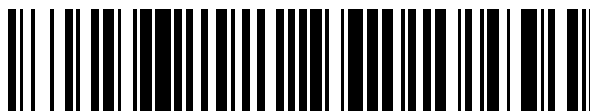


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 519**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/28** (2006.01)

**C11D 3/386** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.1997 E 97920604 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2013 EP 0904360**

54 Título: **Mutantes de alfa-amilasa**

30 Prioridad:

**30.04.1996 DK 51596**

**28.06.1996 DK 71296**

**11.07.1996 DK 77596**

**08.11.1996 DK 126396**

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

**04.12.2013**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)**

**Krogshøjvej 36**

**2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**SVENDSEN, ALLAN;**

**BORCHERT, TORBEN VEDEL y**

**BISGARD-FRANTZEN, HENRIK**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 432 519 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Mutantes de alfa-amilasa

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere, entre otras cosas, a variantes nuevas de  $\alpha$ -amilasas progenitoras tipo Termamyl, en particular a variantes que presentan alteraciones en una o más propiedades (con respecto a la progenitora) que son ventajosas con respecto a las aplicaciones de las variantes, en particular, en el tratamiento del almidón industrial (p. ej., licuefacción o sacarificación del almidón).

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Las  $\alpha$ -amilasas ( $\alpha$ -1,4-glucan-4-glucanohidrolasas, EC 3,2,1,1) constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del almidón y otros oligo y polisacáridos 1,4-glucosídicos lineales y ramificados, y existe una muy amplia bibliografía científica y de patentes relativa a esta clase de enzimas muy importantes industrialmente.

[0003] Entre las descripciones más recientes en relación a las  $\alpha$ -amilasas, el documento WO 96/23874 proporciona datos estructurales de cristales tridimensionales por rayos X para una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl que consiste en 300 residuos de aminoácidos N-terminales de  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 4 en la presente y los aminoácidos 301-483 del extremo C-terminal de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 2 en la presente (estando este último disponible comercialmente con el nombre comercial Termamyl™), y que está por tanto muy relacionada con las  $\alpha$ -amilasas de *Bacillus* industrialmente importantes (que en este contexto se incluyen dentro del significado del término " $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl", y que incluye, entre otros, las  $\alpha$ -amilasas de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. stearothermophilus*). El documento WO 96/23874 también describe la metodología para diseñar, en base a un análisis de la estructura de una  $\alpha$ -amilasa progenitora tipo Termamyl, variantes de la  $\alpha$ -amilasa progenitora tipo Termamyl que presentan propiedades alteradas relativas a la progenitora.

## 30 BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

[0004] Como se ha indicado anteriormente, la presente invención se refieren, entre otras cosas, a nuevas variantes (mutantes) alfa-amilolíticas de una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl, en particular a variantes que presentan propiedades alteradas que son ventajosas con respecto al tratamiento industrial del almidón (licuefacción o sacarificación del almidón y similares).

[0005] Alteraciones en propiedades que se han conseguido en mutantes de la descripción son alteraciones en, por ejemplo, la especificidad de sustrato, unión de sustrato, modelo de segmentación de sustrato, termoestabilidad, pH/perfil de actividad, pH/perfil de estabilidad [tal como estabilidad aumentada en valores de pH bajos (p. ej. pH<6, en particular pH<5) o altos (p. ej. pH>9)], estabilidad hacia oxidación, dependencia de  $Ca^{2+}$ , actividad específica, y otras propiedades de interés. Por ejemplo, la alteración puede suponer una variante que, en comparación con la  $\alpha$ -amilasa progenitora tipo Termamyl, tiene una dependencia reducida de  $Ca^{2+}$  y/o un pH/perfil de actividad alterado.

[0006] La descripción se refiere además, entre otras cosas, a variantes construcciones de ADN que codifican variantes de la invención, a métodos para preparar variantes de la invención, y al uso de variantes de la invención, solas o en combinación con otras enzimas alfa-amilolíticas, en varios procesos industriales, por ejemplo, la licuefacción de almidón.

## DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

50 La  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl

[0007] Es bien conocido que varias  $\alpha$ -amilasas producidas por *Bacillus* spp. son altamente homólogas en el nivel aminoácido. Por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 2 (disponible comercialmente como Termamyl™) se ha descubierto que es aproximadamente un 89% homóloga con la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 4 y aproximadamente un 79% homóloga con la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 6. Otras  $\alpha$ -amilasas homólogas incluyen una  $\alpha$ -amilasa derivada de una cepa de *Bacillus* sp. NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 o DSM 9375, todas ellas aparecen descritas en detalle en el documento WO 95/26397, y la  $\alpha$ -amilasa descrita por Tsukamoto et al., *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 151 (1988), pp. 25-31. Otras  $\alpha$ -amilasas homólogas incluyen una  $\alpha$ -amilasa producida por la cepa de *B. licheniformis* descrita en el documento EP 0252666 (ATCC 27811), y las  $\alpha$ -amilasas identificadas en los documentos

WO 91/00353 y WO 94/18314 . Otras  $\alpha$ -amilasas de *B. licheniformis* tipo Termamyl son Optitherm™ y Takatherm™ (disponibles en Solvay), Maxamyl™ (disponibles en Gist-brocades/Genencor), Spezym AA™ (disponible en Genencor), y Keistase™ (disponible en Daiwa).

5 [0008] Debido a la homología sustancial encontrada entre estas  $\alpha$ -amilasas, se considera que pertenecen a la misma clase de  $\alpha$ -amilasas, concretamente a la clase de " $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl".

[0009] Por tanto, en el contexto presente, el término " $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl" tiene por objetivo indicar una  $\alpha$ -amilasa que, en el nivel de aminoácido, muestra una homología sustancial con el Termamyl™, es decir, la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 2 del presente documento. En otras palabras, una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl es una  $\alpha$ -amilasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 2, n.º 4 o n.º 6 del presente documento, o la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 1 del documento WO 95/26397 (dicha secuencia de aminoácidos se muestra en la Fig. 1 y Fig. 2 del presente documento) o en la SEC ID N.º 2 del documento WO 95/26397 (dicha secuencia de aminoácidos se muestra en la Fig. 2 del presente documento) o en Tsukamoto et al., 1988, (dicha secuencia de aminoácidos se muestra en la Fig. 2 del presente documento) o i) que muestra al menos un 60%, tal como al menos 70%, por ejemplo al menos un 75%, o al menos un 80%, por ejemplo al menos un 85%, al menos un 90% o al menos un 95% de homología con al menos uno de dichas secuencias de aminoácidos y/o ii) muestra reactividad cruzada inmunológica con un anticuerpo producido contra al menos una de dichas  $\alpha$ -amilasas, y/o iii) está codificada por la secuencia de ADN que hibridiza a las secuencias de ADN que codifican las  $\alpha$ -amilasas anteriormente especificadas que son evidentes a partir de las SEQ ID Nos. 1, 3 y 5 de la presente solicitud (dichas secuencias de codificación codifican las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID Nos. 2, 4 y 6 del presente documento, respectivamente), a partir de la SEC ID N.º 4 del documento WO 95/26397 (dicha secuencia de ADN, junto con el codón de parada TAA, se muestran en la Fig. 1 del presente documento y codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la Fig. 1 del presente documento) y a partir de la SEC ID N.º 5 del documento WO 95/26397, respectivamente.

[0010] En conexión con la propiedad i), la "homología" puede ser determinada mediante el uso de cualquier algoritmo convencional, preferiblemente mediante el uso del programa GAP del paquete GCG versión 7.3 (Junio 1993) usando valores por defecto para penalizaciones por hueco [Genetic Computer Group (1991) Manual del programa para el paquete GCG, versión 7, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE. UU. 53711 ].

[0011] Propiedad ii) de la  $\alpha$ -amilasa, es decir, la reactividad cruzada inmunológica, se puede ensayar usando un anticuerpo generado contra, o reactivo con, al menos un epitopo de la  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl relevante. El anticuerpo, que puede ser monoclonal o policlonal, puede ser producido por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe por Hudson et al., 1989. La reactividad cruzada inmunológica puede determinarse utilizando ensayos conocidos en la técnica, ejemplos de los cuales son ensayo de inmunodifusión radial o de Western Blot, por ejemplo, como se describe por Hudson et al., 1989. A este respecto, la reactividad cruzada inmunológica entre las  $\alpha$ -amilasas que tienen las secuencias de aminoácidos SEC ID Nos. 2, 4 y 6, respectivamente, se ha encontrado.

[0012] La sonda de oligonucleótido utilizada en la caracterización de la  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl de acuerdo con la propiedad iii) anteriormente mencionada se pueden preparar adecuadamente sobre la base de la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos completa o parcial de la  $\alpha$ -amilasa en cuestión. Las condiciones adecuadas para evaluar la hibridación incluyen remojo previo en 5x SSC y prehibridación durante 1 h a ~ 40 °C en una solución de formamida al 20%, solución de 5xDenhardt, fosfato de sodio 50 mM, pH 6,8, y 50  $\mu$ g de ADN de timo de ternera, sonificado y desnaturalizado, seguido de hibridación en la misma solución complementada con 100 $\mu$ M ATP durante 18h a ~ 40 °C, u otros métodos descritos por, por ejemplo, Sambrook y col., 1989.

[0013] En el presente contexto, "deriva de" pretende no solo indicar una  $\alpha$ -amilasa producida o producible por una cepa del organismo en cuestión, sino también una  $\alpha$ -amilasa codificada por una secuencia de ADN aislada a partir de tal cepa y producida en un organismo huésped transformado con dicha secuencia de ADN . Finalmente, el término pretende indicar una  $\alpha$ -amilasa que está codificada por una secuencia de ADN de origen sintético y/o de ADNc y que tiene las características de identificación de la  $\alpha$ -amilasa en cuestión. El término también pretende indicar que la  $\alpha$ -amilasa progenitora puede ser una variante de una forma natural de  $\alpha$ -amilasa, es decir, una variante que es el resultado de una modificación (inserción, sustitución, delección) de uno o más residuos de aminoácidos de la  $\alpha$ -amilasa de origen natural.

55  $\alpha$ -amilasas híbridas progenitoras

[0014] La  $\alpha$ -amilasa progenitora puede ser una  $\alpha$ -amilasa híbrida, es decir, una  $\alpha$ -amilasa que comprende una combinación de secuencias de aminoácidos parciales derivadas de al menos dos  $\alpha$ -amilasas.

[0015] La  $\alpha$ -amilasa híbrida progenitora puede ser una que sobre la base de la homología de aminoácidos y/o la reactividad inmunológica cruzada y/o hibridación del ADN (como se definió anteriormente) puede ser determinada para pertenecer a la familia de  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl. En este caso, la  $\alpha$ -amilasa híbrida está normalmente compuesta de al menos una parte de una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl y parte(s) de una o más  $\alpha$ -amilasas seleccionadas a partir de  $\alpha$ -

amilasas de tipo Termamyl o  $\alpha$ -amilasas no de tipo Termamyl de origen microbiano (bacteriano o fúngico) y/o de origen de mamífero.

5 [0016] Por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa progenitora puede comprender una parte C- terminal de una  $\alpha$ -amilasa derivada de una cepa de *B. licheniformis*, y una parte N-terminal de una  $\alpha$ -amilasa derivada de una cepa de *B. amyloliquefaciens* o una cepa de *B. stearothermophilus*. Por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa progenitora puede comprender al menos 430 residuos de aminoácidos de la parte C- terminal de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*, y puede, por ejemplo, comprender a) un segmento de aminoácidos correspondiente a los 37 residuos de aminoácidos de N-terminal de la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 4 y un segmento de aminoácidos correspondiente a los residuos de aminoácidos C-terminal 445 de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 2, o b) un segmento de aminoácidos correspondiente a los residuos de aminoácidos N-terminal 68 de la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 6 y un segmento de aminoácidos correspondiente a los residuos de aminoácidos C-terminal 415 de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 2.

15 [0017] Una realización preferida de una variante de la invención es un derivado de una  $\alpha$ -amilasa *B. licheniformis* (como  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl p), tal como la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 2.

20 Construcción de variantes de la invención

[0018] La construcción de la variante de interés puede llevarse a cabo mediante el cultivo de un microorganismo que comprende una secuencia de ADN que codifica la variante bajo condiciones que son propicias para producir la variante. La variante puede luego ser recuperada posteriormente del caldo de cultivo resultante. Esto se describe en detalle más adelante.

Propiedades alteradas de variantes de la divulgación

30 [0019] A continuación se analiza la relación entre mutaciones que pueden estar presentes en las variantes de la divulgación, y las alteraciones deseables en propiedades (relativas a aquellos una  $\alpha$ -amilasa progenitora tipo Termamyl) que pueden resultar de ello.

Disminución de la dependencia de  $Ca^{2+}$

35 [0020] Es altamente deseable poder disminuir la dependencia de  $Ca^{2+}$  de una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl. En consecuencia, un aspecto de la divulgación está relacionado con una variante de una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl. Dicha variante muestra actividad  $\alpha$ -amilasa y presenta una disminución de la dependencia a  $Ca^{2+}$  en comparación con la  $\alpha$ -amilasa progenitora. Una disminución de la dependencia de  $Ca^{2+}$  tendrá, en general, la consecuencia funcional de que la variante muestre una actividad amilolítica satisfactoria en presencia de una concentración más baja de iones de calcio en el medio extraño que es necesario para la enzima madre. Tendrá más a menudo la consecuencia de que la variante sea menos sensible que la progenitora a las condiciones desionizantes de calcio, tal como la que se obtienen en medios que contienen agentes complejantes de calcio (tales como determinados mejoradores de detergentes).

40 [0021] La disminución en la dependencia de  $Ca^{2+}$  de una variante de la divulgación puede ventajosamente conseguirse, por ejemplo, mediante el aumento de la afinidad de unión de  $Ca^{2+}$  relativa a la de la  $\alpha$ -amilasa progenitora tipo Termamyl; en otras palabras, cuanto más fuerte sea la unión de  $Ca^{2+}$  en la enzima, menor será la dependencia de  $Ca^{2+}$ .

50 [0022] Puede que se mencione aquí que el documento WO 96/23874 establece que se cree que los residuos de aminoácidos situados dentro de 10 Å de un ión de sodio o de calcio están implicados en, o son de importancia para, la capacidad de unión de  $Ca^{2+}$  de la enzima, y que a este respecto la mutación N104D [de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 2, o una mutación (N a D) equivalente o de una posición equivalente en otra  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl] se considera que es de especial interés con respecto a la disminución de la dependencia de  $Ca^{2+}$  de una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl.

55 [0023] Otras mutaciones mencionadas en el documento WO 96/23874 como de posible importancia en relación con la dependencia de  $Ca^{2+}$  incluyen mutaciones que se contemplan en el mismo para conseguir un aumento de la unión del calcio (y/o la termoestabilidad de la enzima) a través de la estabilización del dominio C (tal y como se define en el documento WO 96/23874) de la estructura tridimensional de una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl a través de la formación, por ejemplo, de puentes de cisteína o puentes salinos. Así, el documento WO 96/23874 divulga que el dominio C de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 2 puede ser estabilizado mediante la introducción de un puente de cisteína entre el dominio A y el dominio C (tal y como se define en el documento WO 96/23874) mediante la introducción de las siguientes mutaciones:

A349C+I479C y/o L346C+I430C.

[0024] Del mismo modo, el documento WO 96/23874 divulga que se puede obtener un puente de sal mediante la introducción de una o más de las siguientes mutaciones en la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tienen la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 2:

5 N457D,E

N457D,E+K385R

10 F350D,E+I430R,K

F350D,E+I411R,K

15 y que el sitio de calcio del Dominio C puede ser estabilizado mediante la sustitución de los residuos de aminoácidos H408 y/o G303 con cualquier otro residuo de aminoácido, en particular, mediante la introducción de una de las sustituciones:

H408Q, E, N, D y/o G303N, D, Q, E

20 que se contemplan para proporcionar una mejor unión de calcio o protección contra la depleción de calcio. (mutaciones similares en posiciones equivalentes de otras  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl están aquí englobadas).

[0025] Otras mutaciones de sustitución (relativas a  $\alpha$ -amilasa de *B. Licheniformis*, la SEC ID N.º 2) que se describen en el documento WO 96/23874 como de importancia aparente, entre otros, en el contexto de la reducción de la dependencia de calcio incluyen las siguientes: R23K, H156Y, A181T, A209V, R214, G310D y P345 (o mutaciones equivalentes en posiciones equivalentes en otra  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl).

[0026] En el contexto de la presente descripción, otras mutaciones de sustitución que parecen ser de importancia, entre otras cosas, en relación con la reducción de la dependencia de calcio incluyen las siguientes mutaciones en el dominio B (tal y como se define en el documento WO 96/23874):

A181E, D, Q, N, V (que parecen dar como resultado la protección del sitio de unión de  $\text{Ca}^{2+}$  más exterior en la región de unión entre el dominio A y el dominio B, hasta cierto punto);

35 I201 (aminoácido más voluminoso), por ejemplo, I201W, F, L (que parecen dar como resultado ligeras alteraciones en la geometría de la región en las inmediaciones del sitio(s) de unión de  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  en la región de unión entre el dominio A y el dominio B, y en la geometría y/o el tamaño de un cerca del hueco/cavidad), y

40 Y203E,Q (que se cree que da como resultado una unión más fuerte del ion  $\text{Ca}^{2+}$  más exterior en su sitio de unión en la región de unión entre el dominio A y el dominio B);

(o mutaciones equivalentes en posiciones equivalentes en otra  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl).

45 PH óptimo alterado (perfil de pH/actividad alterada)

[0027] El documento WO 96/23874 describe que se contempla como posible el cambiar el pH óptimo de una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl, o la actividad enzimática de la misma a un pH dado, cambiando el pKa de los residuos del sitio activo, y que esto puede lograrse, por ejemplo, mediante el cambio de la interacción electrostática o la interacción hidrofóbica entre los grupos funcionales de las cadenas laterales de aminoácidos del residuo de aminoácido que debe ser modificado y de sus alrededores.

[0028] En el contexto de la presente descripción, se cree sobre la base de consideraciones electrostáticas [véase, por ejemplo, MK Gilson, Current Opinion in Structural Biology 5 (1995) págs. 216-223 ; y B. Honig y A. Nicholls, Science 268 (1995) págs. 1144-1149; y referencias en ellos fijados] y consideraciones de higroscopicidad en relación con la estructura tridimensional de la  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl descrita en el documento WO 96/23874, que las mutaciones de relevancia, entre otras cosas, para alterar (aumentar o disminuir) el pH óptimo de una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl incluyen las siguientes mutaciones o equivalentes de las mismas [refiriéndose aquí a la secuencia de  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* (SEQ ID NO 2)]:

60 Q9K,L,E; F11R,K,E; E12Q; D100N,L; V101H,R,K,D,E,F; V102A,T; I103H,K; N104R, K, D; H105R,K,D,E,W,F; L196R,K, D,E,F,Y; I212R,K,D,E; L230H,K,I; A232G,H,F,S,V; V233D; K234L,E; I236R,K,N,H,D,E; L241R,K,D,E,F; A260S; W263H; Q264R,D,K,E; N265K,R,D; A269R,K,D,E; L270R,K,H,D,E; V283H,D; F284H; D285N,L; V286R,K,H,D,E; Y290R,E; V312R,K,D,E; F323H; D325N; N326K,H,D,L; H327Q,N,E,D,F; Q330L,E; G332D; Q333R,K,H,E,L; S334A,V,T,L,I,D; L335G,A,S,T,N; E336R+R375E; T337D,K; T338D,E; T339D; Q360K,R,E; D365N; G371D,R;

Aumento de la estabilidad a pH bajo (ácido)

5 [0029] En el contexto de la presente descripción, las mutaciones (sustituciones de aminoácidos) de importancia con respecto a la consecución de una mayor estabilidad a pH bajo parecen incluir mutaciones correspondientes a las siguientes mutaciones en la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 2:

10 mutaciones en posiciones H68, H91, H247, R305, K306, H382, K389, H405, H406, H450 o R483;  
las mutaciones:

15 H140Y;  
H142Y;  
H156Y;  
20 H159Y;  
H140D+H142R;  
H140K+H142D; o  
25 H142Y+H156Y

así como combinaciones de dos o más de cualquiera de estas mutaciones.

30 Aumento de la termoestabilidad y/o condiciones óptimas de temperatura alteradas (perfil de temperatura/actividad alterado)

35 [0030] Un aspecto adicional de la descripción se refiere a una variante de una  $\alpha$ -amilasa progenitora tipo Termamyl. Dicha variante es el resultado de uno o más residuos de aminoácidos que han sido eliminados de, sustituido en o añadido a la  $\alpha$ -amilasa progenitora a fin de lograr una mayor termoestabilidad de la variante.

