness *et al.* Nature Biotechnology 17, 893-896 (1999). Por otra parte, el polipéptido de la invención puede ser una variante artificial que comprende, preferiblemente consiste en, una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución, eliminación y/o inserción de un aminoácido en la posición 1 a 586 de SEQ ID N°: 2. Tales variantes artificiales se pueden construir por técnicas estándar conocidas en la técnica, tal como por mutagénesis dirigida al sitio/aleatoria del polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como los aminoácidos en la posición 1 a 586 de SEQ ID N°: 2.

[0042] Los cambios en los aminoácidos (en la variante artificial al igual que en los polipéptidos de tipo salvaje) pueden ser de naturaleza menor, esto es, sustituciones de aminoácidos conservadoras que no afecten significativamente al pliegue y/o la actividad de la proteína; pequeñas deleciones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino- o carboxilo-terminales, tales como un residuo de metionina amino-terminal, un péptido enlazador pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos o una extensión pequeña que facilite la purificación mediante el cambio de la carga de red u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0043] Ejemplos de sustituciones conservadoras están en el grupo de los aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina, valina y metionina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina y treonina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en H. Neurath y R.L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, New York. Los cambios que se producen más frecuentemente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly al igual que éstos a la inversa.

[0044] En una forma de realización interesante de la invención, los cambios en los aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos se alteran. Por ejemplo, se pueden realizar cambios en los aminoácidos que mejoren la termoestabilidad del polipéptido, que alteren la especificidad del sustrato, que cambien el pH óptimo y similares.

5

Fuentes para polipéptidos que tienen actividad de alfa-amilasa y/o afinidad de enlace de carbohidratos

[0045] Se puede obtener un polipéptido de la presente invención a partir de microorganismos de cualquier género. Para fines de la presente invención, el término "obtenido a partir de", como se utiliza en este caso, se refiere a que el polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos es producido por una célula en la que la secuencia de nucleótidos está naturalmente presente o en la que la secuencia de nucleótidos ha sido insertada. En una forma de realización preferida, el polipéptido es segregado extracelularmente.

10

[0046] Un polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano gram positivo, tal como un polipéptido de *Bacillus*, por ejemplo, un *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus flavothermus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o polipéptido de *Bacillus thuringiensis*; o un polipéptido de *Streptomyces*, por ejemplo, un polipéptido de *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; o un polipéptido bacteriano gram negativo, por ejemplo, un polipéptido de la especie *E. coli* o *Pseudomonas*.

15

20

[0047] En una forma de realización más preferida, el polipéptido es un polipéptido de la especie *Bacillus*. Se entenderá que para las especies anteriormente mencionadas, la invención abarca tanto los estados perfectos como los imperfectos y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especie por el que se conozcan. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes apropiados.

25

[0048] Además, tales polipéptidos se pueden identificar y obtener a partir de otras fuentes, incluyendo microorganismos aislados naturales (p. ej., tierra, abonos, agua, etc.) usando las sondas anteriormente mencionadas. Las técnicas para aislar microorganismos de hábitats naturales se conocen en la técnica. La secuencia de nucleótidos se puede entonces derivar por la selección de forma similar de una genoteca de cDNA o genómica de otro microorganismo. Una vez que se ha detectado una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido con la sonda o sondas, la secuencia se puede aislar o clonar utilizando técnicas que son conocidas por los técnicos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989).

30

[0049] Los polipéptidos codificados por secuencias de nucleótidos de la presente invención también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos de fusión divisibles en los que otro polipéptido se fusiona al N-término o el C-término del polipéptido o fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado se produce por fusión de una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) que codifica otro polipéptido en una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica e incluyen ligamiento de las secuencias de codificación que codifican los polipéptidos, de modo que estén en el marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo control del mismo promotor o promotores y terminador.

35

40

Polinucleótidos y secuencias de nucleótidos

[0050] La presente invención también se refiere a polinucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de la invención. En particular, la presente invención se refiere a polinucleótidos que consisten en una secuencia de nucleótidos que codifica para un polipéptido de la invención. En una forma de realización preferida, la secuencia de nucleótidos es la región de codificación del polipéptido maduro de SEQ ID N°: 1.

45

[0051] La presente invención también abarca polinucleótidos que tienen, preferiblemente que consisten en secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°: 2, o el polipéptido maduro del mismo, que difiere de la SEQ ID N°: 1, en virtud de la degeneración del código genético.

50

[0052] La presente invención también se refiere a polinucleótidos que tienen, preferiblemente que consisten en una subsecuencia de SEQ ID N°: 1, que codifica fragmentos de SEQ ID N°: 2, que tiene actividad de alfa-amilasa y actividad de enlace de carbohidratos. Una subsecuencia de SEQ ID N°: 1, es una secuencia de nucleótidos abarcada por SEQ ID N°: 1, excepto uno o más nucleótidos del final 5' y/o 3' que han sido eliminados.

55

[0053] La presente invención también se refiere a polinucleótidos que tienen, preferiblemente que consisten en una secuencia de nucleótidos modificada que comprende al menos una modificación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEQ ID N°: 1, y donde la secuencia de nucleótidos modificada codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos en la posición 1 a 586 de SEQ ID N°: 2.

60

[0054] Las técnicas usadas para aislar o clonar una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen el aislamiento a partir de DNA genómico, preparación de cDNA o una combinación de las mismas. Esto se describirá con más detalle más adelante.

5 DNA que codifica una alfa-amilasa de la invención

[0055] La presente invención también se refiere a un polinucleótido que tiene, preferiblemente que consiste en, una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad con los nucleótidos 100 a 1857 de SEQ ID N°: 1.

10 [0056] El grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina como se ha descrito previamente (véase la sección titulada "Definiciones").

Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos comprende los nucleótidos 100 a 1857 de SEQ ID N°: 1.

15 [0057] La modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de un polipéptido, que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una sustitución, delección y/o inserción en comparación con los aminoácidos en la posición 1 a 586 de SEQ ID N°: 2.

[0058] Estas variantes artificiales pueden diferir en alguna forma creada genéticamente del polipéptido aislado a partir de su fuente nativa, por ejemplo, variantes que difieren en la actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo o similar.

20 [0059] Será evidente para los expertos en la técnica que tales modificaciones pueden hacerse fuera de las regiones críticas para la función de la molécula y seguir dando como resultado un polipéptido activo. Los residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos de la invención y, por lo tanto, preferiblemente no sujetos a modificación, tal como sustitución, se pueden identificar según los procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (véase, por ejemplo, Cunningham y Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En la última técnica, las mutaciones se introducen en cada residuo positivamente cargado en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de alfa-amilasa y/o afinidad de enlace de carbohidratos para identificar residuos de aminoácidos que sean críticos para la actividad o afinidad de la molécula. Los sitios de interacción enzima-sustrato también pueden determinarse por análisis de la estructura tridimensional como determinan técnicas tales como el análisis de resonancia magnética nuclear, marcado por cristalografía o fotoafinidad (véase, por ejemplo, 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).

35 [0060] Por otra parte, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención se puede modificar por 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 de codón del organismo huésped destinado a la producción de la enzima.

40 [0061] La introducción de una mutación en la secuencia de nucleótidos para intercambiar un nucleótido por otro nucleótido se puede realizar por mutagénesis dirigida al sitio usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Particularmente útil es el procedimiento que utiliza un vector de DNA bicatenario superenrollado con un inserto 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 los ciclos de temperatura mediante polimerasa de DNA *Pfu*. Por incorporación de los cebadores, se genera un plásmido que contiene muescas escalonadas. Después del ciclo de temperatura, el producto se trata con *DpnI* que es específico para que el DNA hemimetilado y metilado asimile el molde de DNA parental y seleccione DNA sintetizado que contiene mutación. También se pueden usar otros procedimientos conocidos en la técnica. Para una descripción general de sustitución de nucleótidos, véase, por ejemplo, Ford *et al.*, 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

50 Clonación de una secuencia de DNA que codifica una alfa-amilasa de la invención

[0062] La clonación de las secuencias de nucleótidos de la presente invención a partir de tal DNA genómico se puede efectuar, por ejemplo, usando la bien conocida reacción en cadena de polimerasa (PCR) o la selección de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de DNA clonados con características estructurales compartidas. Véase, por ejemplo, Innis *et al.*, 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York. Se pueden utilizar otros procedimientos de 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). La secuencia de nucleótidos se puede clonar a partir de una cepa de *Bacillus* u otro organismo relacionado y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especies de la región de codificación del polipéptido de la secuencia de nucleótidos.

60 [0063] La secuencia de nucleótidos se puede obtener por procedimientos de clonación estándar usados en ingeniería genética para recolocar la secuencia de nucleótidos desde su ubicación natural hasta un sitio diferente donde serán reproducidas. Los procedimientos de clonación pueden implicar escisión y aislamiento de un fragmento deseado que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, inserción del fragmento en una molécula de vector e incorporación del vector recombinante en una célula huésped donde se replicarán múltiples copias o clones de la

secuencia de nucleótidos. La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico, de cDNA, de RNA, semisintético, sintético o cualquier combinación de los mismos.

[0064] Se puede construir una biblioteca de cDNA y/o DNA genómico usando DNA cromosómico o RNA mensajero a partir del organismo que produce una alfa-amilasa. Luego, si la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa es conocida, se pueden sintetizar sondas de oligonucleótidos marcadas homólogas y usar para identificar clones que codifican alfa-amilasa de una genoteca genómica obtenida a partir del organismo en cuestión. Alternativamente, una sonda de oligonucleótidos marcada que contiene secuencias homólogas de un gen de alfa-amilasa conocido podrían usarse como una sonda para identificar clones que codifican alfa-amilasa, usando condiciones de hibridación y lavado de astringencia inferior.

[0065] Otro método para identificar clones que codifican alfa-amilasa implicaría la inserción de fragmentos de DNA genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformando bacterias negativas de alfa-amilasa con la biblioteca de DNA genómico resultante, y poniendo luego en placas las bacterias transformadas sobre un sustrato con agar para alfa-amilasa, permitiendo así que los clones que expresan la alfa-amilasa sean identificados.

[0066] Alternativamente, la secuencia de DNA que codifica la enzima se puede preparar sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de fosforamidita descrito por S.L. Beaucage y M.H. Caruters, *etrahedron Letters* 22 1981, páginas. 1859-1869, o el método descrito por Matthes *et al.*, *The EMBO J.* 3, 1984, págs. 801-805. En el método de fosforamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador de DNA automático, se purifican, se anillan, ligan y clonan en vectores apropiados.

[0067] Finalmente, la secuencia de DNA puede ser de origen mezclado sintético y genómico, origen mezclado sintético y de cDNA u origen mezclado genómico y de cDNA, preparado por ligamiento de fragmentos de origen sintético, genómico o de cDNA (según sea apropiado, los fragmentos correspondiente a varias partes de la secuencia de DNA entera), conforme a técnicas estándar. La secuencia de DNA también se puede preparar por reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo, como se describe en la US 4 683 202 o en R.K. Saiki *et al.*, *Science* 239, 1988, págs. 487-491.

#### Expresión de alfa-amilasa

[0068] Según la invención, una secuencia de DNA que codifica la alfa-amilasa producida como se ha descrito anteriormente, o por cualquier método alternativo conocido en la técnica, se puede expresar, en forma de enzima, usando un vector de expresión que incluye típicamente secuencias de control que codifican un promotor, operador, sitio de unión al ribosoma, señal de iniciación de la traducción y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores.

#### Constructos de ácidos nucleicos

[0069] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos de la presente invención operativamente enlazados a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0070] Una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención se puede manipular en una variedad de formas para proporcionar expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia de nucleótidos antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria, dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias de nucleótidos utilizando métodos de DNA recombinante son bien conocidas en la técnica.

#### Secuencia de control

[0071] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, una secuencia de nucleótidos que es reconocida por una célula huésped para la expresión de la secuencia de nucleótidos. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcionales, que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección, incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y se puede obtener a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares, ya sean heterólogos u homólogos de la célula huésped.

[0072] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención, especialmente en una célula huésped bacteriana, son los promotores obtenidos del operón lac de *E. coli*, del gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), el gen de levansacarasa de *Bacillus subtilis* (*sacB*), el gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), el gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), el gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), el gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (*penP*), los genes *xyIA* y *xyIB* de *Bacillus subtilis* y el gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 3727-3731), al igual que el promotor tac (DeBoer *et al.*, 1983, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 80: 21-25). Se describen otros promotores en "Useful proteins from

recombinant bacteria" en Scientific American, 1980, 242: 74-94; y en Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989.

[0073] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son los promotores obtenidos a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra (*glaA*) de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), al igual que el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*) y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

[0074] En un huésped de levadura, los promotores útiles se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP), y 3-fosfogliceratoquinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, Yeast 8: 423-488.

[0075] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está operativamente enlazada al 3' terminal de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

#### Terminadores

[0076] Los terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0077] Los terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para las células huésped de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, Yeast 8: 423-488.

[0078] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un mRNA que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está operativamente enlazada al 5' terminal de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

#### Secuencia líder

[0079] Las secuencias líder preferidas para las células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0080] Las secuencias líder adecuadas para las células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

[0081] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al 3' terminal de la secuencia de nucleótidos y que, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al mRNA transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

#### Secuencias de poliadenilación

[0082] Las secuencias de poliadenilación preferidas para las células huésped fúngicas filamentosas se obtienen 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*.

[0083] Las secuencias de poliadenilación útiles para las células huésped de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, Molecular Cellular Biology 15: 5983-5990.

[0084] La secuencia de control también puede ser una región codificante del péptido señal que codifica para una secuencia de aminoácidos enlazada al amino terminal de un polipéptido y que dirige el polipéptido codificado en la ruta secretora de la célula. El 5' final de la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos puede contener

intrínsecamente una región codificante del péptido señal naturalmente enlazado en el marco de lectura de traducción con el segmento de la región de codificación que codifica el polipéptido segregado. Alternativamente, el 5' final de la secuencia codificante puede contener una región codificante del péptido señal que sea foránea a la secuencia codificante. La región codificante del péptido señal foráneo puede ser necesaria donde la secuencia codificante no contenga naturalmente una región codificante del péptido señal. Alternativamente, la región codificante del péptido señal foráneo puede simplemente reemplazar la región codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. No obstante, cualquier región codificante del péptido señal que dirija el polipéptido expresado en la ruta secretora de una célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

5 [0085] La región codificante del péptido señal puede ser los nucleótidos 1 a 99 de SEQ ID N°: 1 que codifica los aminoácidos -33 a -1 de SEQ ID N°: 2.

#### Péptido señal

15 [0086] Las regiones codificantes del péptido señal eficientes para las células huésped bacterianas son las regiones codificantes 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 señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.

20 [0087] Las regiones codificantes del péptido señal eficientes para las células huésped fúngicas filamentosas son las regiones codificantes 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 *Humicola lanuginosa*.

25 [0088] Los péptidos señal útiles para las células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras regiones codificantes del péptido señal útiles son descritas por Romanos *et al.*, 1992, Yeast 8: 423-488.

