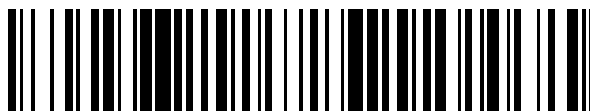


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 436 066**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386 (2006.01)

C12N 9/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.1998 E 10182050 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 2302027**

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

30 Prioridad:

13.10.1997 DK 117297

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.12.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SVENDSEN, ALLAN;
BORCHERT, TORBEN, VEDEL y
BISGÅRD-FRANTSEN, HENRIK**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 436 066 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 (mutantes) de α -amilasas progenitoras de tipo Termamyl, sobre todo variantes que presentan termoestabilidad aumentada a pH ácido y/o a bajas concentraciones de Ca^{2+} (con respecto a la progenitora) que son ventajosas respecto a las aplicaciones de las variantes en el tratamiento de almidón industrial particularmente (p. ej. licuefacción o sacarificación del almidón).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Las α -amilasas (α -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.

[0003] Hay un cuerpo muy extenso de patentes y de bibliografía científica acerca de esta clase de enzimas muy importante industrialmente. Varias α -amilasas tales como variantes de α -amilasas tipo Termamyl son conocidas a partir de p. ej. WO 90/11352, WO 95/10603, WO 95/26397, WO 96/23873 y WO 96/23874.

[0004] Entre las descripciones más recientes referentes a las α -amilasas, WO 96/23874 proporciona datos estructurales tridimensionales de cristales de rayos X para una α -amilasa tipo Termamyl que consiste en los 300 residuos N-terminales de aminoácidos de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* y los aminoácidos 301-483 del extremo C-terminal de la α -amilasa de *B. licheniformis* que comprende la secuencia de aminoácidos (estando disponible comercialmente bajo el nombre comercial Termamyl™), y que está así cercanamente relacionada con las α -amilasas de *Bacillus* industrialmente importantes (que en el contexto presente están incluidas dentro del significado del término " α -amilasas tipo Termamyl", y que incluyen, entre otras cosas, las α -amilasas de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. stearrowthermophilus*). WO 96/23874 también describe la metodología para diseñar, basándose en un análisis de la estructura de una α -amilasa progenitora tipo Termamyl, variantes de la α -amilasa progenitora tipo Termamyl que presentan propiedades alteradas con respecto a la progenitora.

[0005] El documento WO 95/35382 (Gist Brocades B.V.) se refiere a enzimas amilolíticas derivadas de *B. licheniformis* con propiedades mejoradas que permiten la reducción de la concentración de Ca^{2+} bajo la aplicación sin una pérdida de rendimiento de la enzima. La enzima amilolítica comprende uno o más cambios de aminoácidos en las posiciones seleccionadas del grupo de 104, 128, 187, 188 de la secuencia de α -amilasa de *B. licheniformis*.

[0006] El documento WO 96/23873 (Novo Nordisk) expone variantes de α -amilasa tipo Termamyl que tienen termoestabilidad aumentada obtenida por la delección de pares en la región R181*, G182*, T183* y G184* de la secuencia mostrada en SEC ID N.º: 1 de la misma.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LA INVENCION

[0007] La presente invención se refiere a nuevas variantes α -amilolíticas (mutantes) de una α -amilasa tipo Termamyl, en particular variantes que exhiben termoestabilidad aumentada (en relación al progenitor) que son ventajosas en relación al procesamiento industrial de almidón (licuefacción de almidón, sacarificación y similares).

[0008] Más específicamente, la presente invención proporciona una variante de una α -amilasa progenitora de tipo Termamyl tal y como se define por la reivindicación 1.

[0009] La presente invención sigue al hallazgo sorprendente de los inventores de que en caso de combinar dos mutaciones (se describirá a continuación), la termoestabilidad de las α -amilasas de tipo Termamyl se aumenta a pH ácido y/o a bajas concentraciones de Ca^{2+} en comparación con mutaciones únicas, como la mutación descrita en WO 96/23873 (Novo Nordisk), es decir delección de pares en la región R181*, G182*, T183* y G184* de la secuencia mostrada en SEC ID n.º: 1 de la presente.