40 [0031] Puede que se mencione que, en relación a la consecución de un aumento de la termoestabilidad, el documento WO 96/23874 describe que una variante particularmente interesante de una  $\alpha$ -amilasa un tipo Termamyl comprende una mutación correspondiente a una de las siguientes mutaciones (utilizando la numeración de la secuencia de aminoácidos de  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* mostrada en la SEC ID N.º 2):

L61W,V,F;  
45 Y62W;  
F67W;  
K106R,F,W;  
50 G145F,W  
I212F,L,W,Y,R,K;  
55 S151 sustituido con cualquier otro residuo de aminoácido y en particular con F,W,I o L;  
R214W;  
Y150R,K;  
60 F143W; y/o  
R146W.

65 [0032] El documento WO 96/23874 divulga además a este respecto que las mutaciones correspondientes a una o más de las siguientes mutaciones en la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la

SEC ID N.º 2 son de interés en relación con el logro de una termoestabilidad aumentada respecto a la de la  $\alpha$ -amilasa progenitora:

- 5 L241I,F,Y,W; y/o  
 I236L,F,Y,W  
 L7F, I, W  
 10 V259F,I,L  
 F284W  
 F350W  
 15 F343W  
 L427F,L,W  
 20 V481,F,I,L,W

[0033] En el contexto de la presente descripción, se puede observar a partir de una alineación de las secuencias de aminoácidos de  $\alpha$ -amilasas de diversas especies de *Bacillus* que la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* y la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* contienen ambas una "inserción" o tres aminoácidos en relación con, por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus*.

[0034] A partir de un modelo de la estructura de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* construida sobre la base de la estructura tridimensional de la  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl descrita en el documento WO 96/23784 (vide supra), teniendo en cuenta la homología de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* con la  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl en cuestión, se puede observar que la "inserción" mencionada anteriormente se encuentra dentro de una parte de la estructura designada "bucle de 8" en el documento WO 96/23784, haciendo este bucle más voluminoso en la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que en la  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl y que da como resultado un bucle que sobresale de la estructura, lo que posiblemente desestabiliza de la estructura. Por lo tanto, se contempla que la delección de uno o más aminoácidos en la región en cuestión en la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* o *B. amyloliquefaciens* mejorará la termoestabilidad de estas  $\alpha$ -amilasas.

[0035] Especialmente interesante a este respecto es la supresión de tres aminoácidos dentro de la secuencia parcial de T369 a I377 (en referencia a la secuencia de aminoácidos de  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* se muestra en la SEC ID N.º 2), es decir, la secuencia parcial: T369-K370-G371-D372-S373-Q374-R375-E376-I377 (o la secuencia parcial correspondiente en la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens*). Además de tales delecciones, la sustitución de uno o más de los aminoácidos no eliminados dentro de esta última secuencia parcial puede también ser ventajosa.

[0036] Delecciones preferibles de tres aminoácidos en la secuencia parcial de T369 a I377 (en la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*) son la supresión de K370+G371+D372 (es decir, K370\*+G371\*+ D372\*) o la supresión de D372+S373+Q374 (es decir, D372\*+\*+Q374 S373\*) (o delecciones equivalentes en la secuencia parcial correspondiente en la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens*).

[0037] Otro tipo de mutación que parece ser de valor en la mejora de la termoestabilidad de estas  $\alpha$ -amilasas es la sustitución (reemplazo) de la totalidad de la secuencia de aminoácidos parcial de T369 a I377 (en referencia a la secuencia de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*) por una de las siguientes secuencias parciales de seis aminoácidos (secuencia de numeración creciente de izquierda a derecha): I-P-T-H-S-V; I-P-T-H-G-V, y I-P-Q-Y-N-I (o una de las mismas sustituciones de la secuencia parcial correspondiente en la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens*).

[0038] Otras mutaciones que, aparentemente, pueden ser de alguna importancia en relación a la consecución de un aumento de la termoestabilidad incluyen sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones (en referencia a la SEC ID N.º 2):

- R169 (por ejemplo R169I,L,F,T);  
 60 R173 (especialmente R173I,L,F,T);  
 I201F;  
 I212F;  
 65 A209L,T; o

V208I

así como combinaciones de dos o más de cualquiera de estas mutaciones.

5

El aumento de la termoestabilidad a un pH ácido y/o a una baja concentración de Ca<sup>2+</sup>

[0039] En el contexto de la divulgación, las mutaciones que parecen ser de particular relevancia en relación con la obtención de variantes según la invención con mayor termoestabilidad a pH ácido (pH <7) y/o a una baja concentración de Ca<sup>2+</sup> incluyen mutaciones en las posiciones siguientes (en relación con la α-amilasa de B. licheniformis, (SEC ID N.º 2):

H156, N172, A181, N188, N190, H205, D207, A209, A210, E211, Q264, N265

[0040] Se puede mencionar aquí que los residuos de aminoácidos N y E, respectivamente, en las posiciones correspondientes a los N109 y E211, respectivamente, en la SEC ID N.º 2 constituyen residuos de aminoácidos que se conservan en numerosas α-amilasas tipo Termamyl. Así, por ejemplo, las posiciones correspondientes de estos residuos en las secuencias de aminoácidos de varias α-amilasas tipo Termamyl que ya se han mencionado (*vide supra*) son de la siguiente manera:

20

α-amilasa tipo Termamyl	posición N	posición E
B. licheniformis (SEC ID N.º 2)	N190	E211
B. amyloliquefaciens (SEC ID N.º 4)	N190	E211
B. stearothermophilus (SEC ID N.º 6)	N193	E210
Bacillus NCIB 12512 (WO 95/26397)	N195	E212
Bacillus NCIB 12513 (WO 95/26397)	N195	E212
"Bacillus sp. #707" (Tsukamoto et al.)	N195	E212

[0041] Las mutaciones de estos residuos de aminoácidos conservados parecen ser muy importantes en relación con la mejora de la termoestabilidad a pH ácido y/o a una baja concentración de calcio, y las mutaciones siguientes son de particular interés a este respecto (con referencia a la numeración de la secuencia de aminoácidos de α-amilasa de B. licheniformis mostrada en la SEC ID N.º 2):

25

H156Y,D

30

N172R,H,K

A181T

N188P

35

N190L,F

H205C

40

D207Y

A209L,T,V

A210S

45

E211Q

Q264A,E,L,K,S,T

50

N265A,S,T,Y

así como cualquier combinación de dos o más de estas mutaciones.

[0042] Un ejemplo de una doble mutación particularmente interesante a este respecto es Q264S+N265Y.



Patrón de escisión alterado

5 [0043] En el proceso de licuefacción del almidón es deseable usar una  $\alpha$ -amilasa que sea capaz de degradar las moléculas de almidón en oligosacáridos ramificados largos, en vez de una  $\alpha$ -amilasa lo que dé lugar a la formación de oligosacáridos ramificados más cortos, (como  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl convencionales). Los oligosacáridos ramificados cortos (precursores de panosa) no son hidrolizados satisfactoriamente por las pululanases, que se utilizan después del tratamiento de  $\alpha$ -amilasa en el proceso de licuefacción, pero antes de la adición de una amiloglicosidasa  
10 sacarificante (glucoamilasa). Por lo tanto, en presencia de los precursores de panosa, la mezcla de producto presente después del tratamiento de glucoamilasa contiene una proporción significativa de la así llamada dextrina límite, corta y ramificada, a saber, el trisacárido panosa. La presencia de panosa reduce el rendimiento de sacarificación significativamente y es por lo tanto indeseable.

15 [0044] Por lo tanto, un objetivo de la presente divulgación es llegar a una  $\alpha$ -amilasa mutante que tenga características de degradación de almidón modificadas adecuadamente, pero que conserve la termoestabilidad de la  $\alpha$ -amilasa progenitora tipo Termamyl.

20 [0045] Se puede mencionar aquí que, de acuerdo con el documento WO 96/23874, se espera que las variantes que comprenden al menos una de las siguientes mutaciones eviten la escisión cerca del punto de ramificación:

V54L,I,F,Y,W,R,K,H,E,Q

D53L, I, F, Y, W

Y56W

Q333W

G57 todos los residuos de aminoácidos posibles

A52 residuos de aminoácidos más largos que A, por ejemplo, A52W, Y, L, F, I.

Aumento de la actividad específica

35 [0046] En un aspecto adicional de la presente invención, las mutaciones importantes con respecto a la obtención de variantes que muestran un aumento de la actividad específica parecen incluir mutaciones correspondientes a las siguientes mutaciones en la  $\alpha$ -amilasa de B. licheniformis que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 2:

40 mutación (sustitución de aminoácidos) en la posición Q264 (por ejemplo, Q264R, K, S);

así como combinaciones de dos o más de cualquiera de estas últimas mutaciones, o combinaciones de una, dos o más de estas últimas mutaciones con la siguiente mutación múltiple:  
45 A1\*+N2\*+L3V+M15T+R23K+S29A+A30E+Y31H+A33S+E34D+H35I

Mutaciones generales en variantes de la divulgación

50 [0047] Se puede preferir que una variante de la invención comprenda una o más modificaciones además de las descritas anteriormente. Así, puede ser ventajoso que uno o más residuos de prolina presentes en la parte de la variante de  $\alpha$ -amilasa que está modificada sea/sean sustituidos por un residuo no prolina que puede ser cualquiera de los residuos no prolina posibles de origen natural, y que preferiblemente es una alanina, glicina, serina, treonina, valina o leucina.

55 [0048] Análogamente, se puede preferir que uno o más residuos de cisteína presentes entre los residuos de aminoácidos con el que la  $\alpha$ -amilasa progenitora es modificada sea/sean sustituidos por un residuo no cisteína tal como serina, alanina, treonina, glicina, valina o leucina.

60 [0049] Además, una variante de la divulgación puede - o como la única modificación o bien en combinación con cualquiera de las modificaciones descritas más arriba- ser modificada de modo que uno o más Asp y/o Glu presentes en un fragmento de aminoácidos correspondiente al fragmento de aminoácido 185 -209 de la SEC ID N.º 2 se sustituye por un Asn y/o Gln, respectivamente. También es de interés la sustitución, en la  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl, de uno o más de los residuos de Lys presentes en un fragmento de aminoácidos correspondiente al fragmento de aminoácidos 185-209 de la SEC ID N.º 2 por una Arg.

[0050] Se entenderá que la presente divulgación abarca las variantes que incorporan dos o más de las modificaciones descritas más arriba.

5 [0051] Además, puede ser ventajoso introducir mutaciones puntuales en cualquiera de las variantes descritas en este documento.

Los métodos para preparar variantes de  $\alpha$ -amilasa

10 [0052] Varios métodos para introducir mutaciones en genes son conocidos en la técnica. Después de una breve discusión sobre la clonación de las secuencias de ADN que codifican la  $\alpha$ -amilasa, se discutirán los métodos para generar mutaciones en sitios específicos dentro de la secuencia que codifica la  $\alpha$ -amilasa.

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

15 [0053] La secuencia de ADN que codifica una  $\alpha$ -amilasa progenitora puede ser aislada de cualquier célula o microorganismo que produce la  $\alpha$ -amilasa en cuestión, usando varios métodos bien conocidos en la técnica. En primer lugar, un debería construirse una genoteca de ADN y/o de ADNc genómico utilizando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la  $\alpha$ -amilasa que debe ser estudiada. Entonces, si la secuencia de aminoácidos de la  $\alpha$ -amilasa es conocida, sondas de oligonucleótidos homólogas y marcadas pueden ser sintetizadas y utilizadas para identificar los clones que codifican la  $\alpha$ -amilasa a partir de una genoteca preparada a partir del organismo en cuestión. Alternativamente, una sonda de oligonucleótido marcada que contiene secuencias homólogas a un gen de  $\alpha$ -amilasa conocido podría ser utilizada como sonda para identificar clones que codifican la  $\alpha$ -amilasa, usando hibridación y condiciones de lavado de una exigencia menor.

25 [0054] Sin embargo, otro método para la identificación de clones que codifican la  $\alpha$ -amilasa implicaría insertar fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformando la bacteria negativa de  $\alpha$ -amilasa con la genoteca de ADN genómico resultante, y, a continuación, poner en placas las bacterias transformadas sobre agar con un sustrato para la  $\alpha$ -amilasa, permitiendo de este modo que los clones que expresan la  $\alpha$ -amilasa sean identificados.

30 [0055] Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la enzima puede ser preparada sintéticamente mediante métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de fosforamidita descrito por S.L. Beaucage y M.H. Caruthers (1981) o el método descrito por Matthes et al. (1984). En el método de fosforamidita, los oligonucleótidos son sintetizados, por ejemplo, en un sintetizador automático de ADN, purificados, fortalecidos, ligados y clonados en vectores apropiados.

35 [0056] Por último, la secuencia de ADN puede ser de origen genómico mixto y de origen sintético, de origen sintético y de ADNc mixto o genómico mixto y origen de ADNc, preparado ligando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según sea apropiado, los fragmentos correspondientes a varias partes de la secuencia de ADN entera), de acuerdo con técnicas estándar. La secuencia de ADN también se puede preparar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en el documento EE.UU. 4.683.202 o RK Saiki et al. (1988).

45 Mutagénesis dirigida al sitio

[0057] Una vez que una secuencia de ADN que codifica  $\alpha$ -amilasa ha sido aislada y e identificados los sitios deseables para la mutación, se pueden introducir mutaciones usando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados; nucleótidos mutantes se insertan durante la síntesis de oligonucleótidos. En un método específico, un espacio monocatenario de ADN, que enlaza la secuencia que codifica la  $\alpha$ -amilasa, se crea en un vector que lleva el gen de  $\alpha$ -amilasa. Luego el nucleótido sintético, que lleva la mutación deseada, se hibrida con una porción homóloga del ADN monocatenario. El hueco restante se rellena entonces con ADN polimerasa I (fragmento de Klenow) y el constructo se liga usando ligasa T4. Un ejemplo específico de este método se describe en Morinaga et al. (1984). El documento EE.UU. 4.760.025 describe la introducción de oligonucleótidos que codifican mutaciones múltiples mediante la realización de alteraciones menores del casete. Sin embargo, una variedad aún mayor de mutaciones puede ser introducida en cualquier momento mediante el método de Morinaga, ya que una multitud de oligonucleótidos, de varias longitudes, se puede introducir.

60 [0058] Otro método para introducir mutaciones en secuencias de ADN que codifican la  $\alpha$ -amilasa se describe en Nelson and Long (1989). Se trata de la generación de 3er paso de un fragmento de PCR que contiene la mutación deseada introducida usando una cadena de ADN sintetizada químicamente como uno de los cebadores en las reacciones de PCR. Del fragmento generado por PCR, un fragmento de ADN que lleva la mutación puede ser aislado por escisión con endonucleasas de restricción y reinsertado en un plásmido de expresión.

Mutagénesis aleatoria

5 [0059] La mutagénesis aleatoria se lleva a cabo adecuadamente ya sea como mutagénesis aleatoria localizada o específica de la región en al menos tres partes del gen que se traduce en la secuencia de aminoácidos en cuestión, o dentro de todo el gen.

10 [0060] El documento WO 96/23874 divulga que, en relación con la consecución de la unión mejorada de un sustrato (es decir, la unión mejorada de una especie de hidratos de carbono, tales como la amilosa o la amilopectina) por una variante de  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl, modificada (por ejemplo, superior) especificidad de sustrato y/o modificado (por ejemplo, superior) especificidad con respecto a la escisión (hidrólisis) del sustrato, las siguientes posiciones de codón de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 2 (o posiciones del codón equivalentes para otra  $\alpha$ -amilasa progenitora tipo Termamyl en el contexto de la divulgación) parece ser particularmente apropiado para la determinar:

- 15 13-18
- 50-56
- 20 70-76
- 102-109
- 163-172
- 25 189-199
- 229-235
- 30 360-364
- 327-335

Mejora del rendimiento de licuefacción a bajo pH y baja concentración de iones de calcio

35 [0061] Para que una  $\alpha$ -amilasa sea utilizada en un proceso de licuefacción de almidón, es de particular interés que sea termoestable y capaz de funcionar a pH bajo y concentraciones bajas de calcio. Con el fin de mejorar estas propiedades de una  $\alpha$ -amilasa progenitora tipo Termamyl, en particular, la B.  $\alpha$ -amilasa de Blicheniformis o una variante o híbrido de la misma, se puede realizar una mutagénesis aleatoria (preferiblemente mediante el uso de cebadores de oligonucleótidos dopados o púas) seguida de la selección adecuada de las enzimas mutadas resultantes. La dirección de la selección de las regiones a aleatorizar y la selección de dopaje se basan principalmente en la estabilización de los iones de calcio que ya están presentes, y en la mejora de las interacciones electrostáticas residuo/residuo o dominio/dominio a pH bajo. Además, se pueden seleccionar las regiones que se ha demostrado que incluyen posiciones importantes para la consecución de un buen rendimiento licuefacción del almidón. Con el fin de preparar una variante de una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl que tenga las propiedades anteriores, al menos una de las siguientes regiones puede ser ventajosamente sometida a mutagénesis aleatoria (la numeración de los residuos de aminoácidos siendo como en la SEC ID N.º 2)

Región	Residuo	Descripción
I:	153-163	Región de calcio entre el dominio A y B, que también contiene H156
II:	178-192	Región de calcio entre el dominio A & B
III:	193-214	Región de calcio entre el dominio A y B, que también contiene A209
IV:	232-237	Región de calcio entre el dominio A & B
V:	297-308	Región de calcio entre el dominio A & B
VI:	403-409	Región de calcio entre el dominio A & B
VII:	428-435	Región de calcio entre el dominio A & B
VIII:	131-136	Región que contiene H133
IX:	164-175	Región en contacto con H133 región
X:	262-278	Región que contiene Q264

[0062] Preferiblemente, dos, tres o cuatro de las regiones más arriba se someten a mutagénesis aleatoria en la construcción de una nueva variante de  $\alpha$ -amilasa de la divulgación. Por ejemplo, las siguientes combinaciones de regiones son adecuadamente sometidas a mutagénesis aleatoria:

VIII+IX

VIII+IX+II

II+III+IV

IV+I

[0063] Además, se prefiere que la mutagénesis se lleve a cabo mediante el uso de oligonucleótidos dopados o enriquecidos. El dopaje se lleva a cabo preferiblemente a fin de introducir aminoácidos que contribuyen a la mejora de la estabilidad a bajo pH ya la reducción de la dependencia de calcio a pH bajo de la variante de  $\alpha$ -amilasa resultante. Además, cuando se selecciona el esquema de dopaje, en general, debe evitarse la posibilidad de introducir los residuos Asn y Gln, ya que los residuos Asn y Gln en general se asocian con la inestabilidad a un pH bajo. Preferiblemente, cuando un residuo Pro puede ser insertado con beneficios potenciales (por ejemplo, como se evaluó a partir de consideraciones de proteínas estructurales), el esquema de dopaje se prepara para incluir una preferencia por la introducción de un residuo Pro.

[0064] La  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl que debe ser sometida a mutagénesis aleatoria de acuerdo con el principio anterior puede ser cualquier  $\alpha$ -amilasa de tipo salvaje o una variante de la misma que contenga una o más mutaciones. La progenitora puede ser un híbrido entre al menos dos  $\alpha$ -amilasas como se explica en más detalle en este documento. Preferiblemente, la  $\alpha$ -amilasa progenitora es un mutante de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 2 que contiene al menos una mutación, y preferiblemente mutaciones múltiples. La  $\alpha$ -amilasa progenitora puede ser, de forma alternativa, una  $\alpha$ -amilasa híbrida que contiene al menos una parte de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* (SEC ID N.º 2). Ejemplos específicos de  $\alpha$ -amilasas progenitoras adecuadas para la mutagénesis de acuerdo con los principios descritos anteriormente incluyen: variantes de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* (SEC ID N.º 2) que contienen al menos uno de, es decir, uno, dos, tres, cuatro o todas las cinco de las mutaciones H156Y, A181T, N190F, A209V y Q264S.

[0065] En relación con lo anterior, un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para generar una variante de una  $\alpha$ -amilasa progenitora tipo Termamyl, dicha variante presenta una mayor estabilidad a pH bajo y a baja concentración de calcio con relación a la progenitora, comprendiendo el método:

someter una secuencia de ADN que codifica la  $\alpha$ -amilasa progenitora tipo Termamyl a mutagénesis aleatoria,

Este último método de la invención se lleva a cabo preferiblemente usando cebadores dopados, como se describe en los ejemplos de trabajo en este documento (vide infra).

Método de realización de la mutagénesis aleatoria

[0066] La mutagénesis aleatoria de una secuencia de ADN que codifica una  $\alpha$ -amilasa progenitora a realizar de acuerdo con el paso a) del método anteriormente descrito de la invención puede llevarse a cabo convenientemente mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica.