30 [0089] La secuencia de control también puede ser una región codificante del propéptido que codifica para una secuencia de aminoácidos situada en el amino terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo maduro por escisión autocatalítica o catalítica del propéptido del propolipéptido. La región codificante del propéptido se puede obtener a partir de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (*aprE*), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (*nprT*), alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

#### Vectores de expresión

40 [0090] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden el constructo de ácidos nucleicos de la invención. Las diferentes secuencias de nucleótidos y de control anteriormente descritas se pueden unir para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipeptídico en tales sitios. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos de la presente invención se puede expresar por inserción de la secuencia de nucleótidos o un constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector, de modo que la secuencia codificante está operativamente enlazada a las secuencias de control apropiadas para la expresión.

45 [0091] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus) que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de DNA recombinante y puede producir la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector debe ser introducido. Los vectores pueden ser plásmidos lineales o circulares cerrados.

50 [0092] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación depende de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial.

55 [0093] El vector puede contener cualquier medio para garantizar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser un vector que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica con el cromosoma o cromosomas en los que se ha integrado. Además, se puede utilizar un único vector o plásmido o dos o varios vectores o plásmidos que juntos contienen el DNA total que se ha de introducir en el genoma de la célula huésped o un transposón.

60 [0094] Los vectores de la presente invención contienen preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten una selección fácil 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.

Marcadores seleccionables

5 [0095] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis* o los marcadores que confieren resistencia antibiótica, tal como resistencia a ampicilina, canamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Los marcadores adecuados para las células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3. Los marcadores seleccionables para su uso en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hygB* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa), *trpC* (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos.

10 [0096] Para su uso en una célula de *Aspergillus* se prefieren los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

15 [0097] Los vectores de la presente invención contienen preferiblemente un elemento o elementos que permiten la integración estable del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

20 [0098] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede contar con 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. Alternativamente, 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 se integre en el genoma de la célula huésped en una ubicación o ubicaciones precisas en el cromosoma o cromosomas. Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener preferiblemente un número suficiente de nucleótidos, tal como de 100 a 1500 pares de bases, preferiblemente de 400 a 1500 pares de bases y, de la forma más preferible, de 800 a 1500 pares de bases, que son altamente homólogos de la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga de la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos codificantes o no codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

Orígenes de replicación

35 [0099] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permite que el vector 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 $\beta$ 1, que permiten la replicación en *Bacillus*. Ejemplos de orígenes de replicación para su uso en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3 y la combinación de ARS4 y CEN6. El origen de replicación puede ser un origen que tiene una mutación que hace que su funcionamiento sea termosensible en la célula huésped (véase, por ejemplo, Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1433).

45 [0100] Más de una copia de una secuencia de nucleótidos de la presente invención se puede insertar en la célula huésped para aumentar la producción del producto génico. Se puede obtener un aumento en el número de copias de la secuencia de nucleótidos integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con la secuencia de nucleótidos donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable y, de este modo, copias adicionales de la secuencia de nucleótidos, se pueden seleccionar por cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

50 [0101] Los procedimientos usados para enlazar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son bien conocidos por un experto en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989).

55 Células huésped

[0102] La presente invención también se refiere a la recombinación de una célula huésped que comprende el constructo de ácidos nucleicos de la invención, que se usan ventajosamente en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos de la presente invención se introduce en una célula huésped, de modo que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicativo, como se ha descrito anteriormente.

[0103] La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procarionta, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota.

65

- [0104] Las células unicelulares útiles son las células bacterianas tales como las bacterias gram positivas, incluyendo, pero de forma no limitativa, una célula de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*; o una célula de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas tales como las especies de *E. coli* y *Pseudomonas*. En una forma de realización preferida, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. En otra forma de realización preferida, la célula de *Bacillus* es un *Bacillus* alcalofílico.
- [0105] La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana puede realizarse, por ejemplo, por transformación de protoplasto (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111-115), utilizando células competentes (véase, por ejemplo, Young y Spizizin, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988 Biotechniques 6: 742-751) o conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5771-5278).
- [0106] La célula huésped puede ser una célula eucariota, tal como una célula de mamífero, de insecto, vegetal o fúngica.
- [0107] En una forma de realización, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongo", como se utiliza en este caso, incluye los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota (como definen Hawkswort *et al.* en, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) al igual que Oomycota (como se cita en Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*).
- [0108] En otra forma de realización, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura", como se utiliza en este caso, incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporogénea y levadura perteneciente a los hongos imperfectos (Blastomicetos). Dado que la clasificación de levaduras puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe definirse como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).
- [0109] Ejemplos de células huésped de levadura preferida incluyen células de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Sarccharomyces*, *Schizosacaromices* o de *Yarrowia*.
- [0110] En una forma de realización más preferida, la célula huésped de levadura es una célula de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o de *Saccharomyces oviformis*. En otra forma de realización más preferida, la célula huésped de levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*. En otra forma de realización más preferida, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.
- [0111] En otra forma de realización, la célula huésped fúngica es una célula micótica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todos las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como definen Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*). Los hongos filamentosos se caracterizan por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.
- [0112] Una célula huésped fúngica filamentosa preferida incluye una célula de una de las especies, pero de forma no limitativa, de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Thielavia*, *Tolipocladium* o *Trichoderma*.
- [0113] En una forma de realización más preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otra forma de realización más preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*. En una forma de realización incluso más preferida, la célula progenitora fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium venenatum* (especie Nirenberg nov.). En otra forma de realización más preferida, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.
- [0114] Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplasto, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de manera conocida *per se*. Los procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* se describen en la EP 238 023 y en Yelton *et al.*,

1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474. Métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* son descritos por Malardier *et al.*, 1989, Gene 78: 147-156 and WO 96/00787. La levadura se puede transformar usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito *et al.*, 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

Métodos de producción

10 [0115] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprende (a) cultivo de una cepa, que en su forma de tipo salvaje es capaz de producir el polipéptido y (b) recuperación del polipéptido. Preferiblemente, la cepa es del género *Bacillus* y, más preferiblemente, de la especie *Bacillus*.

15 [0116] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprende (a) cultivo de una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido y (b) recuperación del polipéptido.

20 [0117] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación, fermentación a pequeña o gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, de lote, lote alimentadas o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales llevadas a cabo en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan que el polipéptido se exprese y/o aisle. El cultivo se produce en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Existen medios adecuados de proveedores comerciales o se pueden preparar según las composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido es secretado en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no es secretado, se puede recuperar de lisatos celulares.

30 [0118] Los polipéptidos se pueden detectar utilizando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo enzimático para determinar la actividad del polipéptido como se describe en este caso.

35 [0119] El polipéptido resultante se puede recuperar por métodos conocido en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales que incluyen, pero no están limitados a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

40 [0120] Los polipéptidos de la presente invención se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no están limitados a, cromatografía (p. ej., de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, de cromatoenfoco y de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989).

45 Aplicaciones industriales

[0121] Una alfa-amilasa de la invención es muy adecuada para su uso en una variedad de procesos industriales, en particular la enzima encuentra aplicaciones potenciales como componente en detergentes, por ejemplo, composiciones de detergentes de lavado de ropa, lavado de vajilla y limpieza de superficies duras, pero también es útil para el desecolado de textiles, tejidos y prendas, la fabricación o elaboración de cerveza, la fabricación de pan, la producción de pulpa y papel, y además, la producción de edulcorantes y etanol y otros productos de fermentación, especialmente combustibles, bebidas y etanol industrial a partir de, por ejemplo, almidón o granos enteros.

55 Conversión de almidón

[0122] Los procesos de conversión de almidón convencional, tales como la licuefacción y procesos de sacarificación, se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n°: 3 912 590 y las publicaciones de patente europea n°: 252 730 y 63 909.

60 Producción de producto de fermentación

[0123] Un producto de fermentación, especialmente etanol, se puede producir usando cualquier método conocido en la técnica. Un ejemplo de producción de etanol, donde se puede utilizar una alfa-amilasa de la invención se describe en la patente estadounidense n°: 5 231 017.

65

[0124] Además, un proceso donde se puede usar una alfa-amilasa de la invención se describe en las solicitudes de patente danesa PA 2003 00949 y PA 2003 01568. Dicho proceso es para hidrolizar almidón granulado en un hidrolizado de almidón soluble a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho almidón granulado.

5 Producción de pulpa y papel

[0125] La alfa-amilasa de la invención también se puede usar en la producción de materiales lignocelulósicos, tales como pulpa, papel y cartón, a partir de residuos de papel y cartón reforzados de almidón, especialmente donde el repulpado se produce a un pH por encima de 7 y donde las amilasas facilitan la desintegración del material de residuo a través de la degradación del almidón de refuerzo. La alfa-amilasa de la invención es especialmente útil en un proceso para producir una pasta de papel a partir de papel impreso revestido de almidón. El proceso se puede realizar como se describe en la WO 95/14807, que comprende los pasos siguientes:

- 15 a) desintegración del papel para producir una pulpa,
- b) tratamiento con una enzima de degradación de almidón antes, durante o después del paso a), y
- c) separación de las partículas de tinta de la pulpa después de los pasos a) y b).

20 [0126] Una alfa-amilasa de la invención también puede ser muy útil en la modificación de almidón, donde el almidón modificado enzimáticamente se usa para la fabricación de papel junto con productos de relleno alcalinos, tales como carbonato cálcico, caolín y arcillas. Con unas alfa-amilasas de la invención, es posible modificar el almidón en presencia del producto de relleno, permitiendo así un proceso integrado más simple.

25 Desencolado de textiles, tejidos y prendas

[0127] Una alfa-amilasa de la invención también puede ser muy útil en el desencolado de textiles, tejidos o prendas. En la industria del tratamiento textil, las alfa-amilasas se utilizan generalmente como auxiliares en el proceso de desencolado para facilitar la eliminación de cola que contiene almidón, que ha servido como un recubrimiento protector en los hilos de trama durante el tejido. La completa eliminación del recubrimiento de cola después del tejido es importante para garantizar resultados óptimos en los procesos posteriores, en los que la tela es inspeccionada, blanqueada y teñida. La descomposición del almidón enzimático se prefiere porque no implica ningún efecto nocivo en el material fibroso. Para reducir el coste del proceso y aumentar el rendimiento de la fábrica, el proceso de desencolado se combina a veces con los pasos de descudado y blanqueo. En tales casos, los productos auxiliares no enzimáticos tales como agentes alcalinos o de oxidación se utilizan típicamente para descomponer el almidón, porque las alfa-amilasas tradicionales no son muy compatibles con niveles altos de pH y agentes blanqueadores. La descomposición no enzimática de la cola de almidón produce cierto daño en la fibra debido a que se usan productos químicos bastante agresivos. Por consiguiente, sería deseable usar las alfa-amilasas de la invención ya que tienen un rendimiento mejorado en soluciones alcalinas. Las alfa-amilasas se pueden utilizar solas o en combinación con una celulasa para el desencolado de telas o textiles que contienen celulosa. El desencolado y los procesos de blanqueo se conocen en la técnica. Por ejemplo, tales procesos se describen en la WO 95/21247, la US 4 643 736 y la EP 119 920. Así, en una forma de realización, la invención se refiere a un proceso para desencolado de un textil, tejido o prenda encolados que contiene almidón o derivados de almidón, este proceso comprende el tratamiento del tejido con una alfa-amilasa de la invención.

45 Fabricación de cerveza

[0128] Las alfa-amilasas de la invención también puede ser muy útiles en un proceso de fabricación de cerveza; las alfa-amilasas se agregarán normalmente durante el proceso de trituración.

50 Composiciones de detergentes

[0129] Se puede adicionar una alfa-amilasa de la invención y convertirse así en un componente de una composición de detergente.

55 [0130] La composición de detergente de la invención se puede formular, por ejemplo, como una composición de detergente de lavado a mano o a máquina que incluye una composición aditiva adecuada para el pretratamiento de tejidos manchados y una composición de suavizante adicionada de aclarado, o se puede formular como una composición de detergente para su uso en operaciones generales de limpieza de superficies duras del hogar o se puede formular para operaciones de lavado de la vajilla a mano o a máquina.

60 [0131] En un aspecto específico, la invención proporciona un aditivo de detergente que comprende la enzima de la invención. El aditivo de detergente, al igual que la composición de detergente, puede comprender una o más enzimas tales como una proteasa, una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, tal como pectato liasa; una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasa, una oxidasa, por ejemplo, una lacasa y/o una peroxidasa.

- [0132] En general, las propiedades de la enzima o enzimas elegidas deberían ser compatibles con el detergente seleccionado (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.) y la enzima o enzimas deberían estar presentes en cantidades eficaces.
- 5 [0133] Proteasas: las proteasas adecuadas incluyen proteasas animales, vegetales o de origen microbiano. Se prefieren las de origen microbiano. En una forma de realización preferida, la proteasa se deriva de la cepa de la especie *Bacillus*. Los mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteínas están incluidos. La proteasa puede ser una serina proteasa o una metalo proteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa de tipo tripsina. Ejemplos de proteasas alcalinas son las subtilisinas, especialmente las derivadas de *Bacillus*, por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descrita en la WO 89/06279). Ejemplos de proteasas de tipo tripsina son tripsina (p. ej., de origen bovino o porcino) y la proteasa de *Fusarium* descrita en la WO 89/06270 y la WO 94/25583.
- 10 [0134] Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en la WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116, y WO 98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 y 274.
- 15 [0135] Las enzimas de proteasas disponibles comercialmente preferidas incluyen ALCALASE™, SAVINASE™, PRIMASE™, DURALASE™, ESPERASE™, EVERLASE™ y KANNASE™ (Novozymes A/S, Dinamarca), MAXATASE™, MAXACAL™, MAXAPEM™, PROPERASE™, PURAFECT™, PURAFECT OXP™, FN2™, y FN3™ (Genencor International Inc.).
- 20 [0136] Lipasas: las lipasas adecuadas incluyen las de origen fúngico o bacteriano. Los mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína están incluidos. Ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo de *Thermomyces*), por ejemplo, de *H. lanuginosa* (*T. Lanuginosus*), como se describe en la EP 258 068 y EP 305 216 o de *H. insolens*, como se describe en la WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP 218 272), *P. cepacia* (EP 331 376), *P. stutzeri* (GB 1 372 034), *P. fluorescens*, especie *Pseudomonas* cepa SD 705 (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo de *B. subtilis* (Dartois *et al.* (1993), Biochemica et Biophysica Acta, 1131,253-360), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422).
- 25 [0137] Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como los descritos en la WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202.
- 30 [0138] Las enzimas de lipasa disponibles comercialmente preferidas incluyen LIPOLASE™ y LIPOLASE™ ULTRA (Novozymes A/S, Dinamarca).
- 35 [0139] Amilasas: las amilasas adecuadas (alfa y/o beta) incluyen las de origen fúngico o bacteriano. Los mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína están incluidos. Las amilasas incluyen, por ejemplo, alfa-amilasas obtenidas a partir de *Bacillus*, por ejemplo, una cepa especial de *B. licheniformis*, descrito con más detalle en la GB 1 296 839.
- 40 [0140] Ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en la WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873, y WO 97/43424, especialmente las variantes con sustituciones en una o más de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444.
- 45 [0141] Las amilasas disponibles comercialmente son DURAMYL™, STAINZYME™, NATALASE™, TERMAMYL™, FUNGAMYL™ y BAN™ (Novozymes A/S, Dinamarca), RAPTOASE™ y PURASTAR™ (de Genencor International Inc.).
- 50 [0142] Celulasas: las celulasas adecuadas incluyen las de origen fúngico o bacteriano. Los mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína están incluidos. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myeliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en la US 4 435 307, US 5 648 263, US 5 691 178, US 5 776 757 y WO 89/09259.
- 55 [0143] Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas neutras o alcalinas que tienen beneficios para el cuidado del color. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en la EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940, WO 02/099091. Otros ejemplos son las variantes de celulasas tales como las descritas en la WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5 457 046, US 5 686,593, US 5 763 254, WO 95/24471, WO 98/12307 y WO 99/01544.
- 60 [0144] Las celulasas disponibles comercialmente incluyen CELLUZYME™, CAREZYME™, RENOZYME™ (Novozymes A/S, Dinamarca), CLAZINASE™, y PURADAX HA™ (Genencor International Inc.), y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).
- 65

[0145] Mananastas: se puede usar cualquier mananasa adecuada para su uso en soluciones alcalinas. Las mananastas adecuadas incluyen las de origen fúngico o bacteriano. Los mutantes modificados química o genéticamente están incluidos.