[0010] La invención se refiere adicionalmente a constructos de ADN que codifican variantes de la invención, a la composición que comprende variantes de la invención, a métodos para preparar variantes de la invención, y al uso de las variantes y composiciones de la invención, solas o en combinación con otras enzimas α -amilolíticas, en varios procesos industriales, p. ej., licuefacción de almidón.

BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO

[0011]

Figura 1 es un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de seis α -amilasas progenitoras de tipo Termamyl en el contexto de la invención. Los números en el extremo izquierdo designan las secuencias de aminoácidos respectivas de la siguiente manera:

1: SEC ID n.º: 2,

2: Kaoamyl,

3: SEC ID n.º: 1,

4: SEC ID n.º: 5,

5: SEC ID n.º: 4,

6: SEC ID n.º: 3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓNLa α -amilasa tipo Termamyl

[0012] Es bien sabido que varias α -amilasas producidas por *Bacillus* spp. son altamente homólogas a nivel aminoácido. Por ejemplo, la α -amilasa de *B. licheniformis* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 4 (comercialmente disponible como Termamyl™) se ha descubierto que es aproximadamente un 89% homóloga a la α -amilasa de *B. amiloliquefaciens* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 5 y aproximadamente un 79% homóloga a la α -amilasa de *B. stearothermophilus* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N.º: 3. α -amilasas homólogas adicionales incluyen una α -amilasa derivada de una cepa de *Bacillus* sp. NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 o DSM 9375, todas las cuales se describen en detalle en WO 95/26397, y la α -amilasa descrita por Tsukamoto et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 151 (1988), pp. 25-31.

[0013] Otras α -amilasas homólogas adicionales incluyen la α -amilasa producida por la cepa de *B. licheniformis* descrita en el documento EP 0252666 (ATCC 27811), y las α -amilasas identificadas en los documentos WO 91/00353 y WO 94/18314. Otras α -amilasas de tipo Termamyl de *B. licheniformis* comerciales son Optitherm™ y Takatherm™ (disponibles de Solvay), Maxamyl™ (disponible de Gist-Brocades/Genencor), Spezym AA™ y Spezyme AA™ de Delta (disponible de Genencor), y Keistase™ (disponible de Daiwa).

[0014] Debido a la homología sustancial encontrada entre estas α -amilasas, se considera que pertenecen a la misma clase de α -amilasas, específicamente la clase de " α -amilasas tipo Termamyl".

[0015] Por consiguiente, en el presente contexto, el término " α -amilasa tipo Termamyl" se destina a indicar una α -amilasa que, a nivel de aminoácidos, muestra una homología sustancial con Termamyl™, es decir la α -amilasa de *B. licheniformis* con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n.º: 4 de la presente. Más específicamente, una α -amilasa tipo Termamyl es una α -amilasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 8 de la presente, y la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n.º: 1 del documento WO 95/26397 (la misma que la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID n.º: 7 aquí) o en SEC ID n.º: 2 del documento WO 95/26397 (la misma que la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID n.º: 8 aquí) o en el Tsukamoto et al., 1988, (que la secuencia de aminoácidos está mostrada en la SEC ID N.º: 6 aquí) o que muestra al menos un 80%, especialmente al menos un 85%, especialmente preferido al menos un 90%, más preferido incluso especialmente al menos un 95% de homología con al menos una de dichas secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID n.º 1 o 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 o 8.