[0067] Por ejemplo, la mutagénesis aleatoria se puede realizar mediante el uso de un agente mutagenizante físico o químico adecuado, mediante el uso de un oligonucleótido adecuado, o sometiendo la secuencia de ADN a mutagénesis generada por PCR. Además, la mutagénesis aleatoria se puede realizar mediante el uso de cualquier combinación de estos agentes mutagenizantes.

[0068] El agente mutagenizante puede, por ejemplo, ser uno que induzca transiciones, transversiones, inversiones, aleatorización, deleciones y/o inserciones.

[0069] Ejemplos de un agente mutagenizante físico o químico adecuado para el presente propósito incluyen irradiación ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), O-metil hidroxilamina, ácido nitroso, etil metano sulfonato (EMS), bisulfito de sodio, ácido fórmico, y análogos de nucleótidos.

[0070] Cuando se usan tales agentes, la mutagénesis se realiza normalmente mediante la incubación de la secuencia de ADN que codifica la enzima madre que debe ser mutagenizada en presencia del agente mutagenizante de elección bajo condiciones adecuadas para que la mutagénesis tenga lugar, y seleccionando el ADN mutado que tiene las propiedades deseadas.

5 [0071] Cuando la mutagénesis se realiza mediante el uso de un oligonucleótido, el oligonucleótido puede ser dopado o enriquecido con los tres nucleótidos no progenitores durante la síntesis del oligonucleótido en las posiciones que han de ser cambiadas. El dopaje o enriquecimiento se puede hacer de manera que se eviten los codones de los aminoácidos no deseados. El oligonucleótido dopado o enriquecido puede ser incorporado en el ADN que codifica la enzima amilolítica mediante cualquier técnica publicada, usando, por ejemplo PCR, LCR o cualquier ADN polimerasa y ligasa.

10 [0072] Preferiblemente, el dopaje se lleva a cabo usando "dopaje aleatorio constante", en el que el porcentaje de tipo salvaje y mutación en cada posición está predefinido. Además, el dopaje puede ser dirigido para que tenga una preferencia para la introducción de nucleótidos determinados, y de ese modo una preferencia para la introducción de uno o más residuos de aminoácidos específicos. El dopaje puede, por ejemplo, realizarse con el fin de permitir la introducción de un 90% de tipo salvaje y un 10% de mutaciones en cada posición. Una consideración adicional en la elección del sistema de dopaje es genética, así como las limitaciones estructurales de las proteínas. El esquema de dopaje puede realizarse usando el programa DOPE (véanse los ejemplos de trabajo en este documento), que, entre otras cosas, asegura que se evite la introducción de codones de parada.

15 [0073] Cuando se utiliza la mutagénesis generada por PCR, bien un gen tratado químicamente o bien uno no tratado que codifica una enzima de  $\alpha$ -amilasa progenitora es sometido a PCR bajo condiciones que aumentan la mala incorporación de nucleótidos (Deshler 1992; Leung et al., *Technique*, Vol.1, 1989, pp. 11-15).

20 [0074] Una cepa mutadora de *E. coli* (Fowler et al., *Molec. Gen. Genet.*, 133, 1974, pp. 179-191), *S. cerevisiae* o cualquier otro organismo microbiano puede ser usado para la mutagénesis aleatoria del ADN que codifica la enzima amilolítica, por ejemplo, transformando un plásmido que contiene la enzima madre en la cepa mutadora, creciendo la cepa mutadora con el plásmido y aislando el plásmido mutado de la cepa mutadora. El plásmido mutado puede posteriormente ser transformado en el organismo de expresión.

25 [0075] La secuencia de ADN a mutagenizar puede estar convenientemente presente en una genoteca genómica o de ADNc preparada a partir de un organismo que exprese la enzima amilolítica madre. Alternativamente, la secuencia de ADN puede estar presente en un vector adecuado tal como un plásmido o un bacteriófago, que como tal puede ser incubado con o, si no, expuesto al agente mutagenizante. El ADN a mutagenizar puede también estar presente en una célula huésped ya sea por estar integrado en el genoma de dicha célula o estando presente en un vector albergado en la célula. Finalmente, el ADN a mutagenizar puede estar en forma aislada. Se entenderá que la secuencia de ADN que debe ser sometida a mutagénesis aleatoria es preferiblemente una secuencia de ADNc o de ADN genómico.

30 [0076] En algunos casos puede ser conveniente amplificar la secuencia de ADN mutada antes de realizar el paso de expresión (b) o el paso de detección (c). Tal amplificación puede llevarse a cabo de conformidad con métodos conocidos en la técnica, siendo el método actualmente preferido la amplificación generada por PCR usando cebadores oligonucleótidos preparados sobre la base de la secuencia de ADN o de aminoácidos de la enzima madre.

35 [0077] Después de la incubación con o de la exposición al agente mutagenizante, el ADN mutado se expresa mediante el cultivo de una célula huésped adecuada que lleva la secuencia de ADN bajo condiciones que permitan que la expresión tenga lugar. La célula huésped usada para este propósito puede ser una que ha sido transformada con la secuencia de ADN mutada, opcionalmente presente en un vector, o una que se llevó a la secuencia de ADN que codifica la enzima madre durante el tratamiento de mutagénesis. Ejemplos de células huésped adecuadas son las siguientes: bacterias gram positivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces lividans* or *Streptomyces murinus*; y las bacterias gramnegativas tales como *E.coli*.

40 [0078] La secuencia de ADN mutada puede comprender además una secuencia de ADN que codifique funciones que permitan la expresión de la secuencia de ADN mutada.

45 [0079] Mutagénesis aleatoria localizada: la mutagénesis aleatoria puede ventajosamente estar localizada en una parte de la  $\alpha$ -amilasa progenitora en cuestión. Esto puede, por ejemplo, ser ventajoso cuando determinadas regiones de la enzima han sido identificadas como de importancia particular para una propiedad dada de la enzima, y cuando se modifican se espera que den lugar a una variante con propiedades mejoradas. Tales regiones pueden normalmente ser identificadas cuando la estructura terciaria de la enzima madre ha sido dilucidada y relacionada con la función de la enzima.

50 [0080] La mutagénesis aleatoria localizada se realiza convenientemente mediante el uso de técnicas de mutagénesis generadas por PCR como se describió anteriormente, o cualquier otra técnica adecuada conocida en la técnica.

55 [0081] Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la parte de la secuencia de ADN que debe ser modificada puede ser aislada, por ejemplo, al ser insertada en un vector adecuado, y dicha parte puede posteriormente ser sometida a mutagénesis mediante el uso de cualquiera de los métodos de mutagénesis mencionados anteriormente.

60

[0082] Con respecto al paso de selección en el método anteriormente mencionado de la invención, este puede ser convenientemente realizado mediante el uso de un ensayo como se describe en relación con el Ejemplo 2 en este documento.

5 [0083] Con respecto a la selección, en general, un ensayo de filtro basado en lo siguiente es generalmente aplicable:

Un microorganismo capaz de expresar la enzima mutada amilolítica de interés es incubado en un medio adecuado y bajo condiciones adecuadas para que la enzima sea secretada, disponiendo el medio de un filtro doble que comprende un primer filtro de unión a proteínas y en la parte superior del mismo un segundo filtro que muestra una capacidad baja de unión a proteínas. El microorganismo está localizado en el segundo filtro. Después de la incubación, el primer filtro que comprende enzimas segregadas a partir de los microorganismos se separan del segundo filtro que comprende los microorganismos. El primer filtro se somete a la selección de la actividad enzimática deseada y se identifican las colonias microbianas correspondientes presentes en el segundo filtro.

15 [0084] El filtro utilizado para la unión de la actividad enzimática puede ser cualquier filtro de unión a proteínas, por ejemplo nylon o nitrocelulosa. La parte superior del filtro que lleva las colonias del organismo de expresión puede ser cualquier filtro que tenga poca o ninguna afinidad por las proteínas de unión, por ejemplo, acetato de celulosa o Durapore™. El filtro puede ser pretratado con cualquiera de las condiciones a ser utilizadas para la selección o puede ser tratado durante la detección de la actividad enzimática.

20 [0085] La actividad enzimática puede ser detectada por un tinte, indicador de fluorescencia, precipitación, indicador de pH, absorbancia IR o cualquier otra técnica conocida para la detección de la actividad enzimática.

[0086] El compuesto de detección puede ser inmovilizado por cualquier agente de inmovilización, por ejemplo, agarosa, agar, gelatina, poliacrilamida, almidón, papel de filtro, tela, o cualquier combinación de agentes de inmovilización.

[0087] La actividad de  $\alpha$ -amilasa es detectada mediante amilopectina marcada Cibacron Red, que está inmovilizada en agarosa. Para la selección de variantes con una mayor estabilidad térmica y de pH alto, el filtro con las variantes de  $\alpha$ -amilasa se incubaron en un tampón a pH 10,5 y 60 ° o 65 °C durante un tiempo especificado, se enjuagó brevemente en agua desionizada y se colocó en la matriz de amilopectina-agarosa para la detección de la actividad. La actividad residual se ve como la lisis de Cibacron Red por degradación de la amilopectina. Las condiciones se eligen para ser de manera que la actividad debida a la  $\alpha$ -amilasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 2 apenas pueda ser detectada. Variantes estabilizadas muestran, en las mismas condiciones, el aumento de la intensidad del color debido a una mayor liberación de Cibacron Red.

[0088] Para la selección de variantes con una actividad óptima a una temperatura inferior y/o por encima de un rango de temperatura más amplio, el filtro con las variantes unidas es colocado directamente en la placa de sustrato amilopectina-Cibacron Rojo y se incubó a la temperatura deseada (por ejemplo, 4 °C, 10 °C o 30 °C) durante un tiempo determinado. Después de este tiempo, la actividad debida a la  $\alpha$ -amilasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º 2 apenas puede ser detectada, mientras que las variantes con actividad óptima a una temperatura inferior mostrarán un aumento de lisis amilopectina. Antes de la incubación en la matriz de amilopectina, la incubación en todos los tipos de medios deseados -por ejemplo, soluciones que contienen  $\text{Ca}^{2+}$ , detergentes, EDTA u otros aditivos pertinentes- puede llevarse a cabo con el fin de seleccionar la dependencia cambiada o la reacción de las variantes en cuestión con tales aditivos.

45 Pruebas de variantes de la divulgación

[0089] La prueba de variantes de la invención puede llevarse a cabo convenientemente mediante la determinación de la actividad que degrada almidón de la variante, por ejemplo, mediante el cultivo de células huésped transformadas con una secuencia de ADN que codifica una variante en una placa de agarosa que contiene almidón y la identificación de células huésped que degradan el almidón. Pruebas adicionales en cuanto a propiedades alteradas (incluyendo la actividad específica, especificidad de sustrato, patrón de escisión, termoactivation, pH óptimo, dependencia del pH, condiciones óptimas de temperatura, y cualquier otro parámetro) pueden llevarse a cabo de conformidad con métodos conocidos en la técnica.

55 Expresión de variantes de  $\alpha$ -amilasas

[0090] De acuerdo con la divulgación, una secuencia de ADN que codifica la variante producida por métodos anteriormente descritos, o por cualesquiera métodos alternativos conocidos en la técnica, puede ser expresada, en forma de enzima, usando un vector de expresión que normalmente incluye secuencias de control que codifican un promotor, operador, el sitio de unión al ribosoma, señal de iniciación de la traducción, y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores.

[0091] El vector de expresión recombinante que lleva la secuencia de ADN que codifica una variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención puede ser cualquier vector que pueda convenientemente ser sometido a procedimientos de ADN

recombinante, y la elección del vector dependerá a menudo de la célula huésped en la que se va a introducir. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un bacteriófago o un elemento extracromosómico, minicromosoma o un cromosoma artificial. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el cromosoma(s) en el que se ha integrado.

[0092] En el vector, la secuencia de ADN debería estar operativamente conectada a una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede ser derivado de genes que codifican proteínas bien homólogas o heterólogas a la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN que codifica una variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención, especialmente en un huésped bacteriano, son el promotor del operón lac de *E. coli*, *Streptomyces coelicolor* los del gen de agarasa dagA de promotores, los promotores del *Bacillus licheniformis* gen de  $\alpha$ -amilasa (amyL), los promotores de los géneros *Bacillus stearothermophilus*, gen de amilasa maltogénica (amyM), los promotores de los géneros *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amilasa (amyQ), los promotores de los géneros *Bacillus subtilis* genes xylA y xylB etc Para la transcripción en un huésped fúngico, ejemplos de promotores útiles son aquellos derivados del gen que codifica la amilasa TAKA de *A. oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, *A. niger* neutro  $\alpha$ -amilasa, *A. niger* estable a los ácidos  $\alpha$ -amilasa, glucoamilasa de *A. niger*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteasa alcalina de *A. oryzae*, *A. oryzae*, triosa fosfato isomerasa o *A. nidulans*, acetamidasa. Para la transcripción en un huésped fúngico, ejemplos de promotores útiles son aquellos derivados del gen que codifica . TAKA amilasa *A.oryzae*, proteinasa aspártica *Rhizomucor miehei*,  $\alpha$ -amilasa neutra de *A.niger*,  $\alpha$ -amilasa ácido establede *A. niger*, glucoamilasa *A. niger*, lipasa *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina *A. oryzae*, isomerasa de fosfato de triosa *A.oryzae* o acetamidasa *A.nidulans*.

[0093] El vector de expresión de la invención también puede comprender un terminador de transcripción adecuado y, en eucariotas, secuencias de poliadenilación operativamente conectadas a la secuencia de ADN que codifica la variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención. Las secuencias de terminación y de poliadenilación pueden derivar adecuadamente pueden de las mismas fuentes que el promotor.

[0094] El vector puede comprender además una secuencia de ADN que permita que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de tales secuencias son los orígenes de replicación de plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

[0095] El vector también puede comprender un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped, tales como los genes dal de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, o uno que confiera resistencia a antibióticos tales como ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o resistencia a la tetraciclina. Por otra parte, el vector puede comprender marcadores de selección de *Aspergillus* tales como amdS, argB, niaD y sC, un marcador que dé lugar a resistencia a la higromicina, o la selección puede llevarse a cabo mediante la co-transformación, por ejemplo, como se describe en el documento WO 91/17243.

[0096] Mientras que la expresión intracelular puede ser ventajosa en algunos aspectos, por ejemplo, cuando se utilizan determinadas bacterias como células huésped, se prefiere generalmente que la expresión sea extracelular. En general, el las  $\alpha$ -amilasas *Bacillus* mencionadas en este documento comprenden una prerregión que permite la secreción de la proteasa expresada en el medio de cultivo. Si se desea, esta prerregión puede ser sustituida por una prerregión diferente o secuencia señal, convenientemente realizada mediante la sustitución de las secuencias de ADN que codifican las respectivas prerregiones.

[0097] Los procedimientos usados para enlazar el constructo de ADN de la invención que codifica una variante de  $\alpha$ -amilasa, el promotor, terminador y otros elementos, respectivamente, y para insertarlas en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son bien conocidos para las personas expertas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (1989)).

[0098] La célula de la invención, ya sea que comprende una construcción de ADN o un vector de expresión de la invención tal como se ha definido anteriormente, se utiliza ventajosamente como una célula huésped en la producción recombinante de una variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención. La célula puede ser transformada con el constructo de ADN de la invención que codifica la variante, integrando convenientemente el constructo de ADN (en una o más copias) en el cromosoma huésped. Esta integración se considera generalmente que es una ventaja, ya que es más probable que la secuencia de ADN se mantenga estable en la célula. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped puede ser realizada según métodos convencionales, por ejemplo, por recombinación homóloga o heteróloga. Alternativamente, la célula puede ser transformada con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en relación con los diferentes tipos de células huésped.

[0099] La célula de la invención puede ser una célula de un organismo superior tal como un mamífero o un insecto, pero es preferiblemente una célula microbiana, por ejemplo, una célula bacteriana o una fúngica (incluyendo la levadura).

5 [0100] Ejemplos de bacterias adecuadas son las bacterias grampositivas como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, o *Streptomyces lividans* or *Streptomyces murinus*, o las bacterias gramnegativas como la *E. coli*. La transformación de las bacterias puede, por ejemplo, ser efectuada por transformación de protoplastos o mediante el uso de células competentes de una manera conocida per se.

10 [0101] El organismo de la levadura puede ser seleccionado favorablemente de una especie de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. El hongo filamentoso puede pertenecer ventajosamente a una especie de *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*. Las células fúngicas pueden ser transformadas mediante un proceso que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguido de la regeneración de la pared celular en una manera conocida per se. Un procedimiento adecuado para la transformación de células huéspedes de *Aspergillus* se describe en el documento EP 238 023.

15 [0102] En un aspecto adicional, la presente descripción se refiere a un método de producción de una variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención, dicho método comprende el cultivo de una célula huésped como se ha descrito anteriormente bajo condiciones propicias para la producción de la variante y la recuperación de la variante de las células y/o medio de cultivo.

20 [0103] El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el cultivo de la célula huésped en cuestión y obtener la expresión de la variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o pueden ser preparados según recetas publicadas (por ejemplo, como se describe en catálogos de la *American Type Culture Collection*).

25 [0104] La variante de  $\alpha$ -amilasa secretada de las células huésped puede ser convenientemente recuperada del medio de cultivo mediante procedimientos bien conocidos, incluyendo la separación de las células del medio por centrifugación o filtración, y precipitación de los componentes proteínicos del medio por medio de un sal tal como sulfato de amonio, seguido del uso de procedimientos cromatográficos tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, o similares .

30 Aplicaciones industriales

35 [0105] Las variantes de  $\alpha$ -amilasa de esta invención poseen propiedades valiosas que permiten una variedad de aplicaciones industriales. En particular, variantes de la enzima de la invención son aplicables como componente en composiciones detergentes de lavado, lavavajillas y de limpieza de superficies duras. Numerosas variantes son particularmente útiles en la producción de edulcorantes y etanol a partir de almidón, y/o para el desencolado textil. Condiciones para procesos de conversión de almidón convencionales, incluyendo la licuefacción del almidón y/o procesos de sacarificación, están descritos en, por ejemplo, EE.UU. 3.912.590 y en las publicaciones de patente EP N.º 252,730 y 63,909 .

40 [0106] Producción de edulcorantes a partir de almidón : Un proceso " tradicional " para la conversión de almidón en jarabes de fructosa normalmente consiste en tres procesos enzimáticos consecutivos, a saber, un proceso de licuefacción seguido de un proceso de sacarificación y un proceso de isomerización. Durante el proceso de licuefacción, el almidón se degrada a dextrinas por una  $\alpha$ -amilasa (por ejemplo, TermamyI™) a valores de pH entre 5.5 y 6.2 y a temperaturas de 95 a 160 °C durante un período de aprox. 2h. Con el fin de garantizar una estabilidad enzimática óptima bajo estas condiciones, se añade 1 mM de calcio (40 ppm de iones libres de calcio).

45 [0107] Después del proceso de licuefacción las dextrinas se convierten en dextrosa mediante la adición de una glucoamilasa (por ejemplo, AMG™) y una enzima desramificante, tal como una isoamilasa o una pululanasa (por ejemplo, Pro-mozyme™). Antes de esta etapa, el pH se reduce a un valor por debajo de 4.5, manteniendo la temperatura alta (por encima de 95 °C), y la actividad  $\alpha$ -amilasa de licuación se desnaturaliza. La temperatura se baja a 60 °C y se añaden la glucoamilasa y la enzima desramificante. El proceso de sacarificación procede durante 24-72 horas. Después del proceso de sacarificación el pH se aumenta a un valor en el intervalo de 6-8, preferiblemente pH 7.5, y el calcio se elimina mediante intercambio iónico. El jarabe de dextrosa es luego convertido en jarabe rico en fructosa usando, por ejemplo, un glucoasa isomerasa inmovilizada (tal como Sweetzyme™).

50 [0108] Al menos 3 mejoras enzimáticas de este proceso podrían contemplarse. Las tres mejoras, todas ellas, podrían ser vistas como beneficios individuales, pero cualquier combinación (por ejemplo, 1+2, 1+3, 2+3 o 1+2+3) se podría emplear:

60 Mejora 1. Reducción de la dependencia de calcio de la  $\alpha$ -amilasa de licuación.

65 [0109] Se requiere que la adición de calcio libre asegure adecuadamente una alta estabilidad de la  $\alpha$ -amilasa, pero el calcio libre inhibe fuertemente la actividad de la glucoasa isomerasa y necesita ser eliminado, por medio de una operación de unidad costosa, hasta un punto en el que reduzca el nivel de calcio libre por debajo de 3-5 ppm. Los



ahorros de costes se podrían obtener si tal operación pudiera ser evitada y el proceso de licuefacción pudiera ser realizado sin adición de iones de calcio libres.