5

[0146] En una forma de realización preferida, la mananasa se deriva de una cepa del género *Bacillus*, especialmente la especie *Bacillus l633* descrita en las posiciones 31-330 de SEQ ID N°: 2 o en SEQ ID N°: 5 de la WO 99/64619 o *Bacillus agaradhaerens*, por ejemplo, de la cepa de tipo DSM 8721.

10

[0147] Las mananastas disponibles comercialmente incluyen MANNAWAY™ (Novozymes A/S).

[0148] Pectato liasa: se puede usar cualquier pectato liasa adecuada para su uso en soluciones alcalinas. Las pectato liasas adecuadas incluyen las de origen fúngico o bacteriano. Los mutantes modificados química o genéticamente están incluidos.

15

[0149] En una forma de realización preferida, la pectato liasa se deriva de una cepa del género *Bacillus*, especialmente una cepa de *Bacillus subtilis*, especialmente *Bacillus subtilis* DSM14218 descrita en la SEQ ID N°: 2 o una variante de la misma descrita en el ejemplo 6 de la WO 02/092741 o *Bacillus licheniformis*, preferiblemente el *Bacillus licheniformis* descrito en la patente estadounidense n°: 6 284 524.

20

[0150] Las pectato liasas disponibles comercialmente incluyen PECTAWAY™ (Novozymes A/S).

[0151] Peroxidasas/oxidasas: las peroxidasas/oxidasas adecuadas incluyen las de origen vegetal, fúngico o bacteriano. Los mutantes químicamente modificados o creados genéticamente de proteína están incluidos. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus*, y variantes de las mismas, tal como las descritas en la WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257.

25

[0152] Las peroxidasas disponibles comercialmente incluyen GUARDZYME™ (Novozymes A/S, Dinamarca).

30

[0153] La enzima o enzimas de detergente pueden estar incluidas en una composición de detergente por adición de aditivos separados que contienen una o más enzimas, o por adición de un aditivo combinado que comprenda todas estas enzimas. Un aditivo de detergente de la invención, es decir un aditivo separado o un aditivo combinado, se puede formular, por ejemplo, como un granulado, un líquido, un lodo, etc. Las formulaciones de aditivo de detergente preferidas son granulados, en particular granulados no polvorientos, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o lodos.

35

[0154] Los granulados no polvorientos se pueden producir, por ejemplo, como se describe en la US 4 106 991 y 4 661 452 y se pueden opcionalmente revestir por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de recubrimiento ceroso son los productos de poli(etileno óxido) (polietilenglicol, PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20 000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados en los que el alcohólico contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en los que hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos y mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de recubrimiento que forman películas adecuadas para su aplicación mediante técnicas de lecho fluidificado se dan en la GB 1483591. Las preparaciones enzimáticas líquidas pueden estabilizarse, por ejemplo, añadiendo un poliol, tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico, según métodos establecidos. Las enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en la EP 238 216.

40

45

[0155] La composición de detergente de la invención puede ser de cualquier forma conveniente, por ejemplo, una barra, una tableta, un polvo, un gránulo, una pasta o un líquido. Un detergente líquido puede ser acuoso, conteniendo normalmente hasta 70% de agua y 0-30% de solvente orgánico, o no acuoso.

50

[0156] La composición de detergente comprende uno o más surfactantes, que pueden ser no iónicos, incluyendo semipolares y/o aniónicos y/o catiónicos y/o zwitteriónicos. Los surfactantes están presentes típicamente en un nivel de 0,1% a 60% en peso.

55

[0157] Cuando está incluido, el detergente contendrá normalmente de aproximadamente 1% a aproximadamente 40% de un surfactante aniónico, tal como alquilbencenosulfonato lineal, alfa-olefinsulfonato, sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso), alcohol etoxisulfato, alcanosulfonato secundario, éster metílico de ácido graso alfa-sulfo, ácido alquilo- o alqueniilsuccínico o jabón.

60

[0158] Cuando está incluido, el detergente contendrá normalmente de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 40% de un surfactante no iónico, tal como alcohol etoxilato, nonilfenol etoxilato, alquilpoliglicósido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, amida de ácido graso de polihidroxi alquilo o derivados de N-acilo N-alquilo de glucosamina ("glucamidas").

65

[0159] El detergente puede contener 0-65% de un constructor de detergente o agente complejante tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilendiaminatetraacético, ácido dietileno-triaminopentaacético, ácido alquilo o alqueni-succínico, silicatos solubles o silicatos estratificados (p. ej., SKS-6 de Hoechst).

5

[0160] El detergente puede comprender uno o más polímeros. Ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinilpirrolidona), poli(etileno glicol), poli(vinil alcohol), poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos tales como poli-acrilatos, copolímeros de ácido maléico/acrílico y copolímeros lauril metacrilato/ácido acrílico.

10

[0161] El detergente puede contener un sistema blanqueante que puede comprender una fuente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, tal como perborato o percarbonato, que se puede combinar con un activador blanqueante formador de perácido, tal como tetraacetil-etilendiamina o nonanoiloxibencenosulfonato. Alternativamente, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos, por ejemplo, de tipo amida, imida o sulfona.

15

[0162] La enzima o enzimas de la composición de detergente de la invención se pueden estabilizar utilizando agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenilborónico tal como ácido 4-formilfenil borónico, y la composición se puede formular como se describe en, por ejemplo, la WO 92/19709 y WO 92/19708.

20

[0163] El detergente también puede contener otros ingredientes detergentes convencionales, tal como por ejemplo acondicionadores de tejidos, que incluyen arcillas, potenciadores de espuma, supresores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes de supresión de suciedad, agentes de redeposición de la suciedad, tintes, bactericidas, blanqueadores ópticos, hidrotropos, inhibidores de la decoloración o perfumes.

25

[0164] Actualmente se tiene en cuenta que en las composiciones de detergente se puede añadir cualquier enzima, en particular la enzima de la invención, en una cantidad correspondiente a 0,01-100 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, preferiblemente 0,05-5 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, en particular 0,1-1 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado.

30

[0165] La enzima de la invención se puede incorporar además a las formulaciones de detergentes descritas en la WO 97/07202.

Lavavajillas

35

[0166] Un ejemplo de una composición de lavavajillas de la invención que incluye una alfa-amilasa de la invención y preferiblemente al menos una proteasa, especialmente una proteasa de *Bacillus*, tal como SAVINASE™, se puede encontrar más adelante.

40

1) Composición de lavavajillas automático en polvo

[0167]

|                                  |              |
|----------------------------------|--------------|
| Surfactante no iónico            | 0,4 -2,5%    |
| Metasilicato de sodio            | 0 -20%       |
| Disilicato de sodio              | 3 -20%       |
| Trifosfato de sodio              | 20 -40%      |
| Carbonato de sodio               | 0 -20%       |
| Perborato de sodio               | 2 -9%        |
| Tetraacetil-etilendiamina (TAED) | 1 -4%        |
| Sulfato de sodio                 | 5 -33%       |
| Enzimas                          | 0,0001 -0,1% |

45

2) Composición de lavavajillas automático en polvo

[0168]

|   |         |
|---|---------|
| Surfactante no iónico (p. ej., alcohol etoxilato) | 1 -2%   |
| Disilicato de sodio                               | 2 -30%  |
| Carbonato de sodio                                | 10 -50% |
| Fosfonato de sodio                                | 0 -5%   |
| Dihidrato de citrato trisódico                    | 9 -30%  |
| Acetato de nitrilotrisodio (NTA)                  | 0 -20%  |
| Monohidrato de perborato sódico                   | 5 -10%  |

## ES 2 425 351 T3

|  |              |
|--|--------------|
| Tetraacetiltilenodiamina (TAED)  | 1 -2%        |
| Polímero de poliacrilato (p. ej., copolímero de ácido maléico/ ácido acrílico) | 6 -25%       |
| Enzimas  | 0,0001 -0,1% |
| Perfume  | 0,1 -0,5%    |
| Agua   | 5 -10        |

### 3) Composición de lavavajillas automático en polvo

5 [0169]

|  |              |
|--|--------------|
| Surfactante no iónico                      | 0,5 -2,0%    |
| Disilicato de sodio                        | 25 -40%      |
| Citrato de sodio                           | 30 -55%      |
| Carbonato de sodio                         | 0 -29%       |
| Bicarbonato de sodio                       | 0 -20%       |
| Monohidrato de perborato sódico            | 0 -15%       |
| Tetraacetiltilenodiamina (TAED)            | 0 -6%        |
| Copolímero de ácido maléico/ácido acrílico | 0 -5%        |
| Arcilla                                    | 1 -3%        |
| Ácidos poliamínicos                        | 0 -20%       |
| Poliacrilato de sodio                      | 0 -8%        |
| Enzimas                                    | 0,0001 -0,1% |

### 4) Composición de lavavajillas automático en polvo

10 [0170]

|  |              |
|--|--------------|
| Surfactante no iónico                      | 1-2%         |
| Zeolita MAP 1                              | 5-42%        |
| Disilicato de sodio                        | 30-34%       |
| Citrato de sodio                           | 0-12%        |
| Carbonato de sodio                         | 0-20%        |
| Monohidrato de perborato sódico            | 7-15%        |
| Tetraacetiltilenodiamina (TAED)            | 0-3%         |
| Polímero                                   | 0-4%         |
| Copolímero de ácido maléico/ácido acrílico | 0-5%         |
| Fosfonato orgánico                         | 0-4%         |
| Arcilla                                    | 1-2%         |
| Enzimas                                    | 0,0001 -0,1% |
| Sulfato de sodio                           | Equilibrio   |

### 5) Composición de lavavajillas automático en polvo

15 [0171]

|  |             |
|--|-------------|
| Surfactante no iónico  | 1-7%        |
| Disilicato de sodio  | 18-30%      |
| Citrato de trisodio  | 10-24%      |
| Carbonato de sodio   | 12-20%      |
| Monopersulfato (2 KHSO <sub>5</sub> .KHSO <sub>4</sub> .K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) | 15-21%      |
| Estabilizador de blanqueador   | 0,1-2%      |
| Copolímero de ácido maléico/ácido acrílico   | 0-6%        |
| Pentaacetato de dietilentriammina, sal de pentasodio                                     | 0-2,5%      |
| Enzimas  | 0,0001-0,1% |
| Sulfato de sodio, agua   | Equilibrio  |

### 6) Composición de lavavajillas en polvo y líquido con sistema surfactante de limpieza

20 [0172]

ES 2 425 351 T3

|  |             |
|--|-------------|
| Surfactante no iónico  | 0-1,5%      |
| Octadecil dimetilamina N-óxido dihidrato   | 0-5%        |
| 80:20 en peso mezcla C18/C16 de octadecil dimetilamina N-óxido dihidrato y hexadecildimetilamina N-óxido dihidrato                   | 0-4%        |
| 70:30 en peso mezcla C18/C16 de octadecil bis (hidroxietil)amina N-óxido anhidro y hexadecilo bis (hidroxietil)amina N-óxido anhidro | 0-5%        |
| Etoxisulfato de alquilo C <sub>13</sub> -C <sub>15</sub> con un grado medio de etoxilación de 3                                      | 0-10%       |
| Etoxisulfato de alquilo C <sub>12</sub> -C <sub>15</sub> con un grado medio de etoxilación de 3                                      | 0-5%        |
| Alcohol etoxilado C <sub>13</sub> -C <sub>15</sub> con un grado medio de etoxilación de 12   | 0-5%        |
| Una mezcla de alcoholes etoxilados C <sub>12</sub> -C <sub>15</sub> con un grado medio de etoxilación de 9                           | 0-6,5%      |
| Una mezcla de alcoholes etoxilados C <sub>13</sub> -C <sub>15</sub> con un grado medio de etoxilación de 30                          | 0-4%        |
| Disilicato de sodio  | 0-33%       |
| Tripolifosfato de sodio  | 0-46%       |
| Citrato sódico   | 0-28%       |
| Ácido cítrico  | 0-29%       |
| Carbonato de sodio   | 0-20%       |
| Monohidrato de perborato sódico  | 0-11,5%     |
| Tetraacetililenodiamina (TAED)   | 0-4%        |
| Copolímero de ácido maléico/ácido acrílico   | 0-7,5%      |
| Sulfato de sodio   | 0-12,5%     |
| Enzimas  | 0,0001-0,1% |

7) Composición de lavavajillas automático líquido no acuoso

5 [0173]

|  |             |
|--|-------------|
| Surfactante no iónico líquido (p. ej., alcohol etoxilatos)   | 2,0-10,0%   |
| Silicato de metal alcalino   | 3,0-15,0%   |
| Fosfato de metal alcalino  | 20,0-40,0%  |
| Portador líquido seleccionado de glicoles, poliglicoles, polióxidos, glicoléteres más altos                | 25,0-45,0%  |
| Estabilizador (p. ej., un éster parcial de ácido fosfórico y un alcohol C <sub>16</sub> -C <sub>18</sub> ) | 0,5-7,0%    |
| Supresor de espuma (p. ej., silicona)  | 0-1,5%      |
| Enzimas  | 0,0001-0,1% |

8) Composición de lavavajillas líquido no acuoso

10

[0174]

|   |             |
|---|-------------|
| Surfactante no iónico líquido (p. ej. alcohol etoxilatos)   | 2,0-10,0%   |
| Silicato sódico   | 3,0-15,0%   |
| Carbonato de metal alcalino   | 7,0-20,0%   |
| Citrato sódico  | 0,0-1,5%    |
| Sistema estabilizante (p. ej., mezclas de silicona finamente dividida y éteres de dialquil poliglicol de bajo peso molecular) | 0,5-7,0%    |
| Polímero de poliacrilato de bajo peso de molécula   | 5,0-15,0%   |
| Espesante de gel de arcilla (p. ej., bentonita)   | 0,0-10,0%   |
| Polímero de hidroxipropilcelulosa   | 0,0-0,6%    |
| Enzimas   | 0,0001-0,1% |
| Portador líquido seleccionado de licoles, poliglicoles, polióxidos y de éteres de glicol más altos                            | Equilibrio  |