[0016] Opcionalmente, la α -amilasa tipo Termamyl puede adicionalmente i) mostrar reactividad inmunológica cruzada con un anticuerpo dirigido contra al menos una de dichas α -amilasas, y/o ii) ser codificado por una secuencia de ADN que se hibridiza con las secuencias de ADN que codifican las α -amilasas especificadas anteriormente que son evidentes de SEC ID n.º: 9, 10, 11, o 12 de la presente solicitud (las cuales secuencias de codificación codifican las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEC ID n.º: 1, 2, 3,4 y 5 de la presente, respectivamente), de SEC ID n.º: 4 del documento WO 95/26397 (la

ES 2 436 066 T3

cual secuencia de ADN, junto con el codón de terminación TAA, se muestra en SEC ID n.º: 13 de la presente y codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n.º: 8 de la presente) y de SEC ID n.º: 5 del documento WO 95/26397 (mostrada en SEC ID n.º: 14 de la presente), respectivamente.

5 [0017] La "homología" se puede determinar usando cualquier algoritmo convencional, preferiblemente usando el programa GAP del paquete GCG versión 7.3 (Junio 1993) usando valores por defecto para penalizaciones GAP, que es una penalización por creación de GAP de 3.0 y penalización por extensión de GAP de 0.1, (Genetic Computer Group (1991) Programme Manual for the GCG Package, version 7, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE. UU. 53711).

10 [0018] Un alineamiento estructural entre Termamyl y una α -amilasa tipo Termamyl se puede utilizar para identificar posiciones equivalentes/correspondientes en otras α -amilasas tipo Termamyl. Un método de obtención de dicho alineamiento estructural es utilizar programa Pile Up de los paquetes GCG utilizando los valores por defecto de penalizaciones GAP, es decir, una penalización por creación de GAP de 3.0 y penalización por extensión de GAP de 0.1. Otros métodos de alineamiento estructural incluyen el análisis de agrupamientos hidrofóbicos (Gaboriaud et al., (1987),
15 letras FEBS 224, págs. 149-155) y enhebrado inverso (Huber, T; Torda, AE, PROTEIN SCIENCE Vol. 7, n.º 1 págs. 142-149 (1998).

[0019] Propiedad i) de la α -amilasa, es decir la reactividad cruzada inmunológica, se puede evaluar utilizando un anticuerpo dirigido contra, o reactivo con, al menos un epítipo de la α -amilasa tipo Termamyl pertinente. El anticuerpo, que puede ser
20 bien monoclonal o policlonal, se puede producir por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe por Hudson et al., Practical Immunology, Third edition (1989), Blackwell Scientific Publications. La reactividad cruzada inmunológica se puede determinar utilizando ensayos conocidos en la técnica, ejemplos de los cuales son el análisis Western Blotting o el ensayo de inmunodifusión radial, por ejemplo como se describe en Hudson et al., 1989. En este aspecto, se ha encontrado reactividad cruzada inmunológica entre las α -amilasas que tienen las secuencias de aminoácidos
25 SEC ID n.º: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 respectivamente.

[0020] La sonda de oligonucleótidos usada en la caracterización de la α -amilasa tipo Termamyl conforme a propiedad ii) anteriormente mencionada se puede preparar adecuadamente basándose en la secuencia total o parcial de nucleótidos o aminoácidos de la α -amilasa en cuestión.

30 [0021] Condiciones adecuadas para estudiar la hibridación implican el empapado previo en 5xSSC y la prehibridación durante 1 hora a $\sim 40^{\circ}\text{C}$ en una solución de formamida al 20%, solución del Denhardt 5x, fosfato sódico 50mM, pH 6,8, y 50mg de ADN de timo de ternero ultrasonificado desnaturalizado, seguido de hibridación en la misma solución suplementado con ATP 100mM durante 18 horas a $\sim 40^{\circ}\text{C}$, seguido un lavado en tres veces del filtro en 2xSSC, SDS al 0,2% a 40°C
35 durante 30 minutos (baja astringencia), preferido a 50°C (astringencia media), más preferiblemente a 65°C (astringencia alta), incluso más preferiblemente a $\sim 75^{\circ}\text{C}$ (astringencia altísima). Más detalles acerca del método de hibridación se pueden encontrar en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989.