5 [0110] Para lograrlo, es necesaria una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl con menor dependencia del calcio que sea estable y altamente activa a concentraciones bajas de calcio libre (<40 ppm). Tal  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl debería tener un pH óptimo a un pH en el rango de 4.5 a 6.5, preferiblemente en el intervalo de 4.5 a 5.5.

Mejora 2. Reducción de la formación de productos de Maillard indeseados

10 [0111] La extensión de la formación de productos de Maillard no deseados durante el proceso de licuefacción depende del pH. El pH bajo favorece la reducción de la formación de productos de Maillard. Por lo tanto, sería deseable poder bajar el pH del proceso de alrededor de pH 6,0 a un valor de alrededor de pH 4,5, por desgracia, todas las  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl termoestables y conocidas comúnmente no son muy estables a pH bajo (es decir, pH <6,0) y su actividad específica es generalmente baja.

15 [0112] El logro del objetivo antes mencionado requiere una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl que es estable a pH bajo en el rango de 4.5 a 5.5 y en las concentraciones de calcio libre en el rango de 0-40 ppm, y que mantiene una alta actividad específica.

20 Mejora 3.

[0113] Se ha informado anteriormente (patente de EE.UU. 5.234.823) que en caso de sacarificación con glucoamilasa de *A. niger* y pululanasa de *B. acidopullulyticus*, la presencia de la actividad de  $\alpha$ -amilasa residual del proceso de licuefacción puede conducir a la disminución de los rendimientos de dextrosa si la  $\alpha$ -amilasa no es inactivada antes de la fase de sacarificación. Esta inactivación típicamente puede llevarse a cabo mediante el ajuste del pH por debajo de 4.3 a 95 °C, antes de bajar la temperatura a 60 °C para la sacarificación.

30 [0114] La razón de este efecto negativo en el rendimiento de dextrosa no se entiende completamente, pero se supone que la  $\alpha$ -amilasa de licuefacción (por ejemplo, Termamyl™ 120 L de *B. licheniformis*). genera "dextrinas límite" (que son sustratos pobres para pululanasa de *B. acidopullulyticus*) mediante hidrólisis de enlaces glucosídicos alfa 1,4 cerca y a ambos lados de los puntos de ramificación en la amilopectina. La hidrólisis de estas dextrinas límite por la glucoamilasa conduce a una acumulación del trisacárido panosa, que solo es hidrolizado lentamente por la glucoamilasa.

35 [0115] El desarrollo de una  $\alpha$ -amilasa termoestable que no sufra de esta desventaja sería una mejora de proceso importante, ya que no sería necesario ningún paso de inactivación por separado.

[0116] Si se desarrolla una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl estable a pH bajo, una alteración de la especificidad podría ser una ventaja necesaria en combinación con el aumento de la estabilidad a pH bajo.

40 [0117] La metodología y los principios de la presente invención permiten diseñar y producir variantes de acuerdo con la divulgación que tienen propiedades requeridas como se indicó anteriormente. A este respecto, las mutaciones particularmente interesantes son las mutaciones en una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl [por ejemplo Termamyl™ en sí mismo ( $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*; SEC ID N.º 2), o una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl que tiene una secuencia de aminoácidos N-terminal (es decir, la secuencia parcial hasta la posición del aminoácido correspondiente a la posición 35 en Termamyl™) que es idéntica a la de  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* (SEC ID N.º 4), es decir, una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl que tiene la siguiente secuencia N-terminal con respecto a la secuencia de aminoácidos de Termamyl™:

50 A1\*+N2\*+L3V+M15T+R23K+S29A+A30E+Y31H+A33S+E34D+H35I, donde un asterisco (\*) indica delección del residuo de aminoácido en cuestión] en posiciones correspondientes a cualquiera de las siguientes posiciones en Termamyl™:

H156

A181

55 A209

[0118] Sustituciones particularmente preferidas en las posiciones indicadas anteriormente son las siguientes:

60 H156Y

A181T

A209V

las siguientes mutaciones múltiples:

H156Y+A181T+A209V;

H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S

- 5 A1\*+N2\*+L3V+M15T+R23K+S29A+A30E+Y31H+A33S+E34D+H35I+H156Y+A181T+A 209V;  
 A1\*+N2\*+L3V+M15T+R23K+S29A+A30E+Y31H+A33S+E34D+H35I+H156Y+A181T+N 190F+A209V; o  
 A1\*+N2\*+L3V+M15T+R23K+S29A+A30E+Y31H+A33S+E34D+H35I+H156Y+A181T+N 190F+A209V+Q264S.

10 [0119] Como ya se ha indicado, numerosas variantes de acuerdo con la invención son particularmente adecuadas para su uso en la conversión del almidón, por ejemplo, en la licuefacción de almidón. A este respecto, un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a composiciones que comprenden una mezcla de:

(i) la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N.º 2 con una o más variantes ( $\alpha$ -amilasas mutantes) derivadas de (como la  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl) la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N.º 6; o

15 (ii) la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N.º 6 con una o más variantes ( $\alpha$ -amilasas mutantes) derivadas de una o más  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl (por ejemplo, de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N.º 2 o de una de las otras  $\alpha$ -amilasas progenitoras tipo Termamyl nombradas específicamente en este documento); o

20 (iii) una o más variantes ( $\alpha$ -amilasas mutantes) derivadas de (como la  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl) la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N.º 6 con una o más variantes ( $\alpha$ -amilasas mutantes) según la invención derivadas de una o más  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl (por ejemplo, de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N.º 2 o de una de las otras  $\alpha$ -amilasas progenitoras tipo Termamyl nombradas específicamente en este documento).

25 [0120] Mutaciones preferidas de una variante de  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* a incorporar en dicha mezcla incluye sustituciones en N193 y/o en E210, y/o las delecciones de pares R179\*+G180\* o I181\*+G182\* (usando la numeración de la secuencia de aminoácidos para esta  $\alpha$ -amilasa particular).

30 [0121] Las composiciones de uno de los últimos tipos, que contienen  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* o una variante de la misma de acuerdo con la invención, parecen tener un gran potencial para su uso en la licuefacción de almidón. La relación (expresada, por ejemplo, en términos de mg de proteína amilolítica activa por litro de medio líquido) entre los componentes  $\alpha$ -amilolíticos individuales de una mezcla dada dependerá de la naturaleza exacta y las propiedades de cada componente.

#### Composiciones detergentes

40 [0122] Como se mencionó anteriormente, las variantes de la invención convenientemente se pueden incorporar en las composiciones detergentes. Se hace referencia, por ejemplo, al documento WO 96/23874 y WO 97/07202 para más detalles relativos a ingredientes pertinentes de composiciones detergentes (tales como detergentes para lavar platos o ropa), métodos apropiados de formulación de las variantes en tales composiciones detergente, y para ejemplos de tipos pertinentes de composiciones detergentes.

45 [0123] Composiciones detergentes que comprenden una variante de la invención pueden comprender adicionalmente una o más de otros enzimas, tales como una lipasa, cutinasa, proteasa, celulasa, peroxidasa o lacasa, y/u otra  $\alpha$ -amilasa.

50 [0124] Variantes de  $\alpha$ -amilasa de la invención pueden ser incorporadas en detergentes a concentraciones empleadas convencionalmente. En la actualidad se contempla que una variante de la invención se pueda incorporar en una cantidad correspondiente a 0,00001-1mg (calculado como proteína enzimática pura activa) de  $\alpha$ -amilasa por litro de líquido de lavado/lavaplatos usando niveles de dosificación convencionales de detergente.

55 [0125] La presente invención se describe adicionalmente con referencia al dibujo adjunto, en el que:

La Fig. 1 muestra la secuencia de ADN, junto con el codón de parada TAA, que codifica la cepa de *Bacillus* NCIB 12512 de  $\alpha$ -amilasa que se describe en el documento WO 95/26397, junto con la secuencia de aminoácidos de la  $\alpha$ -amilasa codificada (véase la Fig. 2).

60 La Fig. 2 es una alineación de las secuencias de aminoácidos de cuatro  $\alpha$ -amilasas progenitoras tipo Termamyl. Los números en el extremo izquierdo designan las secuencias de aminoácidos respectivas como sigue:

la secuencia de aminoácidos de la cepa de *Bacillus* NCIB 12512 de  $\alpha$ -amilasa que se describe en el documento WO 95/26397;

65

2: la secuencia de aminoácidos de la cepa de Bacillus NCIB 12513 de  $\alpha$ -amilasa que se describe en el documento WO 95/26397;

5 3: la secuencia de aminoácidos de la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* como se muestra en la SEC ID N.º 6 en este documento;

4: la secuencia de aminoácidos de la cepa Bacillus sp. # 707 de  $\alpha$ -amilasa descrita por Tsukamoto et al. en Biochem. Biophys. Res. Commun. 151 (1988), págs.25-31 .

10 [0126] Los números en el extremo derecho de la figura dan el número total corriente de aminoácidos para cada una de las secuencias en cuestión. Nótese que para la secuencia numerada 3 (correspondiente a la secuencia en la SEQ ID N.º 6), la alineación da como resultado "huecos" en las posiciones correspondientes al aminoácido N.º 1 y N.º 175, respectivamente, en las secuencias numeradas 1, 2 y 4.

15 [0127] La Fig. 3 ilustra la estrategia de PCR empleada en el Ejemplo 2 (véase más adelante).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Construcción de pSNK101

20 [0128] Este vector transportador de *E. coli*/Bacillus se puede utilizar para introducir mutaciones sin expresión de la  $\alpha$ -amilasa en *E. coli* y luego ser modificado de tal manera que la  $\alpha$ -amilasa sea activa en Bacillus . El vector se construyó de la siguiente manera: El gen de la  $\alpha$ -amilasa en el vector pX (pDN1528 con las siguientes alteraciones dentro de amyL: BAN (1-33), H156Y, A181T, N190F, A209V, Q264S, el plásmido pDN1528 se describe adicionalmente en el  
25 Ejemplo 1) fue inactivado mediante la interrupción en el sitio PstI en la región codificante 5' del gen de la  $\alpha$ -amilasa mediante un fragmento de 1,2 kb que contiene un fragmento de origen de *E. coli*. Este fragmento se amplificó a partir de las pUC19 (GenBank n.º de acceso: X02514) utilizando el cebador directo: 5'-gacctgcagtcaggcaacta-3' y el cebador  
30 inverso: 5'-tagagtcgacctgcaggcat-3'. La amplificación de PCR y el plásmido que contiene el gen pX de  $\alpha$ -amilasa fueron digeridos con PstI a 37 °C durante 2 horas. El fragmento de vector pX y el amplicón de origen *E. coli* fueron ligados a temperatura ambiente durante 1 hora y transformados en *E. coli* mediante electrotransformación. El vector resultante se denomina pSnK101.

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

35 [0129] Una cepa de *B. subtilis* que albergue el plásmido de expresión relevante se coloca en líneas sobre una placa de agar LB con 15  $\mu$ g/ml de cloranfenicol a partir de un calco a -80 °C, y se cultivaron durante la noche a 37 °C. Las colonias se transfirieron a 100 ml de medios BPX suplementados con 15  $\mu$ g/ml de cloranfenicol en un matraz de agitación de 500 ml. Composición del medio BPX:

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

40 [0130] El cultivo es agitado a 37°C a 270 rpm durante 5 días.

[0131] Las células y restos celulares se eliminan del caldo de fermentación por centrifugado a 4500 rpm en 20-25 minutos. Después, el sobrenadante se filtra para obtener una solución completamente clara. El filtrado se concentra y se  
45 lava en un filtro UF (membrana de corte de 10000) y el tampón se cambia a 20 mM de acetato de pH 5,5. El producto filtrado por UF es aplicado en una S-sepharose F.F. y se realiza la elución mediante una elución por fases con 0.2 M NaCl en el mismo tampón. El eluato es dializado contra 10 mM de Tris, pH 9.0 y aplicado en una Q-sepharose F.F. y eluido con un gradiente lineal de 0-0,3 M de NaCl sobre 6 volúmenes de columna. Las fracciones que contienen la actividad (medida por el ensayo Phadebas) son agrupadas, el pH se ajustó a pH 7.5 y el color restante fue eliminado  
50 mediante un tratamiento con 0,5% W/vol. de carbón activo en 5 minutos.

Ensayo para la actividad  $\alpha$ -amilasa

[0132] La actividad  $\alpha$ -amilasa está determinada por un método que utiliza comprimidos de Phadebas® como sustrato. Los comprimidos de Phadebas.(Phadebas® Amylase Test, suministrada por Pharmacia Diagnostic) contienen un polímero de almidón azul insoluble entrecruzado que ha sido mezclado con albúmina de suero bovino y una sustancia del tampón y colocado en comprimidos.

[0133] Para cada medición individual una pastilla es suspendida en un tubo que contiene 5 ml de tampón Britton-Robinson 50 mM (50 mM de ácido acético, 50 mM de ácido fosfórico, 50 mM de ácido bórico, 0,1 mM de  $\text{CaCl}_2$ , pH ajustado al valor de interés con NaOH). La prueba es realizada al baño maría a la temperatura de interés. La  $\alpha$ -amilasa que debe evaluarse es diluida en x ml de 50 mM de tampón Britton-Robinson. 1 ml de esta solución de  $\alpha$ -amilasa es añadido a 5 ml de tampón Britton-Robinson 50 mM. El almidón es hidrolizado por la  $\alpha$ -amilasa dando fragmentos azules solubles. La absorbancia de la solución azul resultante, medida espectrofotométricamente a 620 nm, es una función de la actividad  $\alpha$ -amilasa.

[0134] Es importante que la absorbancia medida de 620 nm después de 10 o 15 minutos de incubación (duración de la prueba) esté en el intervalo de 0,2 a 2,0 unidades de absorbancia a 620 nm. En este intervalo de absorbancia hay linealidad entre actividad y absorbancia (ley de Lambert-Beer). La dilución de la enzima debe en consecuencia ser ajustada para cumplir este criterio. Bajo un grupo específico de condiciones (temp., pH, tiempo de reacción, condiciones del tampón) 1 mg de una  $\alpha$ -amilasa dada hidrolizará una cantidad determinada de sustrato y se producirá un color azul. La intensidad del color es medida a 620 nm. La absorbancia medida es directamente proporcional a la actividad específica (actividad/mg de proteína pura de  $\alpha$ -amilasa) de la  $\alpha$ -amilasa en cuestión bajo el grupo dado de condiciones.

## Método general para la mutagénesis aleatoria mediante el uso del programa DOPE

[0135] La mutagénesis aleatoria puede llevarse a cabo mediante los siguientes pasos:

1. Seleccionar las regiones de interés para la modificación de la enzima madre.
2. Decidir sobre sitios de mutación y sitios no mutados en la región seleccionada.
3. Decidir qué tipo de mutaciones deberían llevarse a cabo, por ejemplo, con respecto a la estabilidad deseada y/o el rendimiento de la variante que se construirá.
4. Seleccionar mutaciones estructuralmente razonables.
5. Ajustar los residuos seleccionados por el paso 3 con respecto al paso 4.
6. Analizar mediante el uso de un algoritmo de dopado adecuado la distribución de nucleótidos.
7. Si es necesario, ajustar los residuos deseados al realismo del código genético (por ejemplo, teniendo en cuenta las limitaciones que resultan del código genético (por ejemplo, con el fin de evitar la introducción de codones de parada)) (la persona experta será consciente de que algunas combinaciones de codón no se pueden utilizar en la práctica y tendrá que ser adaptado).
8. Producir cebadores.
9. Realizar mutagénesis aleatoria mediante el uso de los cebadores.
10. Seleccionar las variantes de  $\alpha$ -amilasa resultantes mediante la selección de las propiedades mejoradas deseadas.

[0136] Algoritmos de dopado adecuados para su uso en el paso 6 son bien conocidos en la técnica. Un algoritmo es descrito por Tomandl, D. et al., Journal of Computer-Aided Molecular Design, 11 (1997), pp. 29-38). Otro algoritmo, DOPE, es descrito a continuación:

## Programa de dopado

[0137] El programa "DOPE" es un algoritmo informático útil para optimizar la composición de nucleótidos de un codón triplete de tal manera que codifica una distribución de aminoácidos que se asemeja más a la distribución de aminoácidos deseada. Con el fin de evaluar cuál de las distribuciones posibles es la más similar a la distribución de aminoácidos deseada, se necesita una función de puntuación. En el programa "Dope" se encontró la siguiente función que se adapta:

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

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

[0138] Un algoritmo de Monte-Carlo (un ejemplo es el descrito por Valleau, J.P. & Whittington, S.G. (1977) A guide to Monte Carlo for statistical mechanics: 1 Highways. In "Statistical Mechanics, Part A" Equilibrium Techniques ed. B.J. Berne, New York: Plenum) se utiliza para encontrar el valor máximo de esta función. En cada iteración se realizan los siguientes pasos:

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

15 [0139] Un ciclo consiste normalmente en -1000 iteraciones como se describió anteriormente en donde  $d$  va decreciendo linealmente de 1 a 0. Cien o más ciclos se llevan a cabo en un proceso de optimización. La composición de nucleótidos que resulta en la puntuación más alta se presenta finalmente.

#### EJEMPLO 1

#### 20 Construcción de variantes de Termamyl™

[0140] Termamyl ( $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* de la SEC ID N.º: 2) se expresa en *B. subtilis* a partir de un plásmido indicado pDN1528. Este plásmido contiene el gen completo que codifica Termamyl, amyL, cuya expresión está dirigida por su propio promotor. Además, el plásmido contiene el origen de replicación, ori, del plásmido pUB110 y el gen cat del plásmido pC194 que confiere resistencia hacia el cloranfenicol. pDN1528 se muestra en la Fig. 9 del documento WO 96/23874.

30 [0141] Se preparó un vector de la mutagénesis específica que contiene una mayor parte de la región codificante de la SEC ID N.º 1. Las características importantes de este vector, denominado pJeEN1, incluyen un origen de replicación derivado de los plásmidos pUC, el gen cat que confiere resistencia hacia el cloranfenicol, y una versión con desplazamiento de marco del gen bla, cuyo tipo salvaje normalmente confiere resistencia hacia la ampicilina (fenotipo amp<sup>R</sup>). Esta versión mutada resulta en un fenotipo amps. El plásmido pJeEN1 se muestra en la Fig. 10 del documento WO 96/23874, y el *E. coli* origen de replicación, ori, bla, cat, la versión 5'-truncada del gen de amilasa Termamyl, y sitios de restricción seleccionados están indicados en el plásmido.

35 [0142] Las mutaciones se introducen en amyL por el método descrito por Deng y Nickoloff (1992, Anal. Biochem. 200, pp. 81-88) salvo que los plásmidos con el "cebador de selección" (cebador # 6616, véase más adelante) incorporados sean seleccionados en base al fenotipo amp<sup>R</sup> de células de *E. coli* transformadas que contienen un plásmido con un gen bla reparado, en lugar de emplear la selección por digestión con enzimas de restricción como se explica en Deng y Nickoloff. Productos químicos y enzimas usados para la mutagénesis fueron obtenidos a partir del kit de mutagénesis Chameleon<sup>®</sup> de Stratagene (número de catálogo 200509).

45 [0143] Después de la verificación de la secuencia de ADN en los plásmidos variantes, el gen truncado, que contiene la alteración deseada, es subclonado en pDN1528 como un fragmento PstI-EcoRI y transformado en la cepa de *Bacillus subtilis* con depleción de proteasa y amilasa SHA273 (descrita en WO92/11357 y WO95/10603 para expresar la enzima variante).

50 [0144] La variante de Termamyl V54W fue construida por el uso del siguiente cebador de mutagénesis (escrito 5'a 3', de izquierda a derecha): PG GTC GTA GGC ACC GTA GCC CCA ATC CGC TTG

[0145] La variante de Termamyl A52W+V54W fue construida por el uso del siguiente cebador de mutagénesis (escrito 5'a 3', de izquierda a derecha): PG GTC GTA GGC ACC GTA GCC CCA ATC CCA TTG GCT CG  
Cebador # 6616 (escrito 5'a 3', de izquierda a derecha, P denota un fosfato 5'): P CTG TGA CTG GTG AGT ACT CAA CCA AGT C

55 [0146] La variante de Termamyl V54E fue construida por el uso del siguiente cebador de mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha): PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCC TCA TCC GCT TG

60 [0147] La variante de Termamyl V54M fue construida por el uso del siguiente cebador de mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha): PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCC ATA TCC GCT TG

[0148] La variante de Termamyl V54I fue construida por el uso del siguiente cebador de mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha): PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCA ATA TCC GCT TG

65 [0149] Las variantes de Termamyl Y290E y Y290K fueron construidas mediante el uso del siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha): PGC AGC ATG GAA CTG CTY ATG AAG AGG CAC GTC AAA C

## ES 2 432 519 T3

Y representa una mezcla igual de C y T. La presencia de un codón que codifica bien glutamato o lisina en la posición 290 fue verificada por secuenciación del ADN.