15 9) Composición de lavavajillas automático líquido tixotrópico

[0175]

|  |           |
|--|-----------|
| Ácido graso C <sub>12</sub> -C <sub>14</sub> | 0-0,5%    |
| Surfactante de copolímero de bloque          | 1,5-15,0% |
| Citrato sódico                               | 0-12%     |
| Tripolifosfato de sodio                      | 0-15%     |
| Carbonato de sodio                           | 0-8%      |

|   |             |
|---|-------------|
| Tristearato de aluminio                   | 0-0,1%      |
| Sulfonato de cumeno sódico                | 0-1,7%      |
| Espesante de poliacrilato                 | 1,32-2,5%   |
| Poliacrilato de sodio                     | 2,4-6,0%    |
| Ácido bórico                              | 0-4,0%      |
| Formiato sódico                           | 0-0,45%     |
| Formiato de calcio                        | 0-0,2%      |
| N-decidifenil óxido disulfonato de sodio  | 0-4,0%      |
| Monoetanolamina (MEA)                     | 0-1,86%     |
| Hidróxido sódico (50%)                    | 1,9-9,3%    |
| 1,2-Propanodiol                           | 0-9,4%      |
| Enzimas                                   | 0,0001-0,1% |
| Supresor de espuma, tinte, perfumes, agua | Equilibrio  |

10) Composición de lavavajillas automático líquido

5 [0176]

|  |             |
|--|-------------|
| Alcohol etoxilato                          | 0-20%       |
| Sulfonato de éster de ácido graso          | 0-30%       |
| Dodecilsulfato sódico                      | 0-20%       |
| Poliglucosida de alquilo                   | 0-21%       |
| Ácido oleico                               | 0-10%       |
| Monohidrato de disilicato de sodio         | 18-33%      |
| Dihidrato de citrato sódico                | 18-33%      |
| Estearato de sodio                         | 0-2,5%      |
| Monohidrato de perborato sódico            | 0-13%       |
| Tetraacetililenodiamina (TAED)             | 0-8%        |
| Copolímero de ácido maléico/ácido acrílico | 4-8%        |
| Enzimas                                    | 0,0001-0,1% |

11) Composición de lavavajillas automático líquido que contiene partículas blanqueantes protegidas

10 [0177]

|  |             |
|--|-------------|
| Silicato sódico  | 5-10%       |
| Pirofosfato de tetrapotasio                              | 15-25%      |
| Trifosfato de sodio                                      | 0-2%        |
| Carbonato potásico                                       | 4-8%        |
| Partículas blanqueadoras protegida, por ejemplo, clorina | 5-10%       |
| Espesante polimérico                                     | 0,7-1,5%    |
| Hidróxido potásico                                       | 0-2%        |
| Enzimas  | 0,0001-0,1% |
| Agua   | Equilibrio  |

15 11) Composiciones de lavavajillas automático según se describen en los puntos 1), 2), 3), 4), 6) y 10), donde el perborato se sustituye por percarbonato.

20 12) Composiciones de lavavajillas automático según se describen en los puntos 1) - 6) que contienen además un catalizador de manganeso. El catalizador de manganeso puede, por ejemplo, ser uno de los compuestos descritos en, "Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching", Nature 369, 1994, págs. 637-639.

[0178] Productos a base de masa

25 [0179] Una alfa-amilasa de la invención se puede utilizar para la preparar un producto comestible a base de masa. En una forma de realización preferida, una alfa-amilasa de la invención se agrega en una cantidad de 0,01 a 10 mg/kg de harina, preferiblemente 0,5 a 5 mg/kg de harina, especialmente 0,1 a 3 mg/kg de harina. La masa comprende generalmente harina (particularmente harina de trigo) y agua. La masa se leuda, por ejemplo, añadiendo agentes de leudado químico o levadura, normalmente *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadero).

[0180] El producto a base de masa está hecho por leudado y calentamiento de la masa, por ejemplo, por horneado o vaporización. Ejemplos son el pan horneado o vaporizado (en particular, pan blanco, integral o de centeno), típicamente en forma de hogazas o barras.

5 [0181] La masa puede comprender una o más enzimas adicionales, por ejemplo, una segunda amilasa (p. ej., una alfa-amilasa maltogénica), una glucanotransferasa de ciclodextrina, una proteasa o peptidasa, en particular una exopeptidasa, una transglutaminasa, una lipasa, una fosfolipasa, una celulasa, una hemicelulasa (p. ej., una pentosanasa o xilanasa), una glicosiltransferasa, un enzima de ramificación (enzima de ramificación 1,4-alfa-glucano) o una oxidasa tal como glucosa-oxidasa o una oxidasa con actividad más alta en la maltosa que en la glucosa.

10 Masa

[0182] La masa se leuda, por ejemplo, añadiendo agentes de leudado químico o levadura, normalmente *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadero).

15 [0183] La masa generalmente comprende sémola, harina o fécula tal como sémola de trigo, harina de trigo, harina de maíz, fécula de maíz, sémola de centeno, harina de centeno, sémola de avena, harina de avena, sémola de sorgo, harina de sorgo, harina de arroz, sémola de patata, harina de patata o fécula de patata.

20 [0184] La masa, puede ser fresca, congelada o pre-cocinada.

[0185] La masa puede ser una masa laminada.

25 [0186] La masa también puede comprender otros ingredientes de masa convencionales, por ejemplo: proteínas, tal como leche en polvo y gluten; huevos (ya sean huevos enteros, yemas de huevo o claras de huevo); un oxidante tal como ácido ascórbico, bromato de potasio, yodato de potasio, azodicarbonamida (ADA) o persulfato de amonio; un aminoácido tal como L-cisteína; un azúcar; una sal tal como cloruro sódico, acetato de calcio, sulfato de sodio o sulfato de calcio. La masa puede comprender grasa (triglicéridos) tal como manteca o grasa granulada.

30 [0187] La masa puede comprender además un emulsionante, tal como mono- o diglicéridos, ésteres de ácido diacetil tartárico de mono- o diglicéridos, ésteres de azúcar de ácidos grasos, ésteres de poliglicerol de ácidos grasos, ésteres de ácido láctico de monoglicéridos, ésteres de ácido acético de monoglicéridos, estearatos de polioxietileno o lisolecitina.

35 Producto comestible

[0188] El proceso de la invención se usa para preparar un producto comestible mediante el leudado de la masa y su calentamiento, por ejemplo, por horneado o vaporización. El producto puede ser de carácter blando o crujiente, ya sea de tipo blanco, claro u oscuro. Son ejemplos el pan vaporizado u horneado (en particular, el pan blanco, de centeno o integral), típicamente en forma de hogazas o barras, pan tipo baguette francesa, pan de pita, tortillas, pasteles, panqueques, pastas, galletas, masas de pastel, pan crujiente, pan al vapor, pizza y similares.

Enzima adicional opcional

45 [0189] Una alfa-amilasa de la invención puede usarse opcionalmente junto con una o más enzimas adicionales.

[0190] La enzima adicional puede ser una enzima lipolítica, particularmente actividad de fosfolipasa, galactoilipasa y/o triacilglicerol lipasa, por ejemplo, como se describe en la WO 9953769, WO 0032758, WO 0200852 o WO 2002066622.

50 [0191] Además, la enzima adicional puede ser una segunda amilasa, una glucanotransferasa de ciclodextrina, una proteasa o peptidasa, en particular una exopeptidasa, una transglutaminasa, una lipasa, una fosfolipasa, una celulasa, una hemicelulasa, una glicosiltransferasa, un enzima de ramificación (1,4-alfa-glucano enzima de ramificación) o una oxidorreductasa. La enzima adicional puede ser de origen mamífero, vegetal o microbiano (bacteriano, de levadura o fúngico).

55 [0192] La segunda amilasa puede ser de un hongo, bacteria o planta. Puede ser una alfa-amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133), por ejemplo de *B. stearothermophilus*, una alfa-amilasa, por ejemplo de *Bacillus*, particularmente *B. licheniformis* o *B. amyloliquefaciens*, una beta-amilasa, por ejemplo de fuentes vegetales (p. ej. soja) o microbianas (p. ej. *Bacillus*), una glucoamilasa, por ejemplo de *A. niger*, o una alfa-amilasa fúngica, por ejemplo de *A. oryzae*.

60 [0193] La hemicelulasa puede ser una pentosanasa, por ejemplo una xilanasa que puede ser de origen microbiano, por ejemplo derivada de una bacteria u hongo, tal como una cepa de *Aspergillus*, en particular de *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. awamori* o *A. tubigensis*, de una cepa de *Trichoderma*, por ejemplo, *T. reesei*, o de una cepa de *Humicola*, por ejemplo, *H. insolens*, o de *Bacillus*, por ejemplo, *B. subtilis*.

65 [0194] La proteasa puede ser de *Bacillus*, por ejemplo *B. amyloliquefaciens*.

[0195] La oxidorreductasa puede ser una glucosa oxidasa, una hexosa oxidasa, una lipoxigenasa, una peroxidasa o una lacasa.

5 Aditivo de mejora de la masa y/o el pan

[0196] Se puede proporcionar una alfa-amilasa de la invención como aditivo de mejora de una masa y/o de un pan en forma de granulado o polvo aglomerado. El aditivo de mejora de una masa y/o de un pan puede tener preferiblemente en particular una distribución del tamaño de las partículas estrecha con más del 95% (en peso) de las partículas en el  
10 rango de 25 a 500 µm.

[0197] Los granulados y los polvos aglomerados se pueden preparar por métodos convencionales, por ejemplo, pulverizando la amilasa sobre un portador en un granulador de lecho fluidizado. El portador puede consistir en núcleos de partículas con un tamaño de partícula adecuado. El portador puede ser soluble o insoluble, por ejemplo, una sal (tal como NaCl o sulfato de sodio), un azúcar (tal como sacarosa o lactosa), un alcohol de azúcar (tal como sorbitol), almidón, arroz, sémola de maíz o soja.  
15

Composición que incluye una alfa-amilasa de la invención

[0198] La presente invención se describe con más detalle por los siguientes ejemplos que no deberían interpretarse como limitación del ámbito de la invención.  
20

[0199] En un aspecto, la invención se refiere a una composición que incluye una alfa-amilasa de la invención. En una forma de realización, la composición de la invención comprende además una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una celulasa, tal como una endoglucanasa, una lipasa, una cutinasa, una oxidorreductasa, una proteasa, otra amilasa, una hemicelulasa, tal como una mananasa, una xilanasa, una galactanasa, una arabinofuranosidasa, una esterasa, una liquenasa, unas arabinanasa, una pectato liasa y una mezcla de las mismas. La enzima específica puede ser cualquiera de las mencionadas anteriormente.  
25

30 Uso de una alfa-amilasa de la invención

[0200] Finalmente, la invención también se refiere al uso de una alfa-amilasa de la invención. En la forma de realización preferida, la invención se refiere al uso de una alfa-amilasa de la invención o composición de la invención para tratar tejidos, telas, hilos o prendas, especialmente para desencolar tejidos, telas, hilos o prendas. Una alfa-amilasa de la invención también se puede usar en masas, tal como para mejorar la elasticidad de la miga de pan de un producto horneado o para mejorar la firmeza de la miga de pan de un producto horneado o para mejorar la blandura de la miga de pan de un producto horneado o para mejorar la humedad de un producto horneado. Una alfa-amilasa de la invención también se puede usar en una composición de detergente, en particular una composición de detergente para ropa y una composición de detergente lavavajillas.  
35

[0201] Una alfa-amilasa de la invención también se puede usar para licuefacción de almidón o en un proceso de producción de etanol.  
40

Material y métodos:

[0202] Los productos químicos utilizados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos calidad reactiva.  
45

Materiales:

Enzimas:

[0203] Alfa-amilasa maltogénica derivada de la cepa NCIB 11837 de *B. stearrowthermophilus* descrita en la EP 120 693 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).  
50

[0204] Xilanasa II derivada de CBS 101.43 de *Aspergillus aculeatus* descrita como Xyl II en WO 94/21785 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).  
55

Ingredientes:

[0205]

Emulsionante: SSL - sodio stearoil-2-lactulato - Palsgaard 3426

65 Fortalecedores de masa: ADA - azodicarbonamida - SIGMA

Métodos generales de biología molecular:

5 [0206] A menos que se especifique de otra manera, las manipulaciones de DNA y las transformaciones se realizaron usando métodos estándar de biología molecular (Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989; Ausubel *et al.* (1995); Harwood and Cutting (1990)).

Fermentación de alfa-amilasas

10 [0207] La fermentación se puede realizar por métodos bien conocidos en la técnica o de la siguiente manera.

[0208] Una cepa de *B. subtilis* que contiene el plásmido de expresión pertinente se estría en una placa de LB-agar con 10 micro g/ml de canamicina de caldo a -80°C y se cultiva durante toda la noche a 37°C.

15 [0209] Las colonias se transfieren a 100 ml de medios BPX suplementados con 10 micro g/ml de canamicina en un matraz de agitación de 500 ml.

Composición de medio BPX:

20 [0210]

|    |   |     |     |
|----|---|-----|-----|
|    | Almidón de patata                                     | 100 | g/l |
|    | Harina de cebada                                      | 50  | g/l |
|    | BAN 5000 SKB  | 0,1 | g/l |
|    | Caseinato sódico                                      | 10  | g/l |
| 25 | Harina de soja  | 20  | g/l |
|    | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12H <sub>2</sub> O | 9   | g/l |
|    | Pluronic™   | 0,1 | g/l |

30 [0211] El cultivo se agita a 37°C a 270 r.p.m. durante 5 días.

[0212] Las células y el detrito celular se retiran del caldo de fermentación por centrifugado a 4500 r.p.m. en 20-25 minutos. Después, el sobrenadante se filtra para obtener una solución completamente clara. El filtrado se concentra y se lava en un filtro UF (membrana de corte de 10 000) y el tampón se cambia a 20mM de acetato pH 5,5. El filtrado UF se aplica en una S-sefarosa F.F. y la elución se realiza por elución de paso con 0,2M de NaCl en el mismo tampón. El eluato se dializa contra 10mM de Tris, pH 9,0 y se aplica en una Q-sefarosa F.F. y se eluye con un gradiente lineal de 0-0,3M de NaCl sobre 6 volúmenes de columna. Las fracciones, que contienen la actividad (medida por el ensayo Phadebas) se agrupan, se ajustó el pH a pH 7,5 y el color restante se eliminó por un tratamiento con 0,5% W/vol. de carbón activo en 5 minutos.

40 Determinación de la actividad de alfa-amilasa

1. Ensayo de PHADEBAS®

45 [0213] La actividad de alfa-amilasa se determina por un método que emplea tabletas de PHADEBAS® como sustrato. Las tabletas de PHADEBAS (PHADEBAS® Amylase Test, suministrado por Pharmacia Diagnostic) contienen un polímero de almidón de color azul insoluble entrecruzado que se ha mezclado con albúmina de suero bovino y una sustancia de tampón y se ha transformado en tabletas.

50 [0214] Para cada medición se suspende una tableta en un tubo que contiene 5 ml 50 mM de tampón Britton-Robinson (50 mM de ácido acético, 50 mM de ácido fosfórico, 50 mM de ácido bórico, 0,1 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH ajustado al valor de interés con NaOH). La prueba se realiza en un baño maría a la temperatura de interés. La alfa-amilasa que se va a evaluar se diluye en x ml de 50 mM de tampón Britton-Robinson. Se añade 1 ml de esta solución de alfa-amilasa a los 5 ml 50 mM de tampón Britton-Robinson. El almidón es hidrolizado por la alfa-amilasa, dando fragmentos azules solubles. La absorbancia de la solución azul resultante, medida espectrofotométricamente a 620 nm, es una función de la actividad de alfa-amilasa.