[0022] En el presente contexto, "derivado de" está destinado no sólo a indicar una α -amilasa producida o producible por una cepa del organismo en cuestión, sino también una α -amilasa codificada por una secuencia de ADN aislada de tal cepa y producida en un organismo huésped transformado con dicha secuencia de ADN. Finalmente, el término se destina a indicar una α -amilasa que se codifica una secuencia de ADN de origen sintético y/o de ADNc y que tiene las características de identificación de la α -amilasa en cuestión. El término está también destinado a indicar que la α -amilasa progenitora puede ser una variante de una α -amilasa de origen natural, es decir una variante que es el resultado de una modificación
45 (inserción, sustitución, eliminación) de uno o más residuos de aminoácidos de la α -amilasa de origen natural.

α -amilasas híbridas progenitoras

[0023] La α -amilasa progenitora puede ser una α -amilasa híbrida, es decir una α -amilasa que comprende una combinación de secuencias de aminoácidos parciales derivada de al menos dos α -amilasas.

[0024] La α -amilasa híbrida progenitora puede ser una que, basándose en la homología de aminoácidos y/o reactividad cruzada inmunológica y/o hibridación de ADN (como se define anteriormente), se puede determinar que pertenece a la familia de α -amilasas tipo Termamyl. En este caso, la α -amilasa híbrida está normalmente compuesta de al menos una parte de una α -amilasa tipo Termamyl y parte(s) de unas o varias otras α -amilasas seleccionadas de α -amilasas de tipo Termamyl o α -amilasas de tipo no Termamyl de origen microbiano (fúngico o bacteriano) y/o mamífero.

[0025] Así, la α -amilasa híbrida progenitora puede comprender una combinación de secuencias parciales de aminoácidos que derivan de al menos dos α -amilasas tipo Termamyl, o de al menos una tipo Termamyl y al menos una α -amilasa

bacteriana tipo no Termamyl, o de al menos una tipo Termamyl y al menos una α -amilasa fúngica. La α -amilasa tipo Termamyl de la que deriva una secuencia parcial de aminoácidos puede, por ejemplo, ser cualquiera de aquellas α -amilasas tipo Termamyl específicas a las que se hace referencia en este caso.

5 [0026] Por ejemplo, la α -amilasa progenitora puede comprender una parte C-terminal de una α -amilasa derivada de una cepa de *B. licheniformis*, y una parte N-terminal de una α -amilasa derivada de una cepa de *B. amyloliquefaciens* o de una cepa de *B. stearothermophilus*. Por ejemplo, la α -amilasa progenitora puede comprender al menos 430 residuos de aminoácidos de la parte C-terminal de la α -amilasa de *B. licheniformis*, y puede, por ejemplo comprender a) un segmento de aminoácidos comprendiendo los 37 residuos de aminoácidos N- terminales de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* que
10 tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n.º: 5 y un segmento de aminoácidos correspondiente a los 445 residuos de aminoácidos C-terminales de la α -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID n.º 4, o b) un segmento de aminoácidos correspondiente a los 68 residuos de aminoácidos N-terminales de la α -amilasa de *B. stearother-mophilus* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n.º: 3 y un segmento de aminoácidos correspondiente a los 415 residuos de aminoácidos C-terminales de la α -amilasa de *B. licheniformis* que tiene
15 la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n.º: 4.

[0027] La α -amilasa tipo no Termamyl puede, por ejemplo, ser una α -amilasa fúngica, una α -amilasa de mamífero o vegetal o una α -amilasa bacteriana (diferente de una α -amilasa tipo Termamyl). Entre los ejemplos específicos de tales α -amilasas se incluyen la TAKA α -amilasa de *Aspergillus oryzae*, la α -amilasa ácida de *A. niger*, la α -amilasa de *Bacillus subtilis*, la α -amilasa pancreática porcina y una α -amilasa de cebada. Todas estas α -amilasas tienen estructuras dilucidadas que son marcadamente diferentes de la estructura de una α -amilasa tipo Termamyl típica como se ha hecho referencia en este caso.
20