- 5 [0150] La variante de Termamyl N190F fue construida por el uso del siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha): PCA TAG TTG CCG AAT TCA TTG GAA ACT TCC C
- [0151] La variante de Termamyl N188P+N190F fue construida por el uso del siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha): PPCA TAG TTG CCG AAT TCA GGG GAA ACT TCC CAA TC
- 10 [0152] La variante de Termamyl H140K+H142D fue construida por el uso del siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha): PCC GCG CCC CGG GAA ATC AAA TTT TGT CCA GGC TTT AAT TAG
- [0153] La variante de Termamyl H156Y fue construida por el uso del siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha): PCA AAA TGG TAC CAA TAC CAC TTA AAA TCG CTG
- 15 [0154] La variante de Termamyl A181T fue construida por el uso del siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha): PCT TCC CAA TCC CAA GTC TTC CCT TGA AAC
- [0155] La variante de Termamyl A209V fue construida por el uso del siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha): PCTT AAT TTC TGC TAC GAC GTC AGG ATG GTC ATA ATC
- 20 [0156] La variante de Termamyl Q264S fue construida por el uso del siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha): PCG CCC AAG TCA TTC GAC CAG TAC TCA GCT ACC GTA AAC
- [0157] La variante de Termamyl S187D fue construida por el uso del siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha): PGC CGT TTT CAT TGT CGA CTT CCC AAT CCC
- 25 [0158] La variante de Termamyl DELTA (K370-G371-D372) (es decir, eliminada de residuos de aminoácidos nos. 370, 371 y 372) fue construida por el uso del siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha): PGG AAT TTC GCG CTG ACT AGT CCC GTA CAT ATC CCC
- 30 [0159] La variante de Termamyl DELTA(D372-S373-Q374) fue construida por el uso del siguiente cebador de mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha): PGG CAG GAA TTT CGC GAC CTT TCG TCC CGT ACA TAT C
- 35 [0160] Las variantes de Termamyl A181T y A209V fueron combinadas a A181T+A209V mediante la digestión del A181T que contiene plásmido tipo pDN1528 (es decir, pDN1528 conteniendo dentro de amyL la mutación que da como resultado la alteración de A181T) y el plásmido tipo pDN1528 que contiene A209V (es decir, pDN1528 que contiene dentro amyL la mutación que da como resultado la alteración A209V) con la enzima de restricción Cla I que corta los plásmidos tipo pDN1528 dos veces dando como resultado un fragmento de 1116 pb y la parte-vector (es decir, contiene el origen de replicación del plásmido) de 3850 pb. El fragmento que contiene la mutación A209V y la parte del vector que contiene la mutación A181T se purificaron mediante el kit de extracción de gel QIAquick (adquirido de Qiagen) después de la separación en un gel de agarosa. El fragmento y el vector fueron ligados y transformados en la cepa de *Bacillus subtilis* con depleción de proteasa y amilasa mencionada anteriormente. El plásmido de amy+ (limpieza de zonas en almidón que contiene placas de agar) y los transformantes resistentes a cloranfenicol fueron analizados para la presencia de ambas mutaciones en el plásmido.
- 40 [0161] En forma similar a como se ha descrito anteriormente, H156Y y A209V fueron combinados utilizando las endonucleasas de restricción Acc65I y EcoRI, dando H156Y+A209V.
- 45 [0162] H156Y +A209V y A181T+A209V fueron combinadas en H156Y+ A181T+A209V mediante el uso de endonucleasas de restricción Acc65I y HindIII.
- [0163] Los 35 residuos N-terminales de la parte madura de la variante de Termamyl H156Y+A181T+A209V fueron sustituidos por los 33 residuos N-terminales de la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* (SEC ID N.º 4) (que en el presente contexto se denomina BAN) por un enfoque de SOE-PCR (Higuchi et al. 1988, *Nucleic Acids Research* 16:7351) de la siguiente manera:
- 55 Cebador 19364 (secuencia 5'-3'): CCT CAT TCT GCA GCA GCA GCC GTA AAT GGC ACG CTG
- 60 Cebador 19362: CCA GAC GGC AGT AAT ACC GAT ATC CGA TAA ATG TTC CG
- Cebador 19363: CGG ATA TCG GTA TTA CTG CCG TCT GGA TTC
- Cebador 1C: CTC GTC CCA ATC GGT TCC GTC
- 65

[0164] Una PCR estándar, reacción en cadena de la polimerasa, se llevó a cabo utilizando la polimerasa termoestable Pwo de Boehringer Mannheim según las instrucciones del fabricante y los ciclos de temperatura: 5 minutos a 94 °C, 25 ciclos de (94 °C durante 30 segundos, 50 °C durante 45 segundos, 72 °C durante 1 minuto), 72 °C durante 10 minutos.

5 [0165] Un fragmento de aproximadamente 130 pb fue amplificado en una primera PCR denotada PCR1 con los cebadores 19364 y 19362 en un fragmento de ADN que contiene el gen que codifica la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens*.

10 [0166] Un fragmento de aproximadamente 400 pb fue amplificado en otra PCR denotada PCR2 con los cebadores 19363 y 1C en el molde pDN1528.

15 [0167] PCR1 y PCR2 fueron purificadas a partir de un gel de agarosa y usadas como moldes en PCR3 con los cebadores 19364 y 1C, que dieron lugar a un fragmento de aproximadamente 520 pb. Este fragmento contiene así una parte del ADN que codifica el extremo N-terminal de BAN fusionado a una parte del ADN que codifica el Termamyl a partir del aminoácido 35.º.

20 [0168] El fragmento de 520 pb se subclonó en un plásmido tipo pDN1528 (que contiene el gen que codifica la variante de Termamyl H156Y+A181T+A209V) mediante la digestión con endonucleasas de restricción Pst I y SacII, la ligadura y la transformación de la cepa de *B. subtilis* como se ha descrito anteriormente. La secuencia de ADN entre los sitios de restricción Pst I y Sac II se verificó mediante secuenciación de ADN de los plásmidos extraídos de amy+y transformantes resistentes al cloramfenicol.

25 [0169] La construcción final que contiene el extremo N-terminal correcto de BAN yH156Y+ A181T+A209V fue marcada como BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+A209V.

30 [0170] N190F fue combinado con BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+A209V dando BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+N190F+A209V mediante la realización de mutagénesis como se describió anteriormente excepto que la secuencia de amyL en pJeEN1 fue sustituida por la secuencia de ADN que codifica la variante de Termamyl BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+A209V

35 [0171] Q264S fue combinado con BAN (1-35)+H156Y+A181T+A209V dando BAN (1-35)+H156Y+A181T+A209V+Q264S mediante la realización de mutagénesis como se describió anteriormente excepto que la secuencia de amyL en pJeEN fue sustituida por la secuencia de ADN que codifica la variante de Termamyl BAN (1-35)+H156Y+A181T+A209V.

40 [0172] BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+A209V+Q264S y BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+N190F+A209V fueron combinados en BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+N190F+A209V+Q264S utilizando endonucleasas de restricciónBsaHI (BsaHI sitio fue introducido cerca de la mutación A209V) y PstI.

#### 40 EJEMPLO 2

45 Construcción, localizada por mutagénesis aleatoria dopada, de variantes de  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl que tienen una mejor estabilidad a pH bajo y una dependencia reducida de iones de calcio para la estabilidad en comparación con la enzima madre

50 [0173] Las  $\alpha$ -amilasas son de gran importancia para el proceso de licuefacción del almidón industrial. La variante de la  $\alpha$ -amilasa deBlicheniformis termpoestable consistiendo en los aminoácido 1-33 de la amilasa de *B. amyloliquefaciens* (SEC ID N.º 4) fusionados a los aminoácidos 36-483 de la amilasa de *B. licheniformis* (SEC ID N.º 2) y que comprende además las siguientes mutaciones:

Y156, T181, F190, V209 y S264 (la construcción de esta variante se describe en el Ejemplo 1)

55 tiene una estabilidad muy satisfactoria a bajo pH y concentraciones bajas de calcio. En un intento de mejorar aún más la estabilidad a bajo pH y baja concentración de calcio de dicha variante de  $\alpha$ -amilasa, se llevó a cabo una mutagénesis aleatoria en regiones preseleccionadas.

[0174] Las regiones fueron:

Región	Residuo
I:	Phe153-Thr163
II:	Gln178-Asn192
III:	His205-Arg214
IV:	Ala232-Asp237

y

VIII: Gly131-Lys136  
 IX: Asp164-Tyr175  
 X: Tyr 262-Thr278

Región cambiada	% total	% medio	Número de residuos
I:	35	88	8 de 11
II:	20	86	11 de 15
III:	27	88	10 de 10
IV:	34	91	11 de 12
VIII:	39	86	6 de 6
IX:	46	93	12 de 12
X:	27	90	12 de 13
VIII+IX:	18		
VIII+IX+II:	4		
II+III+IV:	2		
IV+I:	12		

[0175] Los números bajo % total dan el número total de aminoácidos de tipo salvaje (wt.) deseados en una región determinada después de dopaje. El número se obtiene por la multiplicación del número de posiciones mutadas (por ejemplo, 8 con respecto a la región I) por sus respectivos wt. en peso. Con respecto a la región I, el % total deseado es  $80 \times 80 \times 90 \times 90 \times 90 \times 90 \times 95 \times 90 / 100 = 35\%$ .

[0176] El % medio es el nivel de dopaje medio para el número total de posiciones de la región en cuestión (por ejemplo, 11 posiciones con respecto a la región I). Para la región I el % medio se calcula de la siguiente forma:  $80 + 80 + 90 + 90 + 90 + 90 + 95 + 90 = 705$  dividido por 11 = 88%

[0177] El software de DOPE (ver Materiales y Métodos) se utilizó para determinar los codones enriquecidos para cada cambio sugerido en las siete regiones minimizando la cantidad de codones de parada. La distribución exacta de nucleótidos se calculó en las tres posiciones del codón para dar la población sugerida de cambios de aminoácidos. Las regiones dopadas fueron dopadas específicamente en las posiciones indicadas para tener una alta probabilidad de tener los residuos deseados, pero todavía permitir otras posibilidades.

[0178] Por ejemplo, el original H156 en la secuencia wt. fue mutada en una Y, es decir, un nuevo codón, y luego dopado 10% para los demás residuos. Esa es la secuencia de ADN que tiene el código para una Y en lugar de una H. En la posición 156 la Tyr ha sido programado para ser 90% deseada y otros residuos se han permitido libremente. Para algunas posiciones no era posible crear la población sugerida de residuos de aminoácidos debido a que el código genético restringía los residuos deseados estructural y funcionalmente. Los resultantes siete oligonucleótidos dopados se muestran en las tablas 1-7: con las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos wt. y la distribución de nucleótidos para cada posición dopada. Todos los cebadores de la genoteca se sintetizaron en forma de cadenas con sentido.

25 Tabla 1: Genoteca DASI (Phe153-Thr163)

153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163  
 Phe Lys Trp Tyr Trp Tyr His Phe Asp Gly Thr  
 Cebador: 5'CGC GGC AGC ACA TAC AGC GAT T1T 2A3 TGG 45T TGG 67T  
 8AT TTT GAC GGA A9C GAT TGG GAC GAG TCC CGA AAG3'

Distribución de nucleótidos para cada posición dopada.

1: 80% T, 20% A.  
 2: 96% A, 2% G, 2% C.



## ES 2 432 519 T3

3:	98% A, 2% T.
4:	93% T, 4% G, 3% A.
5:	97% A, 3% G.
6:	98% T, 2% A.
7:	97% A, 3% C.
8:	90% C, 10% T.
9:	95% C, 5% A.

Tabla 2: Genoteca DASII (Gln178-Asn192)

178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192  
 Gln Gly Lys Thr Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Phe Gly Asn  
 Cebador: 5'CTG AAC CGC ATC TAT AAG TTT 1A2 34T AAG 567 TGG GAT  
 89G GA10 GTT A11T 1213T GAA T1415 161718 AAC TAT GAT TAT TTG  
 ATG TAT3'

Distribución de nucleótidos para cada posición dopada.

1:	93% C, 7% A.
2:	84% G, 16% T.
3:	95% G, 5% A.
4:	95% G, 5% C.
5:	94% A, 6% G.
6:	95% C, 5% A.
7:	62% T, 38% G.
8:	87% T, 13% A.
9:	91% G, 9% C.
10:	92% G, 8% T.
11:	90% G, 5% A, 5% C.
12:	88% A, 12% C.
13:	88% A, 12% C.
14:	93% T, 5% A, 2% C.
15:	97% T, 3% G.
16:	86% G, 14% A.
17:	89% G, 11% C.
18:	60% G, 40% T.

5

Tabla 3: Genoteca DASIII (His205-Arg214)

205 206 207 208 209 210 211 212 213 214  
 His Pro Asp Val Val Ala Glu Ile Lys Arg  
 Cebador: 5'TAT GCC GAC ATC GAT TAT GAC 12T 3CT 456 7TT 8910 1112T  
 13A14 15T16 A17A 1819A TGG GGC ACT TGG TAT GCC AAT 3'

## ES 2 432 519 T3

Distribución de nucleótidos para cada posición dopada.

1:	89% C, 11% T.
2:	89% A, 11% G.
3:	95% C, 2.5 %T, 2.5% A.
4:	96% G, 1% A, 3% T.
5:	96% A, 4% C.
6:	98% T, 2% A.
7:	95% G, 2.5% A, 2.5% C.
8:	93% G, 7% A.
9:	96% T, 4% A.
10:	84% A, 16% G.
11:	81% G, 7% A, 7% T, 5% C.
12:	98% C, 2% A.
13:	96% G, 4% C.
14:	94% G, 6% T.
15:	82% A, 18% T.
16:	50% A, 50% T.
17:	90% A, 10% G.
18:	70% A, 30% C.
19:	86% G, 14% A

Tabla 4: Genoteca DASIV (Ala232-Asp243)

232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243
Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys	Phe	Ser	Phe	Leu	Arg	Asp
Cebador: 5' TTG GAC GGT TTC CGT CTT GAT 12T G3T AAA 456 7TT A8G											
T9T 1011T T12T 13T14 1516G GA17 TGG GTT AAT CAT GTC AGG GAA											

Distribución de nucleótidos para cada posición dopada.

1:	93% G, 3.5% A, 3.5% T.
2:	94% C, 4% T.
3:	94% T, 6% C.
4:	93% C, 2% T, 2% A, 3% G.
5:	98% A, 2% T.
6:	98% T, 2% A.
7:	95% A, 5% C.
8:	94% A, 6% G.
9:	90% T, 10% A.
10:	89% T, 11% A.
11:	89% C, 11% A.
12:	95% T, 5% A.
13:	64% C, 33% T, 3% A.

## ES 2 432 519 T3

14:	93% A, 7% T.
15:	90% A, 10% C.
16:	90% G, 5% A, 5% C
17:	90% T, 10% A

Tabla 5: Genoteca DASVIII (Gly131-Lys136)

131 132 133 134 135 136

Gly Glu His Leu Ile lys

Cebador: 5' GCT GAC CGC AAC CGC GTA ATT TCA 123 GA4 56T 78A 9TA

A10G GCC TGG ACA CAT TTT CAT TTT 3'

Distribución de nucleótidos para cada posición dopada.

1:	91% G, 9% A.
2:	87% G, 13% C.
3:	90% T, 10% G.
4:	90% G, 10% T.
5:	85% C, 8% T, 7% A.
6:	89% A, 9% T, 2% C.
7:	88% T, 12% A
8:	88% T, 11% C, 1% G
9:	92% A, 8% T
10:	93% A, 7% G

5

Tabla 6: Genoteca DASIX (Asp164-Tyr175)

164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175

Asp Trp Asp Glu Ser Arg lys Leu Asn Arg Ile Tyr

Cebador: 5' TGG TAC CAT TTT GAC GGA ACC GAT TGG 1A2 GAG 3CG CGA

A4G 56A A7T A8G 9 1011 T12T AAG TTT CAA GGA AAG GCT TGG 3'

Distribución de nucleótidos para cada posición dopada.

1:	94% G, 6% A.
2:	96% T, 4% G.
3:	92% T, 4% A, 4% G.
4:	95% A, 5% G.
5:	93% C, 7% A.
6:	92% T, 8% A.
7:	90% A, 5% G, 5% C.
8:	90% G, 10% A.
9:	92% A, 6% G, 2% T.
10:	92% T, 8% A.
11:	50% T, 50% C.
12:	96% A, 4% T.

10

## ES 2 432 519 T3

Tabla 7: Genoteca DASX (Tyr262-Asn278)

262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 374 275 276 277

278

Tyr Trp Ser Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr

Asn

Cebador: 5'GAA ATG TTT ACG GTA GCT GAA TTT TGG 234 56T 7A8 91011  
1213T 1415T 16T17 GA18 A19T T20T 21T22 A23C A24G ACA 25AT TTT  
AAT CAT TCA GTG TTT GAC3'

Distribución de nucleótidos para cada posición dopada.

1:	95% A, 5% T.
2:	97% A, 3% G.
3:	95% G, 2.5% A, 2.5% C.
4:	94% T, 6.2% G.
5:	97% A, 3% T.
6:	94% A, 3% G, 3% C.
7:	95% G, 5% A.
8:	95% T, 5% A.
9:	52% T, 45% C, 3% A.
10:	96% T, 4% C.
11:	60% A, 40% G.
12:	90% G, 10% A.
13:	94% G, 6% C.
14:	81% G, 8% A, 8% T, 3% C.
15:	98% C, 2% T.
16:	90% C, 10% A.
17:	50% G, 50% T.
18:	90% A, 10% T.
19:	90% A, 5% G, 5% C.
20:	95% A, 5% T.
21:	91% T, 9% A.
22:	92% A, 8% G.
23:	94% A, 3% G, 3% C.
24:	93% G, 7% A.
25:	90% A, 10% G.

### 5 Mutagénesis aleatoria

[0179] Los oligonucleótidos enriquecidos aparentes de las Tablas 1-7 (que, por definición común, se designa FDAS en la Fig. 3) y cebadores reversos RDAS para cada región y cebadores de *B. licheniformis* específicos que cubren los sitios SacI y Sall se utilizan para generar fragmentos de genoteca de PCR mediante el método de extensión de solapamiento (Horton et al., Gene, 77 (1989), pp. 61-68) un solapamiento de 21 bp. La Figura 3 muestra la estrategia PCR. Los fragmentos de PCR se clonaron en el vector transportador de *E. coli/Bacillus* pSNK101 (véase Materiales y Métodos) que permite la mutagénesis en *E. coli* y la expresión inmediata en *Bacillus subtilis* previniendo la acumulación letal de amilasas en *E. coli*. Después de establecer los fragmentos de PCR clonados en *E. coli*, un fragmento de pUC19 modificado se digirió fuera del plásmido y el promotor y el gen Termamyl mutado se conecta físicamente y la expresión puede tener lugar en *Bacillus*.

**Selección**

[0180] Las siete genotecas pueden ser examinadas en el bajo pH y los ensayos de filtros de calcio bajo se describen a continuación.

5

**Ensayo de filtro de bajo pH**

[0181] Genotecas de *Bacillus* se colocan 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 mg/ml de cloranfenicol a 37 °C durante al menos 21 horas. La capa de acetato de celulosa se encuentra en la placa de agar TY.

10

[0182] Cada sándwich de filtro se marca específicamente con una aguja después de la colocarse en placa, pero antes de la incubación con el fin de poder localizar variantes positivas en el filtro y el filtro de nitrocelulosa con variantes enlazadas se transfiere a un recipiente con tampón de citrato, pH 4,5 y se incubó a 80 °C durante 15 min. Los filtros de acetato de celulosa con colonias se almacenan en las placas TY a temperatura ambiente hasta su uso. Después de la incubación, se detecta actividad residual en placas que contenían 1% de agarosa, almidón de 0,2% en tampón citrato, pH 6,0. 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 50°C. Después de la eliminación de los filtros, las placas de ensayo se tiñeron con una solución de Lugol 10%. Variantes degradantes del almidón son detectadas como puntos blancos sobre un fondo azul oscuro y luego se identifican en las placas de almacenamiento. Variantes positivas se volvieron a seleccionar dos veces bajo las mismas condiciones que la primera selección.

15

20

**Ensayo de filtro de bajo nivel de calcio**

25

[0183] El ensayo se realiza de la misma manera que el ensayo de filtro de bajo pH con las siguientes modificaciones: El filtro con las proteínas unidas se incuba a 95 °C, pH 6,0 durante 1 h. con diferentes concentraciones de EDTA (0,001 mM - 100 mM).

30

[0184] Las siguientes variantes se obtuvieron por el método anterior (BAN designa la la α-amilasa de *B. amyloliquefaciens*).