60 [0215] Es importante que la absorbancia de 620 nm medida después 10 o 15 minutos de incubación (tiempo de prueba) esté en el rango de 0,2 a 2,0 unidades de absorbancia a 620 nm. En este rango de absorbancia hay linealidad entre la actividad y la absorbancia (ley de Lambert-Beer). La dilución de la enzima debe por lo tanto ajustarse para cumplir este criterio. Bajo un conjunto específico de condiciones (temp., pH, tiempo de reacción, condiciones de tampón) 1 mg de una alfa-amilasa dada hidrolizará una cantidad determinada de sustrato y se producirá un color azul. La intensidad del color se mide a 620 nm. La absorbancia medida es directamente proporcional a la actividad específica (actividad/mg de proteína de alfa-amilasa pura) de la alfa-amilasa en cuestión bajo el conjunto de condiciones dado.

65 2. Método alternativo (ensayo PNP-G7)

- 5 [0216] La actividad de alfa-amilasa se determina por un método que utiliza el sustrato PNP-G7. PNP-G7, que es una abreviatura de p-nitrofenil-alfa,D-maltoheptaósido, es un oligosacárido bloqueado que puede ser dividido por una endoamilasa. Después de la escisión, la alfa-glucosidasa incluida en el kit asimila el sustrato para liberar una molécula de PNP libre que tiene un color amarillo y, de este modo, se puede medir por espectrofometría visible en  $\lambda=405\text{nm}$ . (400-420 nm.). Los kits que contienen el sustrato PNP-G7 y alfa-glucosidasa son fabricados por Boehringer-Mannheim (nº de catálogo: 1054635).
- 10 [0217] Para preparar el sustrato, se añade una botella de sustrato (BM 1442309) a 5 ml de tampón (BM1442309). Para preparar la alfa-glucosidasa, se añade una botella de alfa-glucosidasa (BM 1462309) a 45 ml de tampón (BM1442309). La solución de trabajo se hace mediante la mezcla de 5 ml de solución de alfa-glucosidasa con 0,5 ml de sustrato.
- 15 [0218] El ensayo se realiza por transformación de 20 micro l de solución enzimática en una placa de microtitulación de 96 pocillos e incubación a 25°C. Se añaden 200 micro l de solución de trabajo, 25°C. La solución se mezcla y se preincuba 1 minuto y se mide la absorción cada 15 seg. durante 3 minutos a OD 405 nm.
- [0219] La pendiente de la curva de absorción en función del tiempo es directamente proporcional a la actividad específica (actividad por mg de enzima) de la alfa-amilasa en cuestión bajo el conjunto de condiciones dado.
- 20 Determinación de la actividad de cutinasa (LU)
- [0220] La actividad de cutinasa se determina como actividad lipolítica determinada utilizando tributirina como sustrato. Este método se basó en la hidrólisis de tributirina por la enzima, y el consumo de álcali se registra como una función de tiempo. Una unidad de lipasa (LU) se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (es decir, a 30°C; pH 7; con goma arábica como emulsionante y tributirina como sustrato) libera 1 micro mol de ácido butírico tituable por minuto. Un folleto AF 95/5 que describe este método analítico con más detalle se encuentra disponible bajo pedido a Novozymes A/S, Dinamarca.
- 25 Determinación de la actividad xilanolítica (FXU)
- 30 [0221] La actividad xilanolítica se puede expresar en unidades FXU, determinadas a pH 6,0 con remazol-xilano (4-O metil-D-glucurono-D-xilano teñido con Remazol azul brillante R, Fluka) como sustrato.
- [0222] Una muestra de xilanasas se incuba con el sustrato de remazol-xilano. El fondo del sustrato teñido no-degradado se precipita por etanol. El color azul restante en el sobrenadante (como determinado espectrofotométricamente a 585 nm) es proporcional a la actividad de xilanasas, y las unidades de xilanasas se determinan luego con respecto a una enzima estándar en condiciones de reacción estándar, es decir, a 50,0°C, pH 6,0 y 30 minutos de tiempo de reacción.
- 35 [0223] Un folleto EB-SM-352,02/01 que describe este método analítico con más detalle se encuentra disponible bajo pedido a Novozymes A/S, Dinamarca.
- 40 Determinación de la actividad celulítica (EGU)
- [0224] La actividad celulítica se puede medir en las unidades de endoglucanasa (EGU), determinadas a pH 6,0 con carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato. Se prepara una solución de sustrato, que contiene 34,0 g/l CMC (Hercules 7 LFD) en 0,1 M de tampón de fosfato a pH 6,0. La muestra enzimática que se va a analizar se disuelve en el mismo tampón. Se mezclan 5 ml de solución de sustrato y 0,15 ml de solución enzimática y se transfieren a un viscosímetro por vibración (p. ej., MIVI 3000 de Sofraser, Francia), con termostato a 40°C durante 30 minutos. Una EGU se define como la cantidad de enzima que reduce la viscosidad a la mitad bajo estas condiciones. La cantidad de muestra de enzima debería ajustarse para proporcionar 0,01-0,02 EGU/ml en la mezcla reactiva. El arco estándar se define como 880 EGU/g.
- 45 [0225] Un folleto EB-SM-0275.02/01 que describe este método analítico con más detalle se encuentra disponible bajo pedido a Novozymes A/S, Dinamarca.
- 50 Determinación de la actividad de amilasa maltogénica (MANU)
- [0226] Una MANU (novo unidad de amilasa maltogénica) se puede definir como la cantidad de enzima requerida para la liberación de un  $\mu\text{mol}$  de maltosa por minuto en una concentración de 10 mg de sustrato de maltotriosa (Sigma M 8378) por ml de 0,1 M de tampón de citrato, pH 5,0 a 37 °C durante 30 minutos.
- 55 Método de esponja y masa
- Procedimiento de esponja y masa:
- 60 Receta
- 65

[0227]

|    |                                |                                    |
|----|--------------------------------|------------------------------------|
|    | Esponja                        | % sobre la base de harina          |
| 5  | Aceite de soja                 | 2,5                                |
|    | Estearoil-2-lactilato de sodio | 0,38                               |
|    | Levadura                       | 5                                  |
|    | Harina de trigo                | 60                                 |
|    | Agua                           | 62                                 |
| 10 | Masa                           | % sobre la base de harina          |
|    | Ácido ascórbico                | se debe optimizar para cada harina |
|    | Azodicarbonamida               | 20 ppm                             |
| 15 | Sal                            | 2                                  |
|    | Jarabe                         | 7 (sustancia seca)                 |
|    | Agua                           | se debe optimizar para cada harina |
|    | Harina de trigo                | 40                                 |
|    | Propionato de calcio + enzimas | 0,25                               |

20

Esponja

[0228] Pesado de ingredientes, adición de levadura, agua, harina, SSL y aceite en el bol mezclador. Mezcla a 90 r.p.m. durante 1 minuto, 150 r.p.m. durante 4 minutos. La esponja se pondera, la temperatura se mide y la esponja se coloca en un bol ~ fermentación 3 horas a 27°C, 86% RH.

25

Masa

[0229] Adición de ingredientes y de la esponja en el bol mezclador. La esponja y los ingredientes se mezclan juntos a 90 r.p.m. durante 9 minutos. Se mide la temperatura, se evalúan las características de la masa, se pesa la masa en pequeñas piezas de 435 g cada una. La masa reposa sobre la mesa durante 10 minutos. La masa se lamina y se moldea. Fermentación durante 55 minutos a 42° C y 86% RH. Se homea el pan a 200°C durante 22 minutos.

30

Afinidad de dominio de unión

35

[0230] La adsorción del dominio de unión al almidón (SBD) sobre el almidón granulado se determina mediante la incubación de cantidades en aumento de SBD (0-3 mg/ml) con almidón de maíz granulado (10 mg/ml) en 5 mM de acetato sódico, pH 3,6 a 4°C durante 16 horas, esencialmente como se describe en Belshaw & Williamson, FEBS Lett. 1990 Sep 3;269(2):350-3. La reacción se termina por centrifugado y la concentración de proteína en el sobrenadante se determina y se sustrae posteriormente de la proteína para dar la cantidad de proteína ligada al almidón.

40

Método general para mutagénesis aleatoria usando el programa DOPE

45

[0231] La mutagénesis aleatoria se puede llevar a cabo por los siguientes pasos:

50

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

60

65

10. Seleccionar las variantes de alfa-amilasa resultantes mediante la detección de las propiedades mejoradas deseadas.

5 Algoritmo dope

[0232] Algoritmos dope adecuados para su uso en el paso 6 son bien conocidos en la técnica. Tal algoritmo es descrito por Tomandl, D. *et al.*, 1997, *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 11:29-38. Otro algoritmo es DOPE (Jensen, LJ, Andersen, KV, Svendsen, A, and Kretzschmar, T (1998) *Nucleic Acids Research* 26:697-702).

10

Ensayos de selección de filtro

[0233] El ensayo puede utilizarse para la selección de variantes que tienen una estabilidad mejorada en un pH alto en comparación con las variantes de enzima progenitora y de alfa-amilasa que tienen una estabilidad mejorada en pH alto y a temperaturas medias en comparación con la enzima progenitora que depende de la configuración de la temperatura de selección.

15

Ensayo de filtro a alto pH

20

[0234] Las bibliotecas de *Bacillus* se colocan en placas en un sándwich de acetato de celulosa (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) - y filtros de nitrocelulosa (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) en placas de agar TY con 10 micro g/ml de canamicina a 37°C durante al menos 21 horas. La capa de acetato de celulosa se encuentra en la placa de agar TY.

25

[0235] Cada sándwich de filtro se marca específicamente con una aguja después de la colocación en placas, pero antes de la incubación, con el objetivo de poder localizar las variantes positivas en el filtro, y el filtro de nitrocelulosa con variantes ligadas se transfiere a un recipiente con tampón de glicina-NaOH, pH 8,6-10,6 y se incuba a temperatura ambiente (se puede alterar de 10°-60°C) durante 15 min. Los filtros de acetato de celulosa con colonias se almacenan en las placas TY a temperatura ambiente hasta su uso. Tras la incubación, la actividad residual se detecta en placas que contiene 1% de agarosa, 0,2% de almidón en el tampón de glicina-NaOH, pH 8,6-10,6. Las placas de ensayo con filtros de nitrocelulosa se marcan de la misma manera que el sándwich de filtro y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de eliminar los filtros, las placas de ensayo se manchan con 10% de solución de Lugol. Las variantes de degradación de almidón se detectan como puntos blancos en el fondo azul oscuro y luego se identifican en las placas de almacenamiento. Las variantes positivas se vuelven a seleccionar dos veces bajo las mismas condiciones de la primera selección.

30

35

Ensayo de filtro a calcio bajo

40

[0236] La biblioteca de *Bacillus* se coloca en placas en un sándwich de acetato de celulosa (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) - y filtros de nitrocelulosa (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) en placas de agar TY con un antibiótico pertinente, por ejemplo, canamicina o cloranfenicol, a 37°C durante al menos 21 horas. La capa de acetato de celulosa se encuentra en la placa de agar TY.

45

[0237] Cada sándwich de filtro se marca específicamente con una aguja después de su colocación en placas, pero antes de la incubación, con el objetivo de poder localizar las variantes positivas en el filtro, y el filtro de nitrocelulosa con variantes ligadas se transfiere a un recipiente con tampón de carbonato/bicarbonato, pH 8,5-10 y con diferentes

|                          | 1 | 2   | 3 | 4   | 5   |
|--------------------------|---|-----|---|-----|-----|
| Alfa-amilasa maltogénica | 0 | 400 | - | 400 | 400 |
| MANU/kg                  |   |     |   |     |     |
| AMY1048 mg/kg            | 0 | -   | 1 | 1   | 3   |
| XYL II FXU/kg            | 0 | -   | - | -   | -   |

50

concentraciones de EDTA (0,001 mM - 100 mM). Los filtros se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. Los filtros de acetato de celulosa con colonias se almacenan en las placas TY a temperatura ambiente hasta su uso. Tras la incubación, la actividad residual se detecta en placas que contienen 1% de agarosa, 0,2% de almidón en tampón de carbonato/bicarbonato pH 8,5-10. Las placas de ensayo con filtros de nitrocelulosa se marcan de la misma manera que el sándwich de filtro y se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la eliminación de los filtros, las placas de ensayo se manchan con 10% de solución Lugol®. Las variantes de degradación de almidón se detectan como puntos blancos en el fondo azul oscuro y luego se identifican en las placas de almacenamiento. Las variantes positivas se vuelven a seleccionar dos veces bajo las mismas condiciones de la primera selección.

55

**Ejemplos**

**Ejemplo 1:**

5

Blandura y humedad de la miga de pan usando AMY1048

[0238] Se horneó pan según el método "Esponja y masa" descrito en la sección "MATERIALES Y MÉTODOS". Se dosificaron las enzimas según la siguiente tabla:

10

Tabla 1: dosificaciones de enzima

Se almacenó el pan a temperatura ambiente hasta su análisis.

15

[0239] La textura y la migración de agua por NMR se midieron en los días 7, 14 y 21. Se llevó a cabo una pequeña evaluación sensorial de blandura y humedad el día 21. Los resultados de las pruebas se presentan en la fig. 1 y la fig. 2.

20

[0240] Las figuras muestran que AMY1048 tiene un efecto significativo sobre la firmeza tanto sola como en combinación con la alfa-amilasa maltogénica, además, la elasticidad es al menos comparable o mejor que la de la alfa-amilasa maltogénica después de 21 días de almacenamiento.

[0241] La fig. 3 muestra el efecto de las enzimas sobre la cantidad de agua libre. La clasificación de la pequeña evaluación sensorial se da en círculos junto a cada curva. La clasificación máxima se da al pan más húmedo.

25

[0242] Los datos NMR sobre agua libre se correlacionan con la humedad percibida de la miga de pan, que se pueden ver en la clasificación de pan de la Tabla 2 más adelante y también se muestran en círculos en el gráfico NMR.

Tabla 2: clasificación de la evaluación sensorial de la humedad de la miga de pan

| Pan N°:                                 | Humedad |
|---|---------|
| Control                                 | 1       |
| AMY1048 1 mg                            | 2       |
| Alfa-amilasa maltogénica + AMY1048 1 mg | 4       |
| Alfa-amilasa maltogénica + AMY1048 3 mg | 5       |
| Alfa-amilasa maltogénica                | 3       |

30

[0243] Los datos muestran que la alfa-amilasa AMY1048 mejora la blandura y la humedad de la miga de pan sola y en combinación con una alfa-amilasa maltogénica.