[0028] Las α -amilasas fúngicas mencionadas arriba, es decir derivadas de *A. niger* y *A. oryzae*, son altamente homólogas a nivel de aminoácidos y se considera generalmente que pertenecen a la misma familia de α -amilasas. La α -amilasa fúngica derivada de *Aspergillus oryzae* está comercialmente disponible bajo el nombre comercial de Fungamyl™.
25

[0029] Además, cuando una variante particular de una α -amilasa tipo Termamyl (variante de la invención) se refiere a - de manera convencional - por referencia a la modificación (p. ej. eliminación o sustitución) de residuos de aminoácidos específicos en la secuencia de aminoácidos de una α -amilasa específica de tipo Termamyl, debe entenderse que variantes de otra α -amilasa tipo Termamyl modificada en la(s) posición(es) equivalente(s) (como se determina a partir del mejor alineamiento posible de la secuencia de aminoácidos entre las respectivas secuencias de aminoácidos) están incluidas de este modo.
30

[0030] Una forma de realización preferida de una variante de la invención es una derivada de una α -amilasa de *B. licheniformis* (como progenitor α -amilasa tipo Termamyl), por ejemplo una de aquellas a las que se hace referencia anteriormente, tal como la α -amilasa de *B. licheniformis* con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n.º: 4.
35

Construcción de variantes de la invención

[0031] La construcción de la variante de interés se puede realizar por 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 ser recuperada posteriormente del caldo de cultivo resultante. Esto se describe con detalle a continuación.
40

Propiedades alteradas de variantes de la invención

[0032] A continuación se discute la relación entre mutaciones que pueden estar presentes en variantes de la invención, y alteraciones deseables en las propiedades (con respecto a aquellas de una α -amilasa progenitora de tipo Termamyl) que pueden resultar de las mismas.
45

Termoestabilidad aumentada a pH ácido y/o a bajas concentraciones de Ca^{2+}

[0033] Entre las mutaciones de relevancia particular en relación con la obtención de variantes según la invención teniendo termoestabilidad aumentada a pH ácido y/o a bajas concentraciones de Ca^{2+} incluyen mutaciones en la posición N190 (con respecto a la α -amilasa de *B. licheniformis*, SEC ID n.º: 4).
50

[0034] En el contexto de la invención, el término "pH ácido" significa un pH por debajo de 7,0, especialmente por debajo del rango de pH en el que se realizan normalmente los procesos de licuefacción de almidón industrial, que está entre pH 5,5 y 6,2.
55

[0035] En el contexto de la presente invención, el término "concentraciones bajas de Calcio" significa menos de 40ppm ya que esta es una concentración que está por debajo del nivel normal usado en la licuefacción de almidón industrial. Las concentraciones normales varían dependiendo de la concentración del Ca²⁺ libre en el maíz. Normalmente se añade una dosis correspondiente a 1mM (40ppm) que, junto con el nivel en el maíz, da entre 40 y 60ppm de Ca²⁺ libre.

[0036] En el contexto de la invención el término "temperaturas elevadas" significa temperaturas entre 95°C y 160°C, especialmente el rango de temperatura en el que se realizan normalmente los procesos de licuefacción del almidón industrial, que es entre 95°C y 105°C.

[0037] Los inventores han descubierto ahora que la termoestabilidad a pH ácido y/o a bajas concentraciones de Ca²⁺ se puede aumentar incluso más combinando la mutación anteriormente mencionada y/o I201 entre sí.

[0038] Dicha mutación "anteriormente mencionada" es la siguiente (con respecto a la α -amilasa de *B. licheniformis*, SEC ID n.º: 4):

N190.

[0039] Conforme a la presente invención, dicha mutación en N190 es posteriormente combinada con deleciones en dos posiciones como se describe en el documento WO 96/23873 (es decir, en las posiciones R181 y G182 en SEC ID n.º: 1 aquí). Por lo tanto, según la invención las variantes de una α -amilasa tipo Termamyl progenitora con actividad de α -amilasa que comprende mutaciones R181* y G182* y una sustitución seleccionada de N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V son contempladas.