\* BAN/híbrido Termamyl\*+ H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S+E211Q

35

•BAN/híbrido Termamyl\*+H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+H205C+D207Y+A210S

[0185] Las mutaciones indicadas en negrita fueron introducidas por el método de mutagénesis aleatoria. Los datos de estabilidad para estas variantes aparecen en la Tabla 11 en el Ejemplo 3.

40

[0186] De una manera análoga a la descrita anteriormente, la mutagénesis aleatoria de las siete regiones identificadas anteriormente se llevan a cabo en la α-amilasa progenitora de *B. licheniformis* de la SEC ID N.º 2. El esquema de dopaje se determina de manera análoga a la utilizada anteriormente.

**EJEMPLO 3**

45

**Medición del calcio y la estabilidad dependiente del pH**

[0187] Normalmente, el proceso de licuefacción industrial se ejecuta utilizando pH 6,0-6,2 como pH de licuefacción y una adición de 40 ppm de calcio libre con el fin de mejorar la estabilidad a 95 °C-105 °C. Algunas de las sustituciones propuestas en este documento se han realizado con el fin de mejorar la estabilidad en

50

1. pH inferior a pH 6,2 y/o
2. en los niveles de calcio libre inferior a 40 ppm de calcio libre.

[0188] Tres métodos diferentes han sido usados para medir las mejoras en estabilidad obtenidas por las diferentes sustituciones en Termamyl:

55

1. Un ensayo que mide la estabilidad a pH reducido ligeramente, pH 5,5, en presencia de 40 ppm de calcio libre. (de este modo, se mide la mejora de la estabilidad a pH bajo). 10 µg de la variante fueron incubados bajo las condiciones siguientes: Una solución de 0,1 M acetato, pH 0,1 ajustado a pH 5,5, que contiene 40 ppm de calcio y 5% p/p de almidón de maíz común (libre de calcio). La incubación se hizo en al baño maría a 95 °C durante 30 minutos.

60

2. Otro ensayo que mide la estabilidad en la ausencia de calcio libre y donde el pH se mantiene a pH 6,2. Este ensayo mide la disminución de la sensibilidad al calcio:

## ES 2 432 519 T3

10 µg de la variante fueron incubados bajo las condiciones siguientes: Una solución de acetato 0.1 M, pH ajustado a pH 6,2, que contiene 5% p/p de almidón de maíz común (libre de calcio). La incubación se hizo en el baño maría a 95 °C durante 30 minutos.

- 5 3. Un tercer ensayo donde las condiciones de los ensayos n.º 1 y 2 hayan sido combinados. Este ensayo mide la estabilidad en la ausencia de calcio libre y a pH bajo (pH 5.5).
4. Un cuarto ensayo similar al n.º 3. donde el pH se ha reducido aún más a pH 5,0

### 10 Determinación de la estabilidad

[0189] Todos los ensayos de estabilidad de 1,2, 3 y 4 se han realizado utilizando la misma configuración. El método fue:

- 15 [0190] La enzima fue incubada bajo las condiciones pertinentes (1-4). Se tomaron muestras a 0, 5, 10, 15 y 30 minutos y se diluyeron 25 veces (misma dilución para todas las muestras tomadas) en tampón de ensayo (0,1 M tampón 50 mM Britton pH 7,3) y la actividad se midió usando el ensayo de Phadebas (Pharmacia) bajo condiciones estándar de pH 7.3, 37 °C.

- 20 [0191] La actividad medida antes de la incubación (0 minutos) fue usada como referencia (100%). La disminución en porcentaje se calculó como una función del tiempo de incubación. La tabla muestra la actividad residual después de 30 minutos de incubación.

### Determinación de la actividad específica.

- 25 [0192] La actividad específica se determinó usando el ensayo de Phadebas (Pharmacia) como actividad/mg de enzima. La actividad se determinó usando el ensayo de α-amilasa que se describe en la sección Materiales y Métodos del presente documento.

### Resultados:

- 30 [0193]

**Tabla 8: Método de Estabilidad n.º1./Mejora de la estabilidad a pH bajo**

Variante	actividad residual después de 30min. de incubación	Actividad específica, 37°C, pH 7.3. Porcentaje con respecto al Termamyl
Termamyl wt.	5%	100%
H156Y	15%	100%
A209V	18%	100%
Q264S	30%	130%
H156Y+A181T+ A209V	39%	100%
H133Y+H156Y+ A181T+A209V+ H293Y+A294V+ G310D+H450Y	58%	85%
BAN/Termamyl	48%	115%
híbrido*+H156Y+A181T+ A209V		

**Tabla 9: Método de Estabilidad n.º2./Disminución de la sensibilidad de calcio**

Variante	actividad residual después de 30min. de incubación	Actividad específica, 37°C, pH 7.3. Porcentaje con respecto al Termamyl
Termamyl wt.	52%	---
H156Y	70%	---
A209V	75%	---
A181T	57%	115%

N190F	34%	140%
N190F+N188P	57%	190%

**Tabla 10: Método de Estabilidad n.º3./Mejora de la estabilidad a pH bajo+disminución de la sensibilidad de calcio**

Variante	Actividad residual después de 30min. de incubación	Actividad específica, 37°C, pH 7.3 Unidades/mg enzima
Termamyl wt.	3%	---
BAN/híbrido Termamyl*+H156Y+A181T+ A209V	20%	---
Q264S	5%	---
H140K+H142D	5%	115%
V128E	50%**	115%
BAN/híbrido Termamyl*+ H156Y+A181T+ N190F+ A209V	39%	170%
BAN/híbrido Termamyl*+ H156Y+A181T+ A209V+Q264S	29%	175%
BAN/híbrido Termamyl*+ H156Y+A181T+N19 0F+A209V+Q264S	57%	210%

\* BAN ( $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* (SEC ID N.º 4)/Termamyl ( $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* (SEC ID N.º 2) híbrido PCR. Los primeros 33 aminoácidos N-terminales son BAN y el resto 36-483 son Termamyl (la construcción de la variante se describe en el Ejemplo 1).

\*\* Medido después de 5min. de incubación En comparación con Termamyl wt., que bajo las mismas condiciones muestra la actividad residual de 36%.

**5 Tabla 11: Método de Estabilidad n.º4./Mejora de la estabilidad a pH bajo (pH 5,0)+disminución de la sensibilidad de calcio**

Variante	Actividad residual después de 30min. de incubación	Actividad específica, 37°C, pH 7.3 Unidades/mg enzima
BAN/híbrido Termamyl*+ H156Y+A181T+N19 A209V+Q264S 0F+	9%	210%
BAN/híbrido Termamyl*+ H156Y+A181T+N19 A209V+Q264S+E211Q 0F+	28%	160%
BAN/híbrido Termamyl*+ H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S+H205C+D207Y+A21 0S	33%	130%

\* como se indica en relación a la Tabla 10

[0194] Las variantes en la anterior Tabla 11 se construyeron por medio de la mutagénesis aleatoria localizada descrita en el Ejemplo 2.

10

#### EJEMPLO 5

#### Estabilidad de la $\alpha$ -amilasa a pH bajo y alta temperatura

15

[0195] Este ejemplo resume los resultados de la estabilidad de las variantes caracterizadas por un ensayo fluorimétrico a 70°C bajo dos condiciones diferentes, (1) pH 4.5 y 1 mM CaCl<sub>2</sub> y (2) pH 6.2 y 10  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>.

#### Descripción del método

[0196] Todos los experimentos de fluorescencia se realizaron en un espectrómetro de luminiscencia Perkin-Elmer LS-50 usando un soporte de 4 cubetas. La temperatura se controló mediante un baño de agua circulante y se midió directamente en la cubeta usando un termómetro digital Noronix (modelo NTD 100). Durante las mediciones, la mezcla completa de los reactivos en la cubeta se aseguró usando agitadores magnéticos que operan a una alta velocidad de agitación. Las cubetas fueron tapadas con tapas de teflón para minimizar la evaporación.

[0197] La fluorescencia intrínseca de las proteínas (debido a las cadenas laterales Trp) se monitorizó mediante excitación a 280 nm y emisión a 350 nm. El ancho de las hendiduras fue 5 nm.

[0198] Durante las mediciones cinéticas, 4 reacciones se controlaron en paralelo. Los datos fueron recogidos en el diálogo de *Wavelength Programme*, permitiendo la recogida de datos automática durante un período prolongado (por ejemplo, más de una hora).

[0199] El despliegue se efectuó a 70°C. Las condiciones de despliegue fueron.

(1) 50 mM NaOAc pH 4.5 y 1 mM CaCl<sub>2</sub>

(2) 50 mM NaOAc pH 6.2 y 10 μM CaCl<sub>2</sub>.

La concentración de proteína fue 5 μg/ml y el glicerol fue de 0,5% en p/v (a partir de la solución madre de proteína).

[0200] Nota: Hubo alguna variación de un día a otro en el valor absoluto de las medias veces de despliegue debido a leves variaciones de temperatura (ocasionadas por, por ejemplo, diferentes cantidades de agua en el baño maría). Sin embargo, Termamyl se incluyó siempre como una de las cuatro enzimas analizadas en cada experimento, por lo que es en efecto un estándar interno. Tasas de despliegue en relación con este estándar interno fueron satisfactoriamente reproducibles (realizados por triplicado). El análisis de datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism. A pH 4,5, los datos que se desarrollan se podrían encajar muy satisfactoriamente con un decaimiento exponencial simple con desvío:

$$F(t) = A \cdot \exp(-\ln(2) \cdot t / t_{1/2}) + \text{desvío} \cdot t + \text{equilibrio} \quad (1)$$

donde F es la fluorescencia medida, A es la amplitud del despliegue, t es el tiempo y t<sub>1/2</sub> es la media de tiempo de desarrollo.

[0201] A pH 6,2, el despliegue era más complejo (implicando una primera fase lag), y los datos no pudieron ser encajados en eq. 1. En su lugar, el tiempo necesario para que la señal de fluorescencia se deteriorara al 50% de la señal inicial se utilizó como una aparente t<sub>1/2</sub>.

[0202] A partir de estos tiempos medios, el cambio en la energía libre de despliegue con relación al de Termamyl podría ser calculado de la siguiente manera:

$$\text{DDG} = R \cdot T \cdot \ln(t_{1/2}^{\text{mutante}} / t_{1/2}^{\text{Termamyl}}) \quad (2)$$

donde R es la constante universal de los gases y T es la temperatura (el valor de R·T es 0,5919, dando un valor DDG en kcal/mol)

[0203] Mediante la conversión de los datos a valores DDG, los efectos desestabilizadores/estabilizadores de diferentes mutaciones se pueden comparar directamente y se examinaron para aditividad (DDG = DDG + DD<sub>1+212G</sub>) y sinergia (DDG<sub>1+2</sub> > DDG<sub>1</sub> + DDG<sub>2</sub>) donde DDG<sub>1+2</sub> es la energía-efecto de la introducción de las mutaciones 1 y 2.

## Resultados

[0204] El despliegue de las amilasas a bajo pH y alta temperatura puede ser seguido por la caída de la fluorescencia Trp. A pH 4,5 y 1 mM CaCl<sub>2</sub>, todas las amilasas se despliegan con bastante rapidez.

[0205] Los datos que se desarrollan a pH 4,5 se ajustan mejor a una ecuación exponencial doble que a una ecuación exponencial simple. Sin embargo, ya que la segunda fase es muy lenta, se aproxima por una desviación lineal (ecuación 1). El despliegue a pH 6,2 y 10 μM de CaCl<sub>2</sub> a 70 °C es mucho menos rápido que a pH 4.5 a pesar de la baja [Ca<sup>2+</sup>]. El despliegue está lejos de completarse en una hora y no es posible ajustar los datos a una ecuación exponencial simple. En su lugar, el tiempo necesario para que la señal de fluorescencia caiga al 50% de la señal inicial se utiliza como una aparente t<sub>1/2</sub>. Los resultados del ensayo de fluorescencia se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12



ES 2 432 519 T3

Resumen de los datos de despliegue de variantes de Termamyl pH 4,5 y pH 6,2 a 70°C. A pH 4,5, $t_{1/2}^{\text{Termamyl}} = 200$ s, a pH de 6,2, $t_{1/2}^{\text{Termamyl}} = 2800$ s. $DDG = -RT \cdot \ln(t_{1/2}^{\text{Termamyl}} / t_{1/2}^{\text{mutante}})$				
Mutación	pH 4.5, 1 mM CaCl <sub>2</sub>		pH 6.2, 10 μM CaCl <sub>2</sub>	
	DDG (kcal/mol)	$t_{1/2} / t_{1/2}^{\text{Termamyl}}$ 1	DDG (kcal/mol)	$t_{1/2} / t_{1/2}^{\text{Termamyl}}$ amilo
Tipo salvaje	0	1.0	0	1.0
A209V	-0.36	1.85	-0.72	3.39
H133Y+A209V	-0.77	3.67	-0.61	2.78
H156Y	0.06	0.90	-0.10	1.18
A181T	-0.06	1.10	-0.28	1.60
A181T+A209V	-0.44	2.09	< -1 (73%) a	> 5
S187D	0.37	0.54	0.19	0.72
H450Y	-0.49	2.29	0.15	0.78
L270D	-0.35	1.8	-0.10	1.2
A181T+H156Y	-0.17	1.34	-0.62	2.84
H133I	-0.33	1.75	-0.42	2.02
H133Y+H156Y+A181T+ A209V+H293Y+A294V+ G310D+H450Y	-0.96	5.10	< -1 (58%) a	>5
V128E	-0.10	1.2	-0.25	1.5
H156Y+A181T+A209V	-0.32	1.71	-0.49	2.30
H156Y+A181T+A209V+ H450Y	-0.42	2.05	-0.63	2.92
H156Y+A181T+A209V+ H450Y+H133I	-0.81	3.9	< -1 (65%) <sup>a</sup>	> 5
H156Y+A181T+A209V+ H133I	-0.70	3.3	< -1 (77%) <sup>a</sup>	> 5
Q264S	-0.26	1.6	-0.14	1.3
H156Y+A181T+A209V+     Delta (1,2)+L3V+M15T+ R23K+S31A+A32E+Y33H+A3	-0.43	2.1	-0.82	4.0
5S+E36D+H37I				
Q264S+N265Y	-0.33	1.8	-0.07	1.1
Q264S+N265Y+N190F	-1.07	6.1	-0.67	3.1
Q264S+N265Y+N190F+ H133I+A209V	-1.66	16.5	<-1(82%) <sup>a</sup>	> 5
H156Y+A181T+A209V+ Delta(1,2)+ L3V+M15T+ R23K+S31A+A32E+Y33H+ A35S+E36D+H37I+N190F	-0.30	1.7	<-1(66%) <sup>a</sup>	> 5
H156Y+A181T+A209V+Delt   a(1,2) +L3V+M15T+ R23K+S31A+A32E+Y33H+ A35S+E36D+H37I+Q264S	-0.43	2.1	-0.86	4.3

Tabla 12

Resumen de los datos de despliegue de variantes de Termamyl pH 4,5 y pH 6,2 a 70°C. A pH 4,5, $t_{1/2}^{\text{Termamyl}} = 200$ s, a pH de 6,2, $t_{1/2}^{\text{Termamyl}} = 2800$ s. $DDG = -RT \cdot \ln(t_{1/2}^{\text{Termamyl}} / t_{1/2}^{\text{mutante}})$				
Mutación	pH 4.5, 1 mM CaCl <sub>2</sub>		pH 6.2, 10 μM CaCl <sub>2</sub>	
	DDG (kcal/mol)	$t_{1/2} / t_{1/2}^{\text{Termamyl}}$ 1	DDG (kcal/mol)	$t_{1/2} / t_{1/2}^{\text{Termamyl}}$ amilo

H156Y+A181T+A209V+Delta(1,2)+L3V+M15T+R23K+S31A+A32E+Y33H+A35S+E36D+H37I Q264S+N190F	-0.36	1.8	<-1(76%) <sup>a</sup>	> 5
H156Y+A181T+A209V+N190F+Q264S	-1.3	8.6	< -1 (66%) <sup>a</sup>	> 5

<sup>a</sup> El porcentaje indica el nivel al que había disminuido el nivel de fluorescencia inicial en el transcurso de 3 horas a 70 °C. El lento declive es indicativo de una alta estabilidad.

EJEMPLO 5

Variantes de α-amilasa con aumento de la actividad específica

5 [0206] Este ejemplo resume los resultados de variantes caracterizadas por tener un aumento de la actividad específica en comparación con Termamyl wt. La presencia de estas sustituciones, ya sea en combinación unas con otras o como sustituciones individuales añadido a las sustituciones de estabilización aumenta la actividad específica de la variante resultante. La actividad específica se determinó usando el ensayo de α-amilasa (Phadebas) descrito en los Materiales y Métodos, donde se determinó la actividad/mg de enzima. La actividad se determinó utilizando la siguiente descripción en donde el pH fue de 7,3, temperatura de 37 °C y 15 minutos de tiempo de prueba, y el tampón tal como se ha definido.

MUTACIÓN	ACTIVACIÓN SPEC. (ENSAYO PHADEBAS), ÍNDICE CON RESPECTO AL TERMAMYL WT .
S187D	260%
V54I	160%
BAN/híbrido Termamyl: (Δ(1,2)+L3V+M15T+R23K+S31A+A32E+Y33H+A35S+E36D+H37I)	140%
Δ(D372+S373+Q374)	125%
Δ(K370+G371+D372)	125%
BAN/híbrido Termamyl: (Δ(1,2)+L3V+M15T+R23K+S31A+A32E+Y33H+A35S+E36D+H37I)+Δ(D372+5373+Q374)+V54I+S187D	360%
Q264S	130%
Y290E	155%
Y290K	140%
N190F	150%

15 EJEMPLO 6

Pruebas de especificidad de variantes (sacarificación)

20 [0207] Se ha informado anteriormente (patente de EE.UU. 5.234.823) que, en caso de sacarificación con glucoamilasa y pululanasa, la presencia de la actividad de α-amilasa residual que surge del proceso de licuefacción puede llevar a rendimientos más bajos de glucosa, si la α-amilasa no está inactivada antes de la etapa de sacarificación. Esta inactivación se puede llevar a cabo típicamente mediante el ajuste del pH por debajo de 4.3 a 95 °C, antes de bajar la temperatura a 60 °C para la sacarificación.

25 [0208] La razón de este efecto negativo en el rendimiento de la glucosa no se entiende completamente, pero se supone que la α-amilasa liquefactante (por ejemplo Termamyl 120 L de B. licheniformis) genera "dextrinas límite" (que son sustratos pobres para la pululanasa), mediante hidrólisis de enlaces glucosídicos alfa-1,4 cerca y en ambos lados de los puntos de ramificación en la amilopectina. La hidrólisis de estas dextrinas límite por la glucoamilasa conduce a una acumulación del trisacárido panosa, que es hidrolizado sólo lentamente por la glucoamilasa.

30 [0209] El desarrollo de una α-amilasa termoestable, que no sufra de esta desventaja sería una mejora significativa, ya que no haría falta ninguna etapa de inactivación por separado.

[0210] Diversas variantes de  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*, con especificidad alterada, fueron evaluadas mediante sacarificación de un sustrato DE 10 maltodextrina con glucoamilasa de *A. niger* y pululanasa de *B. acidopullulyticus* en condiciones en las que la amilasa variante estaba activa.

- 5 [0211] Las reacciones de sacarificación se controlaron mediante la toma de muestras a intervalos de 24 horas y analizándolas por HPLC. Las condiciones de reacción estándar fueron:

Concentración de sustrato	28.2% p/p
Temperatura	60°C
pH inicial (a 60°C)	4.7
Dosis de enzima	
Glucoamilasa	0.18 AG/g DS
pululanasa	0.06 PUN/g DS
$\alpha$ -amilasa	60 NU/g DS

Se utilizaron las siguientes enzimas:

10

Glucoamilasa:	AMG (Novo Nordisk)	153 AG/g
Pululanasa:	Promozyme (Novo Nordisk)	295 PUN/g
$\alpha$ -amilasa:		
	Termamyl (Novo Nordisk)	135 KNU/g
	V54Y	313 KNU/g
	A52W	5,116 NU/ml
	D53E	3,280 NU/ml
	D53W	599 NU/ml
	A52W+V54Y	134 NU/ml

Las mutaciones que figuran en la lista de  $\alpha$ -amilasa anterior se utilizan para indicar las variantes de  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* (SEC ID N.º 2) (Termamyl) que ha sido modificada por la mutación(es) indicada(s).

- 15 [0212] Los sustratos para la sacarificación fueron preparados disolviendo 230g de maltodextrina secada por pulverización DE 10, preparada a partir de almidón de maíz común, en 460 ml de agua desionizada hirviendo y ajustando la sustancia seca a aproximadamente 30% p/p. El pH se ajustó a 4,7 (medido a 60 °C) y partes alícuotas de sustrato correspondientes a 15 g de peso en seco fueron transferidas a matraces de vidrio de 50 ml de tapa azul.