**Ejemplo 2**

35

[0244] Se realizó la conversión de almidón de trigo granulado en glucosa usando una glucoamilasa (200 AGU/kg DS), una amilasa fúngica ácida (50 AFAU/kg DS) y la alfa-amilasa mostrada en la SEQ ID N°: 2 (100 KNU/kg DS). Se preparó un lodo con 33% de almidón granulado de sólidos secos (DS) añadiendo 247,5 g de almidón de trigo bajo agitación a 502,5 ml de agua. El pH se ajustó con HCl a 4,5. El lodo de almidón granulado se distribuyó en matraces de 100 ml de tapa azul con 75 g en cada matraz. Los matraces se incubaron con agitación magnética en un baño maría a 60°C. A las cero horas, las actividades enzimáticas se dosificaron en los matraces. Se retiraron las muestras después de 24, 46, 70 y 90 horas.

40

[0245] El almidón de sólidos secos total se determinó usando el siguiente método. El almidón se hidrolizó completamente añadiendo una cantidad excesiva de alfa-amilasa (300 KNU/Kg de sólidos secos) y colocando la muestra en un baño de aceite a 95°C durante 45 minutos. Posteriormente, las muestras se enfriaron a 60°C y se añadió una cantidad excesiva de glucoamilasa (600 AGU/kg DS) seguida de incubación durante 2 horas a 60°C.

45

[0246] Los sólidos secos solubles en el hidrolizado de almidón se determinaron por medición del índice de refracción en las muestras después de la filtración a través de un filtro de 0,22 microM. Los perfiles de azúcar se determinaron por HPLC. La composición de azúcar de los hidrolizados de almidón se determinó por HPLC y el rendimiento de glucosa se calculó posteriormente como DX.

50

[0247] Los resultados se muestran en las tablas 3 y 4.

55

Tabla 3. Sólidos secos solubles como porcentaje de sustancia seca total. Enzimas: glucoamilasa, amilasa y alfa-amilasa ácida fúngica (SEQ ID N°: 2).

|         | 24 horas | 46 horas | 70 horas | 90 horas |
|---------|----------|----------|----------|----------|
| Con CBD | 94,1     | 95,2     | 96,9     | 97,1     |

Tabla 4. El DX del hidrolizado soluble: enzimas: glucoamilasa, amilasa ácida fúngica y alfa-amilasa bacteriana con la alfa-amilasa (SEQ ID N°: 2).

|         | 24 horas | 46 horas | 70 horas | 90 horas |
|---------|----------|----------|----------|----------|
| Con CBD | 89,9     | 93,3     | 93,0     | 93,2     |

### Ejemplo 3

#### 10 Desencolado

[0248] Se obtuvo tela de sarga tejida de algodón (270g/m<sup>2</sup> à) de Boras Inc, Suecia. El hilo de urdimbre de este tejido contenía 8% de tamaño de almidón y a base de almidón (% en peso seco/peso de tejido). La tela se cortó en aproximadamente 65 x 25 cm x cm de muestras. Se hizo un tampón de 25 mM, pH 7,0 disolviendo 20,7 gramos de NaHPO<sub>4</sub> H<sub>2</sub> O (Aldrich) en 6 litros de agua desionizada y ajustando el pH con NaOH. Aproximadamente 1 mM de CaCl<sub>2</sub> (Fisher) y 3ml de surfactante Kieralon Jet B (BASF) se adicionaron a la solución tamponada.

[0249] La muestra de tela se sumergió en la solución tamponada (2 litros) durante aproximadamente 30 segundos a 40°C y luego se impregnó mediante una gasa para obtener una absorción de humedad del 100%. La muestra de tela se incubó luego en una cámara de temperatura controlada a 70°C durante 1 hora. Después se lavó a 90°C por cuatro cajas de lavado durante un total 16 minutos. La muestra de tela se secó después al aire.

[0250] Para comprobar el residuo de almidón en la tela, se cortó una muestra y se sumergió en una solución de yodo durante 60 segundos a temperatura ambiente y se enjuagó en agua desionizada durante aproximadamente 10 segundos. Después de escurrir el exceso de agua de la tela, el color azul formado en la muestra de tela se comparó con unas fotos estándar que oscilaban de 1 a 9, donde 1 indicaba color azul fuerte y 9 indicaba color blanco. El número (Tegewa) asignado a la muestra tratada fue 3. La solución de yodo se hizo por disolución de 10 g de yodo de potasio, KI, en 100 ml de agua desionizada primero, luego añadiendo 0,635 g de yodo, J<sub>2</sub>, y disolviendo completamente éste bajo agitación, luego diluyendo con agua desionizada a 800 ml y agregando 200 ml de etanol, 96%, para mejorar la humectación. La solución se almacenó en una botella de vidrio marrón.

### Ejemplo 4

#### Desencolado con AMY1048

[0251] Se usó la misma tela que en el ejemplo 3. La solución tamponada con el CaCl<sub>2</sub> y el surfactante se hizo exactamente del mismo modo que en el ejemplo 3. Además, se añadió 4,8mg/L de amilasa AMY1048 a la solución. La tela se trató y se evaluó usando el mismo procedimiento que en el ejemplo 3. El número Tegewa fue 5, lo que indica una eliminación de almidón mucho mayor de la tela tratada en este ejemplo que en el ejemplo 3.

### Ejemplo 5

#### Desencolado con AMY1048

[0252] Se usó la misma tela que en el ejemplo 3. La solución tamponada con el CaCl<sub>2</sub> y el surfactante se hizo exactamente del mismo modo que en el ejemplo 3. Además, se agregó 12mg/L de amilasa Amyil 1048 a la solución. La tela se trató y se evaluó usando el mismo procedimiento que en el ejemplo 3. El número Tegewa fue 6,5, lo que indica mucha más eliminación de almidón de la tela tratada en este ejemplo que en el ejemplo 4.

#### 50 Listado de secuencias

[0253]

<110> Hoff, Tine Pedersen, Sven Schæfer, Thomas Andersen, Carsten Spendler, Tina Viksø-Nielsen, Anders Liu, Jiyin

<120> Polipéptidos que tienen actividad de alfa-amilasa y polinucleótidos que codifican los mismos

<130> 10474.200-US

<160> 6

<170> Versión de patentIn 3,2

<210> 1

ES 2 425 351 T3

```

<211> 1860
<212> DNA
<213> Bacillus flavothermus

5  <220>
    <221> CDS
    <222> (1)..(1857)
    <223> AMY1048

10 <220>
    <221> sig_peptide
    <222> (1)..(99)

15 <220>
    <221> mat_peptide
    <222> (100)..(1857)

20 <220>
    <221> misc_feature
    <222> (100)..(1551)
    <223> Dominio catalítico

25 <220>
    <221> misc_feature
    <222> (1552)..(1857)
    <223> Dominio de unión de carbohidrato

30 <400>
    1
        atg tcc cta ttc aaa aaa agc ttt ccg tgg att tta tcc cta ctt ctt      48
        Met Ser Leu Phe Lys Lys Ser Phe Pro Trp Ile Leu Ser Leu Leu Leu
            -30                    -25                    -20

        ttg ttt ccg ttt att got cct ttt tcc att caa aca gaa aaa gtc cga      96
        Leu Phe Ser Phe Ile Ala Pro Phe Ser Ile Gln Thr Glu Lys Val Arg
            -15                    -10                    -5

        got gga agt gtg ccg gta aat ggc aca atg atg caa tat ttc gaa tgg      144
        Ala Gly Ser Val Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp
        -1  1                    5                    10                    15
    
```

|   |     |
|---|-----|
| tac ctt cca gac gat gga aca cta tgg acg aaa gta gca aat aac got | 192 |
| Tyr Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Asn Ala |     |
| 20 25 30  |     |
| caa tot tta gog aat ctt ggc att aot gcc ott tgg ctt ccc oot gcc | 240 |
| Gln Ser Leu Ala Asn Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala |     |
| 35 40 45  |     |
| tat aaa gga aca agc agc aqt gac gtt gga tat ggc gtt tat gat tta | 288 |
| Tyr Lys Gly Thr Ser Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu |     |
| 50 55 60  |     |
| tat gac ctt gga gag ttt aat caa aaa gga act gtc cga aca aaa tac | 336 |
| Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr |     |
| 65 70 75  |     |
| ggg aca aaa aca caa tat atc caa gca atc caa gog gcg cat aca gca | 384 |
| Gly Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Thr Ala |     |
| 80 85 90 95   |     |
| ggg atg caa gta tat goa gat gtc gtc ttt aac cat aca gcc ggt goa | 432 |
| Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala |     |
| 100 105 110   |     |
| gat gga aca gaa cta gtc gat goa gta gaa gta aat cct tot gac ogc | 480 |
| Asp Gly Thr Glu Leu Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg |     |
| 115 120 125   |     |
| aat caa gaa ata tca gga aca tat caa atc caa gcg tgg aca aaa ttt | 528 |
| Asn Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe |     |
| 130 135 140   |     |
| gat ttt cct ggt cgt gga aac acc tat tot aqt ttt aaa tgg cgt tgg | 576 |
| Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp |     |
| 145 150 155   |     |
| tat cat ttc gat gga acg gac tgg gat gag aqt aga aaa cta aat ogt | 624 |
| Tyr His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg |     |
| 160 165 170 175   |     |
| att tac aag ttc cgc ggc acg gga aaa gca tgg gat tgg gaa gta gat | 672 |
| Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp |     |
| 180 185 190   |     |
| aca gaa aac ggg aat tat gac tat ctc atg tat gca gat tta gat atg | 720 |
| Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met |     |
| 195 200 205   |     |
| gat cat cca gag gtt gta tcc gaa cta aaa aat tgg gga aag tgg tat | 768 |
| Asp His Pro Glu Val Val Ser Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr |     |
| 210 215 220   |     |
| gta acc aca acc aat atc gac gga ttc ogt ctg gat gca gtg aag cat | 816 |
| Val Thr Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His |     |
| 225 230 235   |     |
| att aaa tat agc ttt ttc cag gac tgg cta tgg tac gta cga acc caa | 864 |
| Ile Lys Tyr Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Thr Gln |     |
| 240 245 250 255   |     |
| aca caa aag cct ctt ttt gcc gtt ggg gaa ttt tgg agc tat gac att | 912 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|------|
| Thr | Gln | Lys | Pro | Leu | Phe | Ala | Val | Gly | Glu | Phe | Trp | Ser | Tyr | Asp | Ile |  |      |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |  |      |
| agc | aag | ttg | cac | aac | tat | att | aca | sag | acg | aac | ggc | tct | atg | tcc | cta |  | 960  |
| Ser | Lys | Leu | His | Asn | Tyr | Ile | Thr | Lys | Thr | Asn | Gly | Ser | Met | Ser | Leu |  |      |
|     |     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |  |      |
| ttc | gat | gcc | ccg | ctg | cat | aac | aat | ttt | tat | ata | gca | tcg | aaa | tca | ggc |  | 1008 |
| Phe | Asp | Ala | Pro | Leu | His | Asn | Asn | Phe | Tyr | Ile | Ala | Ser | Lys | Ser | Gly |  |      |
|     |     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |  |      |
| ggt | tat | ttt | gat | atg | cgc | aca | tta | ctc | aac | aac | aca | ttg | atg | aaa | gat |  | 1056 |
| Gly | Tyr | Phe | Asp | Met | Arg | Thr | Leu | Leu | Asn | Asn | Thr | Leu | Met | Lys | Asp |  |      |
|     | 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     |  |      |
| cag | cct | aca | tta | gca | gtc | aca | tta | gtg | gat | aat | cac | gat | act | gag | cca |  | 1104 |
| Gln | Pro | Thr | Leu | Ala | Val | Thr | Leu | Val | Asp | Asn | His | Asp | Thr | Glu | Pro |  |      |
| 320 |     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |  |      |
| ggg | caa | tot | ctg | cag | tca | tgg | gtc | gag | cca | tgg | ttt | aaa | ccg | tta | gct |  | 1152 |
| Gly | Gln | Ser | Leu | Gln | Ser | Trp | Val | Glu | Pro | Trp | Phe | Lys | Pro | Leu | Ala |  |      |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     |     | 350 |     |  |      |
| tac | gca | ttt | atc | ttg | acc | ogc | caa | gaa | ggt | tat | cct | tgc | gtc | ttt | tat |  | 1200 |
| Tyr | Ala | Phe | Ile | Leu | Thr | Arg | Gln | Glu | Gly | Tyr | Pro | Cys | Val | Phe | Tyr |  |      |
|     |     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |  |      |
| gga | gat | tac | tat | ggt | att | cca | aaa | tac | aac | att | cct | gog | ctg | aaa | agc |  | 1248 |
| Gly | Asp | Tyr | Tyr | Gly | Ile | Pro | Lys | Tyr | Asn | Ile | Pro | Ala | Leu | Lys | Ser |  |      |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |  |      |
| aaa | ctt | gat | ccg | ctg | tta | att | gcc | aga | aga | gat | tat | goc | tat | gga | aca |  | 1296 |
| Lys | Leu | Asp | Pro | Leu | Leu | Ile | Ala | Arg | Arg | Asp | Tyr | Ala | Tyr | Gly | Thr |  |      |
|     | 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     |  |      |
| cag | cac | gac | tat | att | gac | agt | gog | gat | att | atc | ggt | tgg | acg | cgg | gaa |  | 1344 |
| Gln | His | Asp | Tyr | Ile | Asp | Ser | Ala | Asp | Ile | Ile | Gly | Trp | Thr | Arg | Glu |  |      |
| 400 |     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |  |      |
| gga | gtg | gct | gaa | aaa | gca | aat | tca | gga | ctg | gct | gca | ctc | att | acc | gac |  | 1392 |
| Gly | Val | Ala | Glu | Lys | Ala | Asn | Ser | Gly | Leu | Ala | Ala | Leu | Ile | Thr | Asp |  |      |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     |     | 430 |     |  |      |
| ggg | cct | ggc | gga | agc | aaa | tgg | atg | tat | gtt | gga | aaa | caa | cac | gct | ggc |  | 1440 |
| Gly | Pro | Gly | Gly | Ser | Lys | Trp | Met | Tyr | Val | Gly | Lys | Gln | His | Ala | Gly |  |      |
|     |     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |  |      |
| aaa | acg | ttt | tat | gat | tta | acc | ggc | aat | cga | agt | gat | aca | gtg | aca | atc |  | 1488 |
| Lys | Thr | Phe | Tyr | Asp | Leu | Thr | Gly | Asn | Arg | Ser | Asp | Thr | Val | Thr | Ile |  |      |
|     |     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |  |      |
| aat | gct | gat | gga | tgg | gga | gaa | ttt | aaa | gtc | aat | gga | ggg | tct | gta | tcc |  | 1536 |
| Asn | Ala | Asp | Gly | Trp | Gly | Glu | Phe | Lys | Val | Asn | Gly | Gly | Ser | Val | Ser |  |      |
|     | 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     |  |      |
| ata | tgg | gtt | cca | aaa | ata | tca | acc | ect | tcc | caa | ata | aca | ttt | act | gta |  | 1584 |
| Ile | Trp | Val | Pro | Lys | Ile | Ser | Thr | Thr | Ser | Gln | Ile | Thr | Phe | Thr | Val |  |      |
| 480 |     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |  |      |
| aat | aac | gcc | aca | acc | gtt | tgg | gga | caa | aat | gta | tac | ggt | gtc | ggg | aat |  | 1632 |
| Asn | Asn | Ala | Thr | Thr | Val | Trp | Gly | Gln | Asn | Val | Tyr | Val | Val | Gly | Asn |  |      |