[0040] Debe ser enfatizado que no sólo las α -amilasas tipo Termamyl mencionadas específicamente abajo están contempladas. También otras α -amilasas tipo Termamyl comerciales son contempladas. Una lista no exhaustiva de tales α -amilasas es la siguiente:

α -amilasas producidas por la cepa *B. licheniformis* descrita en el documento EP 0252666 (ATCC 27811), y las α -amilasas identificadas en los documentos WO 91/00353 y WO 94/18314. Otras α -amilasas tipo Termamyl comerciales de *B. licheniformis* son Optitherm™ y Takatherm™ (disponibles de Solvay), Maxamyl™ (disponible de Gistbrocades/Genencor), Spezim AA™ Spezime Delta AA™ (disponible de Genencor), y Keistase™ (disponible de Daiwa).

[0041] Se puede mencionar aquí que los residuos de aminoácidos, respectivamente, en posiciones correspondientes a N190, I201, D207 y E211, respectivamente, en la SEC ID NO: 4 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 han sido ya mencionadas (véase arriba) son las siguientes:

Tabla 1.

α -amilasa tipo Termamyl	N	I	D	E	Q
<i>B. licheniformis</i> (SEC ID N.º: 4)	N190	I201	D207	E211	Q264
<i>B. amyloliquefaciens</i> (SEC ID N.º: 5)	N190	V201	D207	E211	Q264
<i>B. stearothermophilus</i> (SEC ID N.º: 3)	N193	L204	E210	E214	--
<i>Bacillus</i> WO 95/26397 (SEC ID N.º: 2)	N195	V206	E212	E216	--
<i>Bacillus</i> WO 95/26397 (SEC ID N.º: 1)	N195	V206	E212	E216	--
" <i>Bacillus</i> sp. #707" (SEC ID N.º: 6)	N195	I206	E212	E216	--

[0042] La mutación del residuo de aminoácido conservado en N190 es muy importante en relación con la termoestabilidad mejorada a pH ácido y/o a concentraciones bajas de calcio, y las siguientes mutaciones son de interés particular a este respecto (con referencia a la numeración de la secuencia de aminoácidos de *B. licheniformis* mostrada en SEC ID n.º: 4). Deleciones de pares de aminoácidos en posiciones correspondientes a R179-G182 en SEC ID n.º: 3 correspondientes a un espacio en SEC ID n.º: 4. cuando se alinea con 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 han sido ya mencionadas (véase arriba) son de las siguientes:

ES 2 436 066 T3

Tabla 2.

α -amilasa tipo Termamyl	Deleciones de aminoácidos emparejados entre			
<i>B. amiloliquefaciens</i> (SEC ID n.º5)	R176,	G177,	E178,	G179
<i>B. stearothermophilus</i> (SEC ID n.º3)	R179,	G180,	I181,	G182
<i>Bacillus</i> WO 95/26397 (SEC ID n.º2)	R181,	G182,	T183,	G184
<i>Bacillus</i> WO 95/26397 (SEC ID n.º1)	R181,	G182,	D183,	G184
" <i>Bacillus</i> sp. #707" (SEC ID n.º6)	R181,	G182,	H183,	G184

5 [0043] Cuando se usa SEC ID n.º: 1 a SEC ID n.º: 6 como esqueleto (es decir, como α -amilasa tipo Termamyl progenitora) se pueden realizar dos mutaciones según la invención en las regiones/posiciones siguientes para aumentar la termoestabilidad a pH ácido y/o a bajas concentraciones de Ca^{2+} (con respecto a la progenitora):

(con respecto a la SEC ID n.º: 1 aquí):

10 1: ana eliminación de pareja de R181*, G182*; y
2: N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V

(con respecto a SEC ID n.º: 2 aquí):

15 1: una eliminación de pareja de R181*,G182*; y
2: N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

20 3. (con respecto a SEC ID n.º: 3 aquí):

1: una eliminación de pareja de R179*,G180 y
2: N193A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

25 3. (con respecto a SEC ID n.º: 5 aquí):

1: una eliminación de pareja de R176*,G177*; y
2: N190A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

30 3. (con respecto a SEC ID n.º: 6 aquí):

1: una eliminación de pareja de R181*,G182*; y
2: N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V.