- 20 [0213] Los matraces se colocaron a continuación en un baño de agua con agitación equilibrado a 60 °C, y los enzimas añadidas. El pH se reajustó a 4,7 en caso necesario. Se tomaron periódicamente muestras de 2 ml, el pH se ajustó a aproximadamente 3,0 y después se calentó en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos para inactivar las enzimas. Después de enfriar, las muestras se trataron con aproximadamente 0,1 g de resina de intercambio de iones de lecho mixto (BIO-Rad 501 X8 (D)) durante 30 minutos en un mezclador giratorio para eliminar las sales y N soluble.
- 25 Después de la filtración, la composición de carbohidratos se determinó por HPLC. Después de 72 horas, se obtuvieron los siguientes resultados:

$\alpha$ -amilasa añadida	% DP1	% DP2	% DP3	% DP4+
Ninguno (control)	96.59	2.2	0.3	1.0
V54Y	96.5	2.2	0.4	0.9
A52W+V54Y	96.4	2.2	0.5	0.9
Termamyl	96.3	2.1	0.8	0.8

- 30 En comparación con el control (sin presencia de  $\alpha$ -amilasa activa durante la licuefacción), la presencia de variantes de  $\alpha$ -amilasa activa V54Y y A52W+V54Y no dio lugar a niveles elevados de panosa (DP3).

[0214] Si se utilizan estas variantes de  $\alpha$ -amilasa para la licuefacción de almidón, no será necesario inactivar la enzima antes del comienzo de la sacarificación.

5 EJEMPLO 7

**Evaluación de las variantes de *B. licheniformis* en condiciones de licuefacción simulada**

10 [0215] El proceso estándar para la licuefacción de almidón industrial comprende dos etapas, a las normalmente se hace referencia como licuefacción primaria y secundaria. En la primera etapa, un 30-40 % p/p de suspensión de almidón a un pH de 5,5-6,0, a la que se ha añadido una  $\alpha$ -amilasa termoestable de *B. licheniformis* o *B. stearothermophilus*, se calienta a 105-110 °C en un cocedor en chorro donde se inyecta vapor vivo en la corriente de almidón. Después de un tiempo de mantenimiento de 5-10 minutos bajo presión a esta temperatura, el almidón licuado es sometido a enfriamiento rápido a una temperatura aproximadamente de 95 °C y se mantuvo a esa temperatura durante 60-120 minutos.

15 [0216] Con el fin de evaluar pequeñas cantidades de enzimas a escala de laboratorio se utilizó el método siguiente:

20 Alícuotas de 10 g de una suspensión de almidón de maíz común (Cerestar GL 3406) en agua desionizada (aprox. 30 % p/p) se pesaron en matraces cónicos de 100 ml (Schott GL 125), que están equipados con tapones de rosca de cierre hermético. El pH, el nivel de calcio y la dosis de la enzima en la suspensión pueden ser variados.

25 Para cada conjunto diferente de condiciones experimentales se utilizan 4 matraces. Los matraces se colocaron en un baño de aceite con agitación (Heto VS 01) mantenido a 105 °C. Después de un período de 7 minutos, se vierte aceite frío en el baño para bajar la temperatura a 95 °C. Para cada serie de experimentos, los matraces se retiran después de 20, 40, 60 y 90 minutos y se enfrían inmediatamente con agua corriente. Una gota de HCl 1 N se añade a cada matraz para inactivar la enzima. La reacción se controla midiendo el DE (contenido de azúcares reductores expresados como glucosa) utilizando el método de Neocuproine.

30 [0217] Los detalles de este método se pueden encontrar en "Determination of reducing sugar with improved precision. Dygert, Li, Florida and Thomas, Anal Biochem, 13, 368 (1965).

[0218] Los siguientes DE se registraron después de 90 minutos

35

pH 6.0  
 5 ppm calcio añadido  
 10.9mg proteína enzimática  
 /g de almidón

I.D no.	Ter mamy l	Hybr ido+ H156 Y+ A181 T+ A209 V+ N190 F+Q2 64S	Hybr id+ H156 Y+ A181 T+ A209 V+ N190 F	H156 Y+ A181 T+ A209 V+N1 90F+ Q264 S	Hybr ido+ H156 Y+ A181 T+ A209 V+ Q264 S	Hyb rido + H15 6Y+ A18 1T+	Q26 4S	Q264 S+N2 65Y	Q264 S+N2 65Y+ N190 F	H156Y + A181T + A209V
045 -96		16.0	16.9	13.2						
038 -96	6.5	13.9								
035 -96			15.2		12.9	9.9				
033 -96							6.7	7.2	12.1	
031 -96	4.5						7.0	8.8	12.5	
029 -96	4.0					8.7	5.2			7.7
039 -96		14.9	16.3		14.4					

- Híbrido = híbrido de PCR BAN/Termamyl como se describe en Ejemplo 3

pH 6.0 40 ppm calcio añadido 10.9mg proteína enzimática /g almidón	I.D. no.	Termamyl
	045-96	12.6
	007-97	12.1

pH 5.5 5 ppm calcio añadido 10.9mg proteína enzimática /g almidón
--

I.D. no.	Hybrido + H156Y+ A181T+ A209V+ N190F+Q264S	Hybrido + H156Y+ A181T+ A209V+ N190F	H156Y+ A181T+ A209V+N190F+Q2 64S
001-97	14.8	15.2	12.6

5 REFERENCIAS CITADAS

[0219]

- 10 Klein, C., et al., Biochemistry 1992, 31, 8740-8746,
- Mizuno, H., et al., J. Mol. Biol. (1993) 234, 1282-1283,
- Chang, C., et al, J. Mol. Biol. (1993) 229, 235-238,
- 15 Larson, S.B., J. Mol. Biol. (1994) 235, 1560-1584,
- Lawson, C.L., J. Mol. Biol. (1994) 236, 590-600,
- Qian, M., et al., J. Mol. Biol. (1993) 231, 785-799,
- 20 Brady, R.L., et al., Acta Crystallogr. sect. B, 47, 527-535,
- Swift, H.J., et al., Acta Crystallogr. sect. B, 47, 535-544
- 25 A. Kadziola, Ph.D. Tesis: "An alpha-amylase from Barley and its Complex with a Substrate Analogue Inhibitor Studied by X-ray Crystallography", Department of Chemistry University of Copenhagen 1993
- MacGregor, E.A., Food Hydrocolloids, 1987, Vol.1, No. 5-6, p.
- 30 B. Diderichsen and L. Christiansen, Cloning of a maltogenic  $\alpha$ -amylase from *Bacillus stearothermophilus*, FEMS Microbiol. letters: 56: pp. 53-60 (1988)
- Hudson et al., Practical Immunology, Third edition (1989), Blackwell Scientific Publications,

Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989

S.L. Beaucage y M.H. Caruthers, Tetrahedron Letters 22, 1981, pp. 1859-1869

5

Matthes et al., The EMBO J. 3, 1984, pp. 801-805 .

R.K. Saiki et al., Science 239, 1988, pp. 487-491 .

10

Morinaga et al., (1984, Biotechnology 2:646-639)

Nelson and Long, Analytical Biochemistry 180, 1989, pp. 147-151

15

Hunkapiller et al., 1984, Nature 310:105-111

R. Higuchi, B. Krummel, and R.K. Saiki (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. Nucl. Acids Res. 16:7351-7367 .

20

Dubnau et al., 1971, J. Mol. Biol. 56, pp. 209-221 .

Gryczan et al., 1978, J. Bacteriol. 134, pp. 318-329 . S.D. Erlich, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. 74, pp. 1680-1682 .

Boel et al., 1990, Biochemistry 29, pp. 6244-6249 .

25

#### LISTADO DE SECUENCIAS

30

[0220] En las siguientes SEC ID Nos. 1, 3, 5 y 5', se ilustran la secuencia de codificación y la secuencia 3' de los genes de  $\alpha$ -amilasa relevantes. La secuencia 5' es la primera parte separada de la secuencia escrita con letras minúsculas, la secuencia de codificación es la parte intermedia de la secuencia, donde la secuencia señal está escrita con letras minúsculas y la secuencia que codifica la  $\alpha$ -amilasa madura está escrita con letras mayúsculas, y la secuencia de 3' es la tercera parte separada de la secuencia escrita con letras minúsculas.

35

SEC ID N.º 1

cggaagattggaagtacaaaaataagcaaaagattgtcaatcatgtcatgagccatgcgg-  
 gagacggaaaaatcgtctta atgcacgatatttatgcaacgttcgcagatgctgctgaa-  
 gagattattaaaaagctgaaagcaaaaggctatcaattggt aactgtatctcagcttga-  
 agaagtgaagaagcagagaggctattgaataaatgagtagaagcgcocatatcgggcgttttc  
 ttttggaaagaaaatatagggaaaatggtacttggttaaaaattcgggaatattatacaacatc-  
 atatgtttcacattgaaa ggggaggagaatc  
 atgaaacaacaaaaacggctttacgcccgatgctgacgctgttattttgcgctcatcttctt-  
 gctgc ctcattctgcagcagcggcgGCAAATCTTAATGGGACGCTGATGCAGTATTTT-  
 GAATGGTACATGCCCAATGACGGCCAA CATTGGAGGCGTTTGCAAAACGACTCGGCATAT-  
 TTGGCTGAACACGGTATTACTGCCGTCTGGATTCCCCCGGCATATAA GGGAACGAGC-  
 CAAGCGGATGTGGGCTACGGTGCTTACGACCTTTATGATTTAGGGGAGTTTCATCAAAAAG-  
 GGACGGTTC GGACAAAGTACGGCACAAAAGGAGAGCTGCAATCTGCGATCAAAAAGTCTTC-  
 ATTCCCGCGACATTAACGTTTACGGGGAT GTGGTCATCAACCACAAAGGCGGGCGCTGA-  
 TCGACCCGAAGATGTAACCGCGGTTGAAGTCGATCCCGCTGACCCGCAACCG CGTAATTT-  
 CAGGAGAACACCTAATTAAGCCTGGACACATTTTCATTTTCCGGGGCGCGGCAGCACATA-  
 CAGCGATTTTA AATGGCATTGGTACCATTTTGACGGAACCGATTGGGACGAGTCCCGAAA-  
 GCTGAACCGCATCTATAAGTTTCAAGGAAAG GCTTGGGATTGGGAAGTTTCCAATGAA-  
 AACGGCAACTATGATTATTGATGTATGCCGACATCGATTATGACCATCCTGA TGTCGCAG-  
 CAGAAATTAAGAGATGGGGCACTTGGTATGCCAATGAACTGCAATTGGACGGTTTCCGTCTT-  
 GATGCTGTCA AACACATTAATTTTCTTTTTTTCGGGGATTGGGTTAATCATGTCCAGGGA-  
 AAAACGGGGGAAGGAAATGTTTACGGTAGCT GAATATTGGCAGAAT-  
 GACTTGGGCGCGCTGGAAAACCTATTTGAACAAAACAAATTTTAATCATTCAGTGTTTGACGTGCC  
 GCTTCATTATCAGTTCCATGCTGCATCGACACAGGGAGGCGGCTATGATATGAG-  
 GAAATTGCTGAACGGTACGGTTCGTTT CCAAGCATCCGTTGAAATCGGTTACATTTGTTCG-  
 ATAACCATGATACACAGCCGGGGCAATCGCTTGAGTCGACTGTCCAA ACATGGTTTAAG-  
 CCGCTTGCTTACGCTTTTATTCTCACAAGGGAATCTGGATACCCTCAGGTTTTCTACGGG-  
 GATATGTA CGGGACGAAAGGAGACTCCAGCGCGAAATTCCTGCCTTGAAACACAAAAT-  
 TGAACCGATCTTAAAAGCGAGAAAACAGT ATGCGTACGGAGCACAGCATGATTATTTTCGAC-  
 CACCATGACATTGTCCGGCTGGACAAGGGAAGGCGACAGCTCGGTTGCA AATTCAGGTTTGG-  
 CGGCATTAATAACAGACGGACCCGGTGGGGCAAAGCGAATGTATGTCCGGCCGGCA-  
 AAACGCCGGTGA GACATGGCATGACATTACCGGAAACCGTTCCGAGCCGGTTGTCATCA-  
 ATTCGGAAGGCTGGGGAGAGTTTACGTAACG GCGGGTCGGTTTCAATTTATGTTCAA-  
 GATAG  
 aagagcagagaggacgatttctgaaggaatccggtttttttttt  
 SEC ID No. 2



ANLNGTLMQYFEWYMPNDGQHWRRRLQND SAYLAEHGITAV  
WIPPAYKGT SQADVGYGAYDLYDLGEFHQKGTVRTKYGTK  
GELQSAIKSLHSRDINVYGDVVINHKGGADATEDVTAVEV  
DPADRNRVISGEHLIKAWTHFHFPGRGSTYSDFKWHWYHF  
DGTDWDESRKLNRIYKFQKAWDWEVSNENGN DY LMYAD  
IDYDHPDVA AEIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSF  
LRDWVNHVREKTGKEMFTVAEYWQNDLGALENYLNKTNFN  
HSVFDVPLHYQFHAAS TQGGYDMRKL LN GTVVSKHPLKS  
VTFVDNHDTQPGQSLESTVQTFKPLAYAFILTRESGYPQ  
V FYGDMYGT KGDSQREIPALKHKIEPILKARKQYAYGAQH  
DYFDHHDIVGWTREGDSSVANSGLAALITDGPGGAKRMYV  
GRQNAGETWHDITGNRSEPVVINSEGWGEFHVNGGSVSIY  
VQR

SEC ID N.º 3

gccccgcacatacgaagactgggtgaaaacattgagcctttgatgactgatgatttgg-  
ctgaagaagtggatcgattg tttgagaaaagaagaagaccataaaaataccttgtctgt-  
catcagacagggatattttttatgctgtccagactgtccgct gtgtaaaaataaggaata-  
aaggggggttgttattattttactgatatgtaaaatataatttgtataagaaaatgagaggg  
agaggaaac  
atgattcaaaaacgaaagcggacagtttctgctcagacttgtgcttatgtgcacgctggt-  
atattgtcagttt gccgattcaaaaacatcagccGTAATGGCACGCTGATGCAGTATT-  
TTGAATGGTATACGCCGAACGACGGCCAGCATT GGAAACGATTGCAGAATGATGCGGAA-  
CATTTATCGGATATCGGAATCACTGCCGTCTGGATTCTCCCGCATACAAAGGA TTGAG-  
CCAATCCGATAACGGATACGGACCTTATGATTTGTATGATTTAGGAGAATTCAGCAAAA-  
AGGGACGGTCAGAAC GAAATACGGCACAAAATCAGAGCTTCAAGATGCGATCGGCTCAC-  
TGCATTCCCGGAACGTCCAAGTATACGGAGATGTGG TTTTGAATCATAAGGCTGGTGCT-  
GATGCAACAGAAGATGTAACCTGCCGTCAAGTCAATCCGGCCAATAGAAATCAGGAA ACTTCG-  
GAGGAATATCAAATCAAAGCGTGGACGGATTTTCGTTTTCCGGGCGGTGAAACACGTACAG-  
TGATTTTAAATG GCATTGGTATCATTTCCGACGGAGCGGACTGGGATGAATCCC-  
GGAAGATCAGCCGCATCTTTAAGTTTCGTGGGGAAGGAA AAGCGTGGGATTGGGAAGTAT-  
CAAGTAAAACGGCAACTATGACTATTTAATGTATGCTGATGTGACTACGACCACCT  
GATGTCGTGGCAGAGACAAAAAAATGGGGTATCTGGTATGCGAATGAACTGTCATTAGACGG-  
CTTCOGTATIGATGCCGC CAAACATATTAATTTTCATTTCTGCGTGATTGGGTTTCAGG-  
CGGTCAGACAGGGCAGCGGGAAAAGAAATGTTTACGGTTG CGGAGTATTGGCAG-  
AATAATGCCGGGAAACTCGAAAACACTTTGAATAAAACAAGCTTTAATCAATCCGTGTTT-  
GATGTT CCGCTTCATTTCAATTTACAGGCGGCTTCCTCACAGGAGGCGGATATGATAT-  
GAGGCGTTTCTGGACGGTACCGTTGT GTCCAGGCATCCGGAAAAGGCGGTTACATTTGT-  
TGAAAATCATGACACACAGCCGGGACAGTCATTGGAATCGACAGTCC AAAGTTGGTTTAA-  
ACCGCTTGCATACGCCTTTATTTTGACAAGAGAATCCGGTTATCCTCAGGTGTTCTATGGG-  
GATATG TACGGGACAAAAGGACATCGCCAAAGGAAATCCCTCACTGAAAGATAATATA-  
GAGCCGATTTTAAAAGCGCGTAAGGA GTACGCATACGGGCCCCAGCACGATTATATGAC-  
CACCCGGATGTGATCGGATGGACGAGGGAAGGTGACAGCTCCGCCC CCAA-  
ATCAGGTTTGGCCGCTTTAATCACGGACGGACCCCGCGGATCAAAGCGGATGTATGCCGG-  
CCTGAAAAATGCCGGC GAGACATGGTATGACATAACGGGCAACCGTTCAGATACTGTAA-  
AAATCGGATCTGACGGCTGGGGAGAGTTTCATGTAAA CGATGGGTCCGTCTCCATTTAT-  
GTTCAGAAATAA  
ggtaataaaaaaacacctccaagctgagtgcggtatcagcttga ggtgogtttattt-  
ttcagccgtatgacaaggtcggcatcaggtgtgacaaatacggatgctggctgtcata-  
ggtgaca aatccgggttttgcgcccgtttggctttttcacatgtctgattttgtataat-  
caacaggcacggagccggaatctttcgc cttggaaaaataagcggcgatcgtagctgct-  
tecaatatggattgttcatcgggatcgtgcttttaatacacaacgtggg atcc

VNGTLMQYFEWYTPNDGQHWKRLQNDAEHLSDIGITAVWI  
PPAYKGLSQSDNGYGPYDLYDLGEFQQKGTVRTKYGTKSE  
LQDAIGSLHSRNVQVYGDVVLNHNKAGADATEDVTAVEVNP  
ANRNQETSEEYQIKAWTDFRFPGRGNTYSDFKWHWYHFDG  
ADWDESRKISRIFKFRGEGKAWDWEVSENGNYDYLMYAD  
VDYDHPDVVAETKKWGIWYANELSLDGFRIDAANKHIFSF  
LRDWVQAVRQATGKEMFTVAEYWQNNAGKLENYLNKTSFN  
QSVFDVPLHFNLQAASSQGGYDMRRLLDGTVVSRHPEKA  
VTFVENHDTQPGQSLESTVQTFWKPLAYAFILTRESGYPQ  
VfyGDMYGTKGTSFKEIPSLKDNIEPILKARKEYAYGPQH  
DYIDHPDVIGWTREGDSSAAKSGLAALI TDGPGGSKRMYA  
GLKNAGETWYDITGNRSDTVKIGSDGWGEFHVNDGSVSIY