ES 2 425 351 T3

| 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |     |     |     |      |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| att | tog | cag | ctg | ggg | aac | tgg | gat | cca | gtc | cac | gca | gtt | caa | atg | acg | 1680 |
| Ile | Ser | Gln | Leu | Gly | Asn | Trp | Asp | Pro | Val | His | Ala | Val | Gln | Met | Thr |      |
|     |     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |      |
| cag | tct | tct | tat | cca | aca | tgg | act | gta | aca | atc | cct | ctt | ctt | caa | ggg | 1728 |
| Pro | Ser | Ser | Tyr | Pro | Thr | Trp | Thr | Val | Thr | Ile | Pro | Leu | Leu | Gln | Gly |      |
|     |     |     | 530 |     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |      |
| caa | aac | ata | caa | ttt | aaa | ttt | atc | aaa | aaa | gat | tca | gct | gga | aat | gtc | 1776 |
| Gln | Asn | Ile | Gln | Phe | Lys | Phe | Ile | Lys | Lys | Asp | Ser | Ala | Gly | Asn | Val |      |
|     |     |     | 545 |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |      |
| att | tgg | gea | gat | ata | tog | aat | oga | aca | tac | acc | gtc | cca | act | gct | gca | 1824 |
| Ile | Trp | Glu | Asp | Ile | Ser | Asn | Arg | Thr | Tyr | Thr | Val | Pro | Thr | Ala | Ala |      |
|     |     |     | 560 |     |     |     | 565 |     |     |     | 570 |     |     |     | 575 |      |
| tcc | gga | gca | tat | aca | gcc | agc | tgg | aac | gtg | ccc | tag |     |     |     |     | 1860 |
| Ser | Gly | Ala | Tyr | Thr | Ala | Ser | Trp | Asn | Val | Pro |     |     |     |     |     |      |
|     |     |     |     | 580 |     |     |     |     | 585 |     |     |     |     |     |     |      |

<210> 2

<211> 619

<212> PRT

5 <213> Bacillus flavothermus

<400>

2

ES 2 425 351 T3

Met Ser Leu Phe Lys Lys Ser Phe Pro Trp Ile Leu Ser Leu Leu Leu  
 -30 -25 -20

Leu Phe Ser Phe Ile Ala Pro Phe Ser Ile Gln Thr Glu Lys Val Arg  
 -15 -10 -5

Ala Gly Ser Val Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp  
 -1 1 5 10 15

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

Gln Ser Leu Ala Asn Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala  
 35 40 45

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

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

Gly Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Thr Ala  
 80 85 90 95

ES 2 425 351 T3

Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala  
 100 105 110

Asp Gly Thr Glu Leu Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg  
 115 120 125

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

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

Tyr His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg  
 160 165 170 175

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

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

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

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

Ile Lys Tyr Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Thr Gln  
 240 245 250 255

Thr Gln Lys Pro Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Ile  
 260 265 270

Ser Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ser Met Ser Leu  
 275 280 285

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

Gly Tyr Phe Asp Met Arg Thr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp  
 305 310 315

Gln Pro Thr Leu Ala Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro  
 320 325 330 335

ES 2 425 351 T3

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

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

Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Ala Leu Lys Ser  
 370 375 380

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

Gln His Asp Tyr Ile Asp Ser Ala Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
 400 405 410 415

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

Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly  
 435 440 445

Lys Thr Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile  
 450 455 460

Asn Ala Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
 465 470 475

Ile Trp Val Pro Lys Ile Ser Thr Thr Ser Gln Ile Thr Phe Thr Val  
 480 485 490 495

Asn Asn Ala Thr Thr Val Trp Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn  
 500 505 510

Ile Ser Gln Leu Gly Asn Trp Asp Pro Val His Ala Val Gln Met Thr  
 515 520 525

Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Trp Thr Val Thr Ile Pro Leu Leu Gln Gly  
 530 535 540

Gln Asn Ile Gln Phe Lys Phe Ile Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val  
 545 550 555

Ile Trp Glu Asp Ile Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ala Ala  
 560 565 570 575

Ser Gly Ala Tyr Thr Ala Ser Trp Asn Val Pro  
 580 585

<210> 3  
<211> 1728  
<212> DNA  
<213> Especie Bacillus  
5  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1725)  
<223> AMY1039  
10  
<220>  
<221> sig\_peptide  
<222> (1)..(99)  
  
<220>  
15  
<221> mat\_peptide  
<222> (100)..(1725)  
  
<220>  
20  
<221> misc\_feature  
<222> (100)..(1551)  
<223> Dominio catalítico  
  
<220>  
25  
<221> misc\_feature  
<222> (1552)..(1725)  
<223> Dominio de unión  
  
<400>  
3

ES 2 425 351 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| atg | tcg | cta | ttc | aaa | aaa | atc | ttt | cgg | tgg | att | tta | tcg | cta | ott | ott | 48  |
| Met | Ser | Leu | Phe | Lys | Lys | Ile | Phe | Pro | Trp | Ile | Leu | Ser | Leu | Leu | Leu |     |
|     |     |     | -30 |     |     |     |     | -25 |     |     |     |     | -20 |     |     |     |
| ttg | ttt | ttg | ttt | att | gct | cct | ttt | tcg | att | caa | aca | gaa | aaa | gtc | oga | 96  |
| Leu | Phe | Leu | Phe | Ile | Ala | Pro | Phe | Ser | Ile | Gln | Thr | Glu | Lys | Val | Arg |     |
|     |     | -15 |     |     |     |     | -10 |     |     |     |     | -5  |     |     |     |     |
| gct | gga | agt | gtg | cgg | gta | aat | ggc | aca | atg | atg | caa | tat | ttc | gaa | tgg | 144 |
| Ala | Gly | Ser | Val | Pro | Val | Asn | Gly | Thr | Met | Met | Gln | Tyr | Phe | Glu | Trp |     |
| -1  | 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| tao | ott | cca | gac | gat | gga | aca | cta | tgg | acg | aaa | gta | gca | aat | sac | gcc | 192 |
| Tyr | Leu | Pro | Asp | Asp | Gly | Thr | Leu | Trp | Thr | Lys | Val | Ala | Asn | Asn | Ala |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| caa | tot | tta | ggg | aat | ctc | ggc | att | act | gcc | ott | tgg | ott | ccc | cct | gcc | 240 |
| Gln | Ser | Leu | Ala | Asn | Leu | Gly | Ile | Thr | Ala | Leu | Trp | Leu | Pro | Pro | Ala |     |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| tat | aaa | gga | aca | agc | agc | agt | gac | gtt | gga | tat | ggg | gtt | tat | gat | tta | 288 |
| Tyr | Lys | Gly | Thr | Ser | Ser | Ser | Asp | Val | Gly | Tyr | Gly | Val | Tyr | Asp | Leu |     |
|     |     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| tat | gac | ott | gga | gag | ttt | aat | caa | aaa | gga | act | gtc | oga | aca | aaa | tac | 336 |
| Tyr | Asp | Leu | Gly | Glu | Phe | Asn | Gln | Lys | Gly | Thr | Val | Arg | Thr | Lys | Tyr |     |
|     | 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     |     |

|   |      |
|---|------|
| ggg aca aaa aca caa tat atc caa gca atc caa gcg gcg cat aca gca | 384  |
| Gly Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Thr Ala |      |
| 80 85 90 95   |      |
| ggg atg caa gta tat gca gat gtc gtc ttt aac cat aaa gcc ggt gca | 432  |
| Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala |      |
| 100 105 110   |      |
| gat gga aca gaa cta gtc gat gca gta gaa gta aat cct tot gac cgc | 480  |
| Asp Gly Thr Glu Leu Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg |      |
| 115 120 125   |      |
| aat caa gaa ata tca gga aca tat caa atc caa gcg tgg aca aaa ttt | 528  |
| Asn Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe |      |
| 130 135 140   |      |
| gat ttt cct ggt cgt gga aac acc tat tot agt ttt aaa tgg cgt tgg | 576  |
| Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp |      |
| 145 150 155   |      |
| tat cat ttc gat gga acg gac tgg gat gag agt aga aca cta aat cgt | 624  |
| Tyr His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg |      |
| 160 165 170 175   |      |
| att tac aag ttc cgc ggc acg gga aaa gca tgg gat tgg gaa gta gat | 672  |
| Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp |      |
| 180 185 190   |      |
| aca gaa aac ggg aat tat gac tat ctc atg tat gca gat tta gat atg | 720  |
| Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met |      |
| 195 200 205   |      |
| gat cat cca gag gtt gta tcc gaa cta aca aat tgg gga aag tgg tat | 768  |
| Asp His Pro Glu Val Val Ser Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr |      |
| 210 215 220   |      |
| gta acc aca acc aat atc gac gga ttc cgt ctg gat gca gtg aag cat | 816  |
| Val Thr Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His |      |
| 225 230 235   |      |
| att aca tat agc ttt ttc ccg gac tgg cta tog tac gta cga acc caa | 864  |
| Ile Lys Tyr Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Thr Gln |      |
| 240 245 250 255   |      |
| aca caa aag cct ctt ttt gcc gtt ggg gaa ttt tgg agc tat gac att | 912  |
| Thr Gln Lys Pro Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Ile |      |
| 260 265 270   |      |
| agc aag ctg cac aac tat att aca aag acg aac ggc tct atg tcc cta | 960  |
| Ser Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ser Met Ser Leu |      |
| 275 280 285   |      |
| ttc gat gcc ccg ctg cat aac aat ttt tat ata gca tcc aaa tca ggc | 1008 |
| Phe Asp Ala Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Ile Ala Ser Lys Ser Gly |      |
| 290 295 300   |      |
| ggt tat ttt gat atg cgc aca tta ctc aac aac aca ttg atg aaa gat | 1056 |
| Gly Tyr Phe Asp Met Arg Thr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp |      |
| 305 310 315   |      |
| cag cct aca tta gca gtc aca tta gtg gat aat cac gat act gag cca | 1104 |



ES 2 425 351 T3

Met Ser Leu Phe Lys Lys Ile Phe Pro Trp Ile Leu Ser Leu Leu Leu  
 -30 -25 -20

Leu Phe Leu Phe Ile Ala Pro Phe Ser Ile Gln Thr Glu Lys Val Arg  
 -15 -10 -5

Ala Gly Ser Val Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp  
 -1 1 5 10 15

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

Gln Ser Leu Ala Asn Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala  
 35 40 45

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

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

Gly Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Thr Ala  
 80 85 90 95

Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala  
 100 105 110

Asp Gly Thr Glu Leu Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg  
 115 120 125

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

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

Tyr His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg  
 160 165 170 175

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

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

ES 2 425 351 T3

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

ES 2 425 351 T3

Lys Thr Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile  
 450 455 460

Asn Ala Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
 465 470 475

Ile Trp Val Pro Lys Thr Ser Thr Thr Ser Gln Ile Thr Phe Thr Val  
 480 485 490 495

Asn Asn Ala Thr Thr Val Trp Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn  
 500 505 510

Ile Ser Gln Leu Gly Asn Trp Asp Pro Val Asn Ala Val Gln Met Thr  
 515 520 525

Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Trp Val Val Thr Val Pro Leu Pro Gln  
 530 535 540

- <210> 5
- <211> 1842
- <212> DNA
- 5 <213> Especie Bacillus
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1839)
- 10 <223> AMY1079
- <220>
- <221> sig\_peptide
- <222> (1)..(90)
- 15 <220>
- <221> mat\_peptide
- <222> (91)..(1839)
- 20 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (91)..(1452)
- <223> Dominio catalítico
- 25 <220>
- <221> misc\_feature
- <222> (1453)..(1839)
- <223> Dominio de unión
- 30 <400>
- 5

ES 2 425 351 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| atg | agt | tat | ttg | aaa | aaa | gtg | tgg | ttg | tat | tac | acc | atc | atc | gct | acc | 48 |
| Met | Ser | Tyr | Leu | Lys | Lys | Val | Trp | Leu | Tyr | Tyr | Thr | Ile | Ile | Ala | Thr |    |
| -30 |     |     |     | -25 |     |     |     |     |     | -20 |     |     |     | -15 |     |    |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
| tta | atc | att | tcc | ttt | ttc | aca | ccc | ttc | tca | act | gca | caa | gag | aac | acc | 96 |
| Leu | Ile | Ile | Ser | Phe | Phe | Thr | Pro | Phe | Ser | Thr | Ala | Gln | Ala | Asn | Thr |    |
|     |     |     |     | -10 |     |     |     |     | -5  |     |     |     | -1  | 1   |     |    |

ES 2 425 351 T3

|   |     |
|---|-----|
| gca cca gtc aac gga acg atg atg caa tat ttc gaa tgg gat tta ccg<br>Ala Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Asp Leu Pro<br>5 10 15         | 144 |
| aat gat ggc aca ctt tgg acg aaa gta aaa aac gaa gca agc agt ctt<br>Asn Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Lys Asn Glu Ala Ser Ser Leu<br>20 25 30        | 192 |
| tct gct tta ggt att act gcc tta tgg ttg cca cct gca tac aaa gga<br>Ser Ala Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys Gly<br>35 40 45 50     | 240 |
| aca agc caa gcg gat gtc ggg tat ggc gtg tac gat ttg tat gac cta<br>Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu<br>55 60 65        | 288 |
| ggg gaa ttt aat caa aaa ggg acg att cga acg aaa tac gga aca aaa<br>Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys<br>70 75 80        | 336 |
| acg caa tat tta caa gct att cag gcg gca aaa agc gct ggt atg caa<br>Thr Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Lys Ser Ala Gly Met Gln<br>85 90 95        | 384 |
| gta tat gcc gat gtc gta ttt aac cat aag gca ggg gcg gat agt aca<br>Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ser Thr<br>100 105 110     | 432 |
| gaa tgg gtt gac gca gtc gaa gtg aat cct tct sec cga aat caa gaa<br>Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asn Arg Asn Gln Glu<br>115 120 125 130 | 480 |
| aca tct ggc aca tat caa att caa gca tgg acc aaa ttt gac ttc cct<br>Thr Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe Pro<br>135 140 145     | 528 |
| ggt cgc gga aac aca tac tca agc ttc aaa tgg cgc tgg tat cat ttt<br>Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His Phe<br>150 155 160     | 576 |
| gac ggt acg gat tgg gat gaa agc cga aaa cta aat cgc att tac aaa<br>Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys<br>165 170 175     | 624 |
| ttt cgt ggc aca gga aaa gca tgg gat tgg gag gta gac aca gag aac<br>Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu Asn<br>180 185 190     | 672 |
| gga aac tat gac tac tta atg ttt gct gat tta gac atg gat cac cct<br>Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Phe Ala Asp Leu Asp Met Asp His Pro<br>195 200 205 210 | 720 |
| gaa gtt gta gcc gag ttg aaa aac tgg gga aaa tgg tat gtg aac aca<br>Glu Val Val Ala Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn Thr<br>215 220 225     | 768 |
| acg aac gta gac gga ttt cgc tta gat gcg gtg aaa cat atc aaa tat<br>Thr Asn Val Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Tyr<br>230 235 240     | 816 |

ES 2 425 351 T3

|   |      |
|---|------|
| agc ttt ttc cct gac tgg ctg tca tat gta cgt aat caa aca ggg aaa | 864  |
| Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Asn Gln Thr Gly Lys |      |
| 245 250 255   |      |
| aat tta ttt gcc gtc ggt gaa ttt tgg ggc tat gac gtc aat aaa ctg | 912  |
| Asn Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Gly Tyr Asp Val Asn Lys Leu |      |
| 260 265 270   |      |
| cat aac tac att aca aaa acg aat ggg gct atg tca tta ttc gat gcc | 960  |
| His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ala Met Ser Leu Phe Asp Ala |      |
| 275 280 285 290   |      |
| ccg ttg cat aac aac ttt tat att gct tca aaa tca agt ggt tac ttt | 1008 |
| Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Ile Ala Ser Lys Ser Ser Gly Tyr Phe |      |
| 295 300 305   |      |
| gac atg cgt tat ttg ttg aat aac acg cta atg aaa gac caa ccg gca | 1056 |
| Asp Met Arg Tyr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro Ala |      |
| 310 315 320   |      |
| cta gca gtc aca ctt gtt gac aac oat gac aca cag cct ggt caa tct | 1104 |
| Leu Ala Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser |      |
| 325 330 335   |      |
| ttg caa tet tgg gta gag cct tgg ttt aaa cca ctt gct tac gcc ttt | 1152 |
| Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe |      |
| 340 345 350   |      |
| att tta acg aga caa gaa ggg tat cca tgt gta ttt tac ggc gac tac | 1200 |
| Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp Tyr |      |
| 355 360 365 370   |      |
| tac ggc att cca aaa tac aat att cca ggc tta aaa agc aaa atc gat | 1248 |
| Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Gly Leu Lys Ser Lys Ile Asp |      |
| 375 380 385   |      |
| cca ctt ctt att gca cgt aga gac tac gca tac gga acg cag cgc gat | 1296 |
| Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Asp |      |
| 390 395 400   |      |
| tat atc gat cac caa gat att atc ggc tgg acg cgc gaa gga ata gac | 1344 |
| Tyr Ile Asp His Gln Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ile Asp |      |
| 405 410 415   |      |
| gca aaa cca aac tot gga ctc gca gct tta att act gac ggc cct ggt | 1392 |
| Ala Lys Pro Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly |      |
| 420 425 430   |      |
| gga agc aag tgg atg tat gta ggg aaa aga cat gct gga aaa gtg ttt | 1440 |
| Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Arg His Ala Gly Lys Val Phe |      |
| 435 440 445 450   |      |
| tac gat ctc act gga aat cga agc gat aca gta aca att aac gca gac | 1488 |
| Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ala Asp |      |
| 455 460 465   |      |
| ggc tgg gga gag ttc aaa gtc aac gga ggc tcc gtc tca att tgg gtt | 1536 |
| Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Trp Val |      |
| 470 475 480   |      |
| gcg aaa act tca aac gta aca ttt acc gtc aac aac gca acg aca gta | 1584 |

ES 2 425 351 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|--|
| Ala | Lys | Thr | Ser | Asn | Val | Thr | Phe | Thr | Val | Asn | Asn | Ala | Thr | Thr | Val |      |  |
|     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |     |     |      |  |
| tat | gga | caa | aac | gta | tat | gtt | ggt | gga | aat | att | cca | gag | cta | ggg | aac | 1632 |  |
| Tyr | Gly | Gln | Asn | Val | Tyr | Val | Val | Gly | Asn | Ile | Pro | Glu | Leu | Gly | Asn |      |  |
|     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     | 510 |     |     |     |     |      |  |
| tgg | aac | ata | gcg | aat | gct | att | caa | atg | aca | cca | tct | tct | tat | ccg | aca | 1680 |  |
| Trp | Asn | Ile | Ala | Asn | Ala | Ile | Gln | Met | Thr | Pro | Ser | Ser | Tyr | Pro | Thr |      |  |
| 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |     | 530 |      |  |
| tgg | aaa | aca | act | ggt | tcc | ttg | cct | caa | gga | aaa | gca | att | gag | ttt | aag | 1728 |  |
| Trp | Lys | Thr | Thr | Val | Ser | Leu | Pro | Gln | Gly | Lys | Ala | Ile | Glu | Phe | Lys |      |  |
|     |     |     |     | 535 |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     | 545 |     |      |  |
| ttt | att | aag | aaa | gac | agt | gca | gga | aac | ggt | ata | tgg | gaa | aac | ata | gcc | 1776 |  |
| Phe | Ile | Lys | Lys | Asp | Ser | Ala | Gly | Asn | Val | Ile | Trp | Glu | Asn | Ile | Ala |      |  |
|     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |     |     |      |  |
| aat | cga | acg | tat | acg | ggt | ccg | ttc | toa | toa | aca | gga | tca | tat | acc | gca | 1824 |  |
| Asn | Arg | Thr | Tyr | Thr | Val | Pro | Phe | Ser | Ser | Thr | Gly | Ser | Tyr | Thr | Ala |      |  |
|     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     | 575 |     |     |     |      |  |
| aac | tgg | aac | gtg | cca | taa |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 1842 |  |
| Asn | Trp | Asn | Val | Pro |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |
|     |     | 580 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |      |  |

<210> 6

<211> 613

<212> PRT

5 <213> Especie Bacillus

<400>

6

ES 2 425 351 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Ser | Tyr | Leu | Lys | Lys | Val | Trp | Leu | Tyr | Tyr | Thr | Ile | Ile | Ala | Thr |
| -30 |     |     |     |     | -25 |     |     |     |     | -20 |     |     |     |     | -15 |
| Leu | Ile | Ile | Ser | Phe | Phe | Thr | Pro | Phe | Ser | Thr | Ala | Gln | Ala | Asn | Thr |
|     |     |     |     | -10 |     |     |     |     | -5  |     |     |     | -1  | 1   |     |
| Ala | Pro | Val | Asn | Gly | Thr | Met | Met | Gln | Tyr | Phe | Glu | Trp | Asp | Leu | Pro |
|     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |     |
| Asn | Asp | Gly | Thr | Leu | Trp | Thr | Lys | Val | Lys | Asn | Glu | Ala | Ser | Ser | Leu |
|     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |     |     |
| Ser | Ala | Leu | Gly | Ile | Thr | Ala | Leu | Trp | Leu | Pro | Pro | Ala | Tyr | Lys | Gly |
| 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     | 50  |
| Thr | Ser | Gln | Ala | Asp | Val | Gly | Tyr | Gly | Val | Tyr | Asp | Leu | Tyr | Asp | Leu |
|     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     | 65  |     |
| Gly | Glu | Phe | Asn | Gln | Lys | Gly | Thr | Ile | Arg | Thr | Lys | Tyr | Gly | Thr | Lys |
|     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |     |     |

ES 2 425 351 T3

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

Leu Ala Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser  
 325 330 335  
 Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe  
 340 345 350  
 Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp Tyr  
 355 360 365 370  
 Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Gly Leu Lys Ser Lys Ile Asp  
 375 380 385  
 Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Asp  
 390 395 400  
 Tyr Ile Asp His Gln Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ile Asp  
 405 410 415  
 Ala Lys Pro Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly  
 420 425 430  
 Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Arg His Ala Gly Lys Val Phe  
 435 440 445 450  
 Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ala Asp  
 455 460 465  
 Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Trp Val  
 470 475 480  
 Ala Lys Thr Ser Asn Val Thr Phe Thr Val Asn Asn Ala Thr Thr Val  
 485 490 495  
 Tyr Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn Ile Pro Glu Leu Gly Asn  
 500 505 510  
 Trp Asn Ile Ala Asn Ala Ile Gln Met Thr Pro Ser Ser Tyr Pro Thr  
 515 520 525 530  
 Trp Lys Thr Thr Val Ser Leu Pro Gln Gly Lys Ala Ile Glu Phe Lys  
 535 540 545  
 Phe Ile Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val Ile Trp Glu Asn Ile Ala  
 550 555 560  
 Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Phe Ser Ser Thr Gly Ser Tyr Thr Ala  
 565 570 575  
 Asn Trp Asn Val Pro  
 580

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Polipéptido que tiene actividad de alfa-amilasa y afinidad de enlace de carbohidrato, donde dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 99% de identidad con los aminoácidos 1 a 586 de SEQ ID N°: 2.
- 10 2. Polinucleótido que tiene una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 99% de identidad con la secuencia de los nucleótidos 100 a 1857 de SEQ ID N°: 1 y codifica para el polipéptido definido en la reivindicación 1.
- 15 3. Constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de nucleótidos definida en la reivindicación 2, operativamente enlazada a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped adecuado.
- 20 4. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos definido en la reivindicación 3.
- 25 5. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos definido en la reivindicación 3 o vector de expresión recombinante definido en la reivindicación 4.
- 30 6. Composición que comprende el polipéptido según la reivindicación 1 y, opcionalmente, una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una celulasa, tal como una endoglucanasa, una lipasa, una cutinasa, una oxidorreductasa, una proteasa, otra amilasa, una hemicelulasa, tal como una mananasa, una xilanasa, una galactanasa, una arabinofuranosidasa, una esterasa, una liquenasa, una arabinanasa, una pectato liasa y una mezcla de las mismas.
- 35 7. Uso del polipéptido según la reivindicación 1 o una composición según la reivindicación 6 para tratar tejidos, telas, hilo o prendas, por ejemplo, para desencolado de tejidos, telas, hilo o prendas.
8. Uso del polipéptido según la reivindicación 1 en masas, por ejemplo, para mejorar la elasticidad, la consistencia, la blandura y/o la humedad de la miga de pan de un producto de homeado.
9. Uso del polipéptido según la reivindicación 1 en una composición de detergente, en particular una composición de detergente para lavado de ropa y una composición de detergente para lavado de vajilla.
10. Uso del polipéptido según la reivindicación 1 para licuefacción de almidón.
11. Uso del polipéptido según la reivindicación 1 en la producción de etanol.

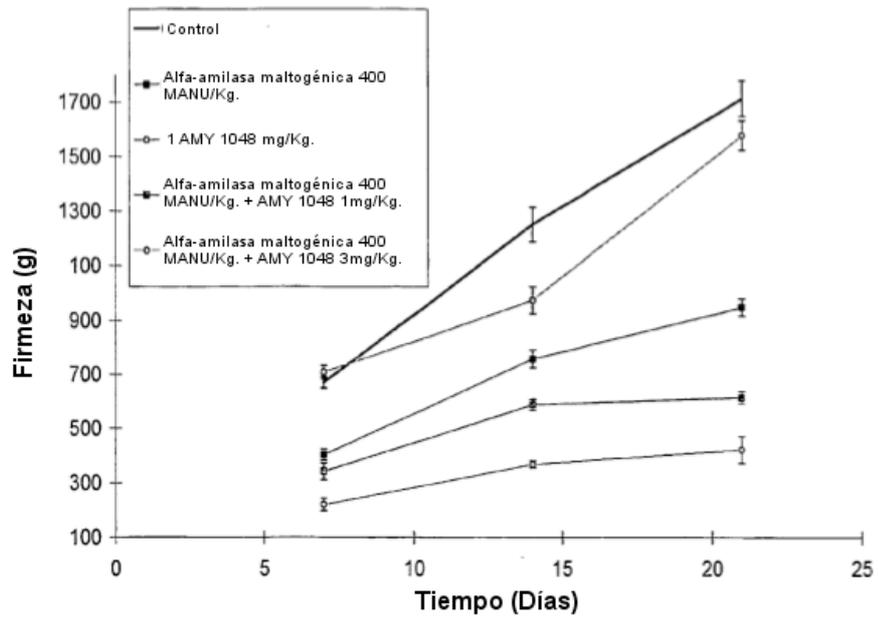


Fig. 1

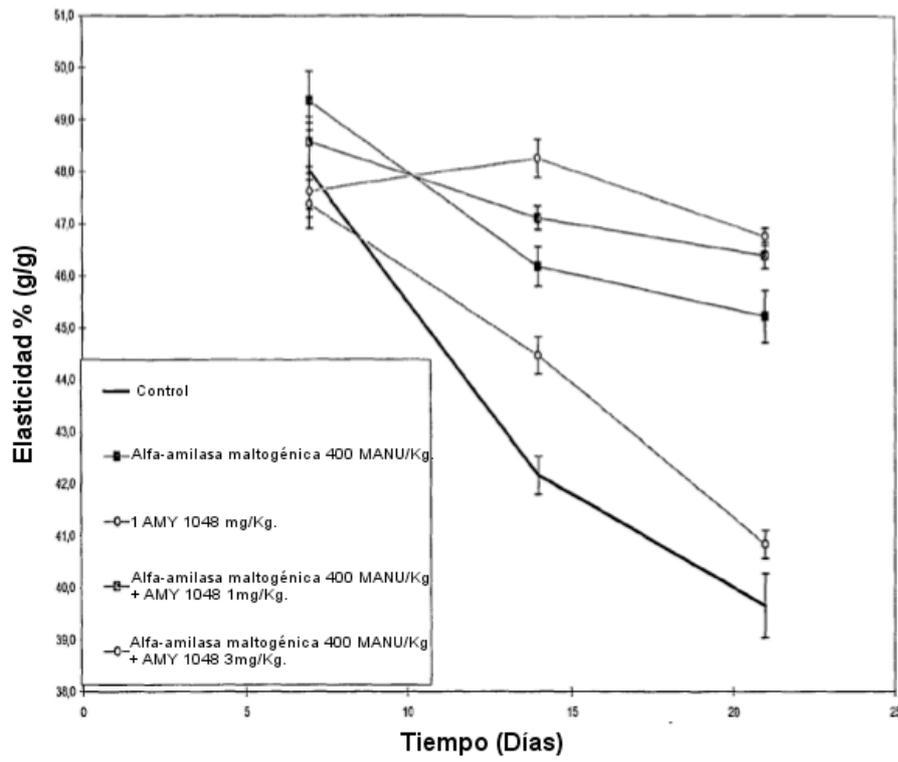


Fig. 2

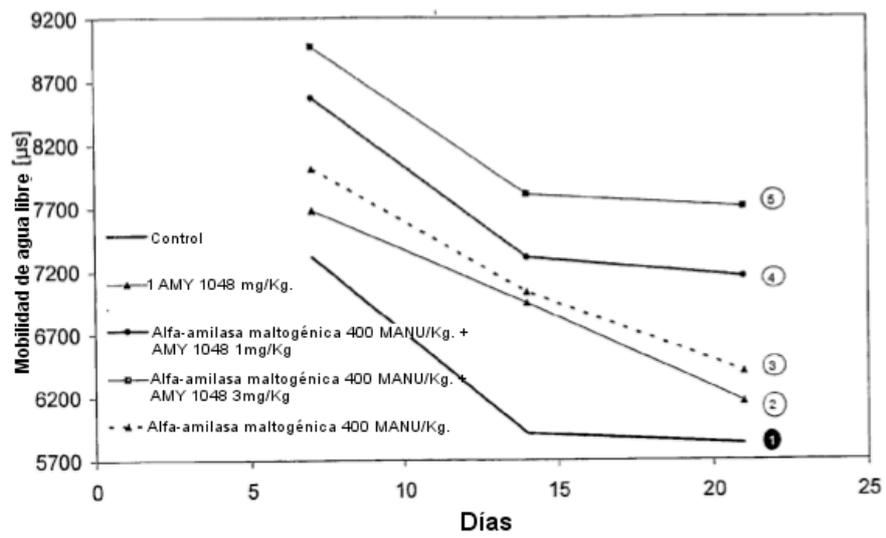


Fig. 3