[0044] Mutaciones dobles específicas para el esqueleto SEC ID n.º: 1 a SEC ID n.º: 6 están catalogadas a continuación.

40 [0045] Usando la SEC ID NO: 1 como esqueleto, las siguientes mutaciones dobles resultando en el efecto deseado están contempladas según la invención:

-R181*/G182*/N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V.

45 [0046] Usando la SEC ID NO: 2 como esqueleto, las siguientes mutaciones dobles resultando en el efecto deseado están contempladas según la invención:

-R181*/G182*/N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V.

50 [0047] Usando la SEC ID n.º. 3 como esqueleto, las siguientes mutaciones dobles resultando en el efecto deseado están contempladas según la invención:

-R179*/G180*/N193A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V.

5 [0048] Usando la SEC ID NO: 5 como esqueleto, las siguientes mutaciones dobles resultando en el efecto deseado están contempladas según la invención:

-R176*/G177*/N190A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V.

10 [0049] Usando la SEC ID NO: 6 como esqueleto, las mutaciones siguientes dobles resultando en el efecto deseado están contempladas según la invención:

-R181*/G182*/N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V.

15 [0050] Todas las α -amilasa tipo Termamyl definidas anteriormente pueden ser utilizadas adecuadamente como esqueleto para preparar variantes de la invención.

Mutaciones generales en variantes de la invención

20 [0051] Se puede preferir que una variante de la invención comprenda una o más modificaciones además de aquellas perfiladas anteriormente. Así, puede ser ventajoso que uno o más residuos de prolina presentes en la parte de la variante de α -amilasa que es modificada sea/sean sustituidos con un residuo diferente de prolina que puede ser cualquiera de los residuos posibles de origen natural diferentes de prolina, y que son preferiblemente una alanina, glicina, serina, treonina, valina o leucina.

25 [0052] Análogamente, se puede preferir que uno o más residuos de cisteína presentes entre los residuos de aminoácidos con los cuales la α -amilasa progenitora es modificada sea/sean sustituidos con un residuo diferente de cisteína tal como serina, alanina, treonina, glicina, valina o leucina.

30 [0053] Además, una variante de la invención puede - bien como única modificación o en combinación con cualquiera de las anteriores modificaciones perfiladas - 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 SEC ID n.º: 4 se sustituye por un Asn y/o Gln, respectivamente. La sustitución, en la α -amilasa tipo Termamyl, de uno o más de los residuos de Lys presentes en un fragmento de aminoácido correspondiente al fragmento de aminoácido 185-209 de SEC ID n.º: 4 por un Arg también resulta de interés.

35 [0054] Se entenderá que la presente invención abarca variantes que incorporan dos o más de las modificaciones perfiladas anteriormente.

40 [0055] Además, puede ser ventajoso introducir mutaciones puntuales en cualquiera de las variantes descritas aquí.

Métodos para preparar variantes de α -amilasa

45 [0056] Diferentes métodos para introducir mutaciones en genes se conocen en la técnica. Después de una breve discusión de la clonación de secuencias de ADN que codifican α -amilasa, se discutirán métodos para generar mutaciones en sitios específicos en la secuencia codificante de α -amilasa.

Clonación de una secuencia de ADN que codifica una α -amilasa

50 [0057] La secuencia de ADN que codifica una α -amilasa progenitora puede ser aislada de cualquier célula o microorganismo que produce la α -amilasa en cuestión, usando varios métodos bien conocidos en la técnica. Primero, una librería de ADN genómico y/o de ADNc debería ser construida usando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la α -amilasa que debe ser estudiada. Luego, si la secuencia de aminoácidos de la α -amilasa es conocida, homólogos, sondas de oligonucleótidos marcadas se pueden sintetizar y usar para identificar clones de codificación de α -amilasa de una genoteca obtenida a partir del organismo en cuestión. Alternativamente, una sonda de oligonucleótidos marcada que contiene secuencias homólogas a un gen conocido de α -amilasa podrían ser usadas como sonda para identificar clones que codifican α -amilasa, utilizando hibridación y condiciones de lavado de menor astringencia.

55 [0058] Otro método para identificar clones que codifican α -amilasa implicaría la inserción de fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformación de bacterias α -amilasa negativas con la biblioteca de ADN genómico resultante, y luego disponer en placas las bacterias transformadas sobre agar con un sustrato para α -amilasa, de

ese modo permitiendo que los clones que expresan la α -amilasa sean identificados.

[0059] Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la enzima puede ser preparada sintéticamente por métodos estándares establecidos, p. ej. el método de fosforamidita descrito por S.L. Beaucage and M.H. Caruthers (1981) o el método descrito por Matthes et al. (1984). En el método de fosforamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, p. ej. en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se anillan, se ligan y se clonan en vectores apropiados.

[0060] Finalmente, la secuencia de ADN puede ser de origen mixto genómico y sintético, de origen mixto sintético y de ADNc o de origen mixto genómico y de ADNc, preparada para ligar fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según sea apropiado, los fragmentos correspondientes a varias partes de la secuencia de ADN entera), conforme a las técnicas estándares. La secuencia de ADN también se puede preparar por reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en el documento US 4,683,202 o R.K. Saiki et al. (1988).

Mutagénesis dirigida al sitio

[0061] Una vez que se ha aislado una secuencia de ADN que codifica a-amilasa, y se han identificado los sitios deseables para la mutación, las mutaciones se pueden introducir usando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados; los nucleótidos mutantes se insertan durante la síntesis de oligonucleótidos. En un método específico, un espacio monocatenario de ADN, que enlaza la secuencia de codificación de a-amilasa, está creado en un vector que lleva el gen de a-amilasa. Luego el nucleótido sintético, que lleva la mutación deseada, se anilla a una parte homóloga del ADN monocatenario. El espacio restante se rellena luego con ADN polimerasa I (fragmento de Klenow) y el constructo se liga usando T4 ligasa. Un ejemplo específico de este método se describe en Morinaga et al. (1984). El documento US 4,760,025 expone la introducción de oligonucleótidos que codifican mutaciones múltiples mediante la realización de alteraciones menores del casete. No obstante, una variedad incluso superior de mutaciones puede ser introducida en cualquier momento por el método de Morinaga, porque una multitud de oligonucleótidos, de varias longitudes, pueden ser introducidas.

[0062] Otro método para introducir mutaciones en secuencias de ADN que codifican a-amilasa se describe en Nelson y Long (1989). Implica la generación en 3 pasos 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 portador de la mutación puede ser aislado por seccionamiento con endonucleasas de restricción y reinsertado en un plásmido de expresión.

Mutagénesis aleatoria

[0063] La mutagénesis aleatoria se realiza de manera adecuada bien como mutagénesis aleatoria localizada o específica en al menos tres partes del gen que traduce para la secuencia de aminoácidos mostrada en cuestión, o dentro del gen entero.

[0064] La mutagénesis aleatoria de una secuencia de ADN que codifica una α -amilasa progenitora se puede realizar convenientemente usando cualquier método conocido en la técnica.

[0065] En relación con lo anterior, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para generar una variante de una α -amilasa progenitora, p. ej. donde la variante muestra termoestabilidad alterada o aumentada con respecto a la progenitora, el método comprendiendo:

(a) someter una secuencia de ADN que codifica la α -amilasa progenitora a mutagénesis aleatoria,

(b) expresar la secuencia de ADN mutada obtenida en el paso (a) en una célula huésped, y hacer un barrido para seleccionar células huésped que expresen una variante de α -amilasa que tenga una propiedad alterada (es decir, termoestabilidad) con relación a la α -amilasa progenitora.

[0066] El paso (a) del método anterior de la invención se realiza preferiblemente utilizando cebadores dopados. Por ejemplo, la mutagénesis aleatoria puede ser realizada usando un agente mutagenizante físico o químico adecuado, usando un