SEC ID N.º 5

aaattcgatattgaaaacgattacaaataaaaattataatagacgtaaacgttcgaggg-  
 ttgctccctttttactcttt            ttatgcaatcgtttcccttaattttttggaagccaaacc-  
 gtcgaatgtaacatttgattaagggggaagggcatt  
 gtgct                            aacgtttcaccgcacatcattcgaaaaggatggatggtcctgctcgcggt-  
 tttgctcactgtctcgtggtctctgcccacag            gacagcccgcgaaggctGCCGCACCGT-  
 TTAACGGCACCATGATGCAGTATTTTGAATGGTACTTGCCGGATGATGGCAGC            TTATGG-  
 ACCAAAGTGGCCAATGAAGCCAACAACCTTATCCAGCCTTGGCATCACCCTCTTTGGCTG-  
 CCGCCCGCTTACAA            AGGAACAAGCCGCAGCGACGTAGGGTACGGAGTATACGACTTGTA-  
 TGACCTCGGCGAATCAATCAAAAAGGGACCGTCC            GCACAAAATACGGAACAAAAGCTC-  
 AATATCTTCAAGCCATTCAAGCCGCCACGCCGCTGGAATGCAAGTGTACGCCGAT            GTC-  
 GTGTTTCGACCATAAAGGCGGCGCTGACGGCACGGAATGGGTGGACGCCGTCGAAGTCAATCCG-  
 TCCGACCGCAACCA            AGAAATCTCGGGCACCTATCAAATCCAAGCATGGACGAAATTTGA-  
 TTTTCCCGGGCGGGGCAACACCTACTCCAGCTTTA            AGTGGCGCTGGTACCATTTTG-  
 ACGGCGTTGATTGGGACGAAAGCCGAAAATTGAGCCGCATTTACAAATTCGCGGGCATC  
 GGCAAAGCGTGGGATTGGGAAGTAGACACGGAAAACGGAAACTATGACTACTTAATGTAT-  
 GCCGACCTTGATAIGGATCA            TCCCGAAGTCGTGACCGAGCTGAAAACCTGGGGGAAATG-  
 GTAIGTCAACACAACGAACATTGATGGGTTCGGCTTGATG            CCGTCAAGCATATTAAGT-  
 TCAGTTTTTTTCCCTGATTGGTTGTCGTAIGTTCGCTTCTCAGACTGGCAAGCCGCTATTTACC  
 GTCGGGGAATATTGGAGCTATGACATCAACAAGTTGCACAATTACATTACGAAAACAGAC-  
 GGAACGATGTCTTTGTTTGA            TGCCCCGTTACACAACAATTTTATACCGCTTCCAAATCAGG-  
 GGGCGCATTGATATGCGCACGTTAATGACCAATACTC            TCATGAAAGATCAAC-  
 CGACATTGGCCGTCACCTTCGTTGATAATCATGACACCGAACC CGGCCAAGCGCTGCAGTCATGG  
 GTCGACCCATGGTTCAAACCGTTGGCTTACGCCTTTATTCTAACTCGG-  
 CAGGAAGGATACCCGTGCGTCTTTTATGGTGA            CTATTATGGCATTCCACAATATAACAT-  
 TCCTTCGCTGAAAAGCAAAATCGATCCGCTCCTCATCGCGCGCAGGGATTATG            CTTACG-  
 GAACGCAACATGATTATCTTGATCACTCCGACATCATCGGGTGGACAAGGGAAGGGGGCA-  
 CTGAAAACCAGGA            TCCGGACTGGCCGCACTGATCACCGATGGGCCGGGAGGAAGCAAA-  
 TGGATGTACGTTGGCAAACAACACGCTGGAAAAGT            GTTCTATGACCTTACCGGCAACCGGAG-  
 TGACACCGTCAACATCAACAGTATGGATGGGGGGAATTCAAAGTCAATGGCG            GTT-  
 CGGTTTCGGTTGGGTTCC TAGAAAACGACCGTTTCTACCATCGCTCGGCCGATCACAA-  
 CCGACCGTGGACTGGT GAATTCGTCCGTTGGACCGAACCACGGTTGGTGGCATGGCCTTGA  
 tgctcgga

AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITA  
 LWLPPAYKGTSRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGT  
 KAQYLQAIQAAHAAGMQVYADVVFDPKGGADGTEWVDAVE  
 VNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSFKWRWYH  
 FDGVDWDESRKLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNVDYLM  
 YADLDMDHPEVVTELNWGWKYVNTTNIDGFRDVAVKHIK  
 FSFFPDWLSYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKT  
 DGTMSLFDAPLHNKPHYTASKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQP  
 TLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKPLAYAFILTRQEG  
 YPCVFGDYDGIPQYNIPSLKSKIDPLLIARRDYAYGTQH  
 DYLDHSDIIGWTREGGTEKPGSGLAALITDGGGSKWMYV  
 GKQHAGKVFYDLTGNRSDVTINSDGWGEFKVNGGSVSVW  
 VPRKTTVSTIARPIITRPWTGEFVRWTEPRLVAW

SEC ID N.º 10

1 ATPADWRSQS IYFLLTDRFA RTDGSTTATC  
 31 NTADQKYCGG TWQGIIDKLD YIQGMGFTAI  
 61 WITPVTAQLP QTTAYGDAYH GYWQQDIYSL  
 91 NENYGTADDL KALSSALHER GMYLMVDVVA  
 121 NHMGYDGAGS SVDYSVFKPF SSQDYFHFPC  
 151 FIQNYEDQTQ VEDCWLGDNT VSLPDLDTTK  
 181 DVVKNEWYDW VGSLVSNYSI DGLRIDTVKH  
 211 VQKDFWPGYN KAAGVYCIGE VLDGDPAYTC  
 241 PYQNVMDGVL NYPIIYPLLN AFKSTSGSMD  
 271 DLYNMINTVK SDCPDSTLLG TFVENHDNPR  
 301 FASYTNDIAL AKNVAAFIIIL NDGIPIIYAG  
 331 QEQHYAGGND PANREATWLS GYPTDSELYK  
 361 LIASANAIRN YAISKDTGFV TYKNWPIYKD  
 391 DITIAMRKGT DGSQIVTILS NKGASGDSYT  
 421 LSLSGAGYTA GQQLTEVIGC TTVTGVSDGN  
 451 VPVPMAGGLP RVLYPTEKLA GSKICSSS

**REIVINDICACIONES**

1. Variante de la  $\alpha$ -amilasa progenitora tipo Termamyl, que tiene la secuencia SEC ID N.º: 2 donde dicha variante consta de la SEC ID N.º: 2 con una de las siguientes mutaciones seleccionadas de:
- 5 i)H156Y+A181T+A209V;
- ii)H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S;
- 10 iii)A1\*+N2\*+L3V+M15T+R23K+S29A+A30E+Y31H+A33S+E34D+H35I+ H156Y+A181T+A209V;
- iv)A1\*+N2\*+L3V+M15T+R23K+S29A+A30E+Y31H+A33S+E34D+H35I+ H156Y+A181T+N190F+A209V;
- 15 v)A1\*+N2\*+L3V+M15T+R23K+S29A+A30E+Y31H+A33S+E34D+H35I+ H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S,
- donde un asterisco (\*) indica delección del aminoácido.
2. Constructo de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una variante de  $\alpha$ -amilasa según la reivindicación 1.
- 20 3. Vector de expresión recombinante que lleva un constructo de ADN según la reivindicación 2.
4. Célula que se transforma con un constructo de ADN según la reivindicación 2 o un vector según la reivindicación 3.
- 25 5. Célula según la reivindicación 4, que es un microorganismo.
6. Célula según la reivindicación 4, que es una bacteria o un hongo.
7. Célula según la reivindicación 6, que es una bacteria gram positiva tal como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus* o *Bacillus thuringiensis*.
- 30 8. Uso de una variante de  $\alpha$ -amilasa según la reivindicación 1 para lavar y/o lavar platos.
- 35 9. Uso de una variante de  $\alpha$ -amilasa según la reivindicación 1 para descolado textil.
10. Uso de una variante de  $\alpha$ -amilasa según la reivindicación 1 para licuefacción de almidón.
- 40 11. Aditivo detergente que comprende una variante de  $\alpha$ -amilasa según la reivindicación 1, opcionalmente en forma de granulado no pulverulento, líquido estabilizado o enzima protegida.
12. Aditivo detergente según la reivindicación 11 que contiene desde 0,02 hasta 200 mg de proteína enzimática/g de aditivo.
- 45 13. Aditivo detergente según la reivindicación 11 o 12, que adicionalmente comprende otra enzima tal como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, otra enzima amilolítica y/o una celulasa.
14. Composición detergente que comprende una variante de  $\alpha$ -amilasa según la reivindicación 1.
- 50 15. Composición detergente según la reivindicación 14 que comprende adicionalmente otra enzima tal como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, otra enzima amilolítica y/o una celulasa.
16. Composición detergente para el lavado de platos manual o automático que comprende una variante de  $\alpha$ -amilasa según la reivindicación 1.
- 55 17. Composición detergente para el lavado de platos según la reivindicación 16 que comprende adicionalmente otra enzima tal como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, otra enzima amilolítica y/o una celulasa.
18. Composición para el lavado de ropa a mano o automático que comprende una variante de  $\alpha$ -amilasa según la reivindicación 1.
- 60 19. Composición detergente para el lavado de ropa según la reivindicación 18, que comprende adicionalmente otra enzima tal como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, otra enzima amilolítica y/o una celulasa.

20. Método para generar una variante según la reivindicación 1, variante que presenta una mayor estabilidad a pH bajo en relación con la progenitora, comprendiendo el método el someter una secuencia de ADN que codifica la  $\alpha$ -amilasa progenitora tipo Termamyl a mutagénesis dirigida al sitio.

1  
 CAT CAT AAT GGA ACA AAT GGT ACT ATG ATG CAA TAT TTC GAA TGG TAT TTG CCA AAT GAC  
 H H N G T N G T M M Q Y F E W Y L P N D

21  
 GGG AAT CAT TGG AAC AGG TTG AGG GAT GAC GCA GCT AAC TTA AAG AGT AAA GGG ATA ACA  
 G N H W N R L R D D A A N L K S K G I T

41  
 GCT GTA TGG ATC CCA CCT GCA TGG AAG GGG ACT TCC CAG AAT GAT GTA GGT TAT GGA GCC  
 A V W I P P A W K G T S Q N D V G Y G A

61  
 TAT GAT TTA TAT GAT CTT GGA GAG TTT AAC CAG AAG GGG ACG GTT CGT ACA AAA TAT GGA  
 Y D L Y D L G E F N Q K G T V R T K Y G

81  
 ACA CGC AAC CAG CTA CAG GCT GCG GTG ACC TCT TTA AAA AAT AAC GGC ATT CAG GTA TAT  
 T R N Q L Q A A V T S L K N N G I O V Y

101  
 GGT GAT GTC GTC ATG AAT CAT AAA GGT GGA GCA GAT GGT ACG GAA ATT GTA AAT GCG GTA  
 G D V V M N H K G G A D G T E I V N A V

121  
 GAA GTG AAT CGG AGC AAC CGA AAC CAG GAA ACC TCA GGA GAG TAT GCA ATA GAA CCG TGG  
 E V N R S N R N Q E T S G E Y A I E A W

141  
 ACA AAG TTT GAT TTT CCT GGA AGA GGA AAT AAC CAT TCC AGC TTT AAG TGG CGC TGG TAT  
 T K F D F P G R G N N H S S F K W R W Y

161  
 CAT TTT GAT GGG ACA GAT TGG GAT CAG TCA CGC CAG CTT CAA AAC AAA ATA TAT AAA TTC  
 H F D G T D W D Q S R Q L Q N K I Y X F

181  
 AGG GGA ACA GGC AAG GCC TGG GAC TGG GAA GTC GAT ACA GAG AAT GGC AAC TAT GAC TAT  
 R G T G K A W D W E V D T E N G N Y D Y

201  
 CTT ATG TAT GCA GAC GTG GAT ATG GAT CAC CCA GAA GTA ATA CAT GAA CTT AGA AAC TGG  
 L M Y A D V D M D H P E V I H E L R N W

221  
 GGA GTG TGG TAT ACG AAT ACA CTG AAC CTT GAT GGA TTT AGA ATA GAT GCA GTG AAA CAT  
 G V W Y T N T L N L D G F R I D A V X H

241  
 ATA AAA TAT AGC TTT ACG AGA GAT TGG CTT ACA CAT GTG CGT AAC ACC ACA GGT AAA CCA  
 I K Y S F T R D W L T H V R N T T G X P

261  
 ATG TTT GCA GTG GCT GAG TTT TGG AAA AAT GAC CTT GGT GCA ATT GAA AAC TAT TTG AAT  
 M F A V A E F W X N D L G A I E N Y L N

281  
 AAA ACA AGT TGG AAT CAC TCG GTG TTT GAT GTT CCT CTC CAC TAT AAT TTG TAC AAT GCA  
 K T S W N H S V F D V P L H Y N L Y N A

**Fig. 1**



301

TCT AAT AGC GGT GGT TAT TAT GAT ATG AGA AAT ATT TTA AAT GGT TCT GTG GTG CAA AAA  
S N S G G Y Y D M R N I L N G S V V Q K

321

CAT CCA ACA CAT GCC GTT ACT TTT GTT GAT AAC CAT GAT TCT CAG CCC GGG GAA GCA TTG  
H P T H A V T F V D N H D S Q P G E A L

341

GAA TCC TTT GTT CAA CAA TGG TTT AAA CCA CTT GCA TAT GCA TTG GTT CTG ACA AGG GAA  
E S F V Q Q W F K P L A Y A L V L T R E

361

CAA GGT TAT CCT TCC GTA TTT TAT GGG GAT TAC TAC GGT ATC CCA ACC CAT GGT GTT CCG  
Q G Y P S V F Y G D Y Y G I P T H G V P

381

GCT ATG AAA TCT AAA ATA GAC CCT CTT CTG CAG GCA CGT CAA ACT TTT GCC TAT GGT ACG  
A M K S K I D P L L Q A R Q T F A Y G T

401

CAG CAT GAT TAC TTT GAT CAT CAT GAT ATT ATC GGT TGG ACA AGA GAG GGA AAT AGC TCC  
Q H D Y F D H H D I I G W T R E G N S S

421

CAT CCA AAT TCA GGC CTT GCC ACC ATT ATG TCA GAT GGT CCA GGT GGT AAC AAA TGG ATC  
H P N S G L A T I M S D G P G G N K W M

441

TAT GTG GGG AAA AAT AAA GCG GGA CAA GTT TGG AGA GAT ATT ACC GGA AAT AGG ACA GGC  
Y V G K N K A G Q V W R D I T G N R T G

261

ACC GTC ACA ATT AAT GCA GAC GGA TGG GGT AAT TTC TCT GTT AAT GGA GGG TCC GTT TCG  
T V T I N A D G W G N F S V N G G S V S

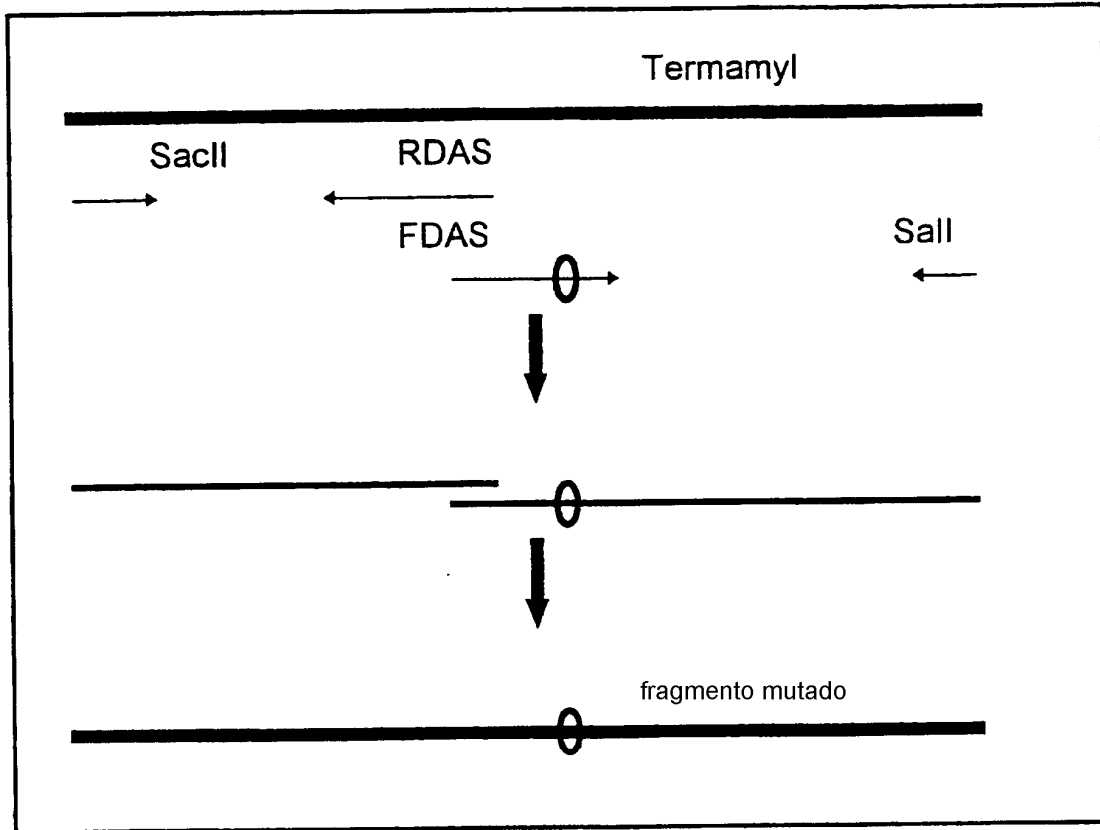
481

GTT TGG GTG AAG CAA TAA  
V W V K Q \*

**Fig. 1 (cont.)**

	10	20	30	40	50	60	
1	HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLRDDAANLKS KGITAVWI PPAWKGTSQNDVGYGA						60
3	-AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPAYKGT SRSDVGYGV						59
2	HHNGTNGTMMQYFEWHL PNDGNHWNRLRDDASNLRNGITAIWI PPAWKGTSQNDVGYGA						60
4	HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLNSDASNLSKSGITAVWI PPAWKGASQNDVGYGA						60
	70	80	90	100	110	120	
1	YDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTRNQLQAAVTS LKNNGIQVYGDVVMNHKGGADGTEIVNAV						120
3	YDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTRKAQYLQAIQA AHAAGM QVYADVFDHKGGADGTEWVDAV						119
2	YDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTRSQLES A IHALKNNGVQVYGDVVMNHKGGADATENVLAV						120
4	YDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTRSQLQAAVTS LKNNGIQVYGDVVMNHKGGADATEMVRVAV						120
	130	140	150	160	170	180	
1	EVNRSNRNQETSGEYAI EAWTKFDFPGRGNHSSFKWRWYHFDGTDWDQSRQLQNKIYKF						180
3	EVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSFKWRWYHFDGVDWDESRLKS - RIYKF						178
2	EVNPNNRNQEISGTYTIEAWTKFDFPGRGNTYSDFKWRWYHFDGVDWDQSRQFQNR IYKF						180
4	EVNPNNRNQEVTEGTYTIEAWTRFDFPGRGNT HSSFKWRWYHFDGVDWDQSRRLNRIYKF						180
	190	200	210	220	230	240	
1	RGTGKAWDWEVDTENGNYDYL MYADVMDHPEVIHEL RNWGWYVYVNTNLNLDGFRIDAVKH						240
3	RGIGKAWDWEVDTENGNYDYL MYADLMDHPEVVT ELKNWGK WYVNTNIDGFRIDAVKH						238
2	RGDGKAWDWEVDS ENGN YDYL MYADVMDHPEV VNELRRWGEWYVNTNLNLDGFRIDAVKH						240
4	RGHGKAWDWEVDTENGNYDYL MYADIDMDHPEV VNELRNWGWYVYVNTLGLDGFRI DAVKH						240
	250	260	270	280	290	300	
1	IKYSFTRDWLTHVRNTTGKPMFAVAEFWKNDLGA IENYLNKTSWNHSAFVDFLHYNLNA						300
3	IKFSFFPDWLSYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTDGTM SLFDAPLHNK FYTA						298
2	IKYSFTRDWLTHVRNATGKEMFAVAEFWKNDLGA IENYLNKTNWNH SVDFVPLHYNLNA						300
4	IKYSFTRDWINHVR SATGKNMFAVAEFWKNDLGA IENYLQKTNWNH SVDFVPLHYNLNA						300
	310	320	330	340	350	360	
1	SNSGGYDMRNILNGSVVQKHP THAVTFVDNHDSQPGEALESFVQWFKPLAYALV LTRI						360
3	SKSGGAFDMRTLMTN TLMKDQPTLAVTFVDNH DTEPGQALQS WVDPWFKPLAYAFILTRQ						358
2	SNSGGNYDMAKLLNGT VVQKHPH AVTFVDNHDSQPGE SLESFVQEWFKPLAYALIL TRE						360
4	SKSGGN YDMRNIFNGT VVQRHP SHAVTFVDNHDSQP EEALESFVEWFKPLAYALITRE						360
	370	380	390	400	410	420	
1	QGYPVSVFYGDYYGIP THGVPAMKSKIDP LLQARQTFAYGTQHDYFDH HDIIGW TREGNSS						420
3	EGYPCVSVFYGDYYGIPQYNI PSLKSKIDP LLTARRDYAYGTQHDYLDHSDIIGW TREGGTE						418
2	QGYPVSVFYGDYYGIP THSVPAMKAKIDP ILEARQNFAYGTQHDYFDH HNIIGW TREGNTT						420
4	QGYPVSVFYGDYYGIP THGVPAMRSKIDP ILEARQKYAYGKQNDYLDH HNIIGW TREGNTA						420
	430	440	450	460	470	480	
1	HPNSGLATIMSDGPGGNK WMYVGNKAGQVWRDITGNRTGTVTINADGWGNF SVNGGSVS						480
3	KPGSGLAALITDGP GSKWMYVGNKAGQVWHDITGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVS						478
2	HPNSGLATIMSDGPGG EKWMYVGNKAGQVWHDITGNKPGTVTINADGWANF SVNGGSVS						480
4	HPNSGLATIMSDGAGGSKW MFGVGRN KAGQVWSDITGNRTGTVTINADGWGNF SVNGGSVS						480
	490	500	510	520	530	540	
1	VWVKQ						485
3	VWVPRKTTVSTIARPI TTRPWTGEFVRWTEPRLVAV						514
2	IWVKR						485
4	IWVNK						485

Fig. 2



**Fig. 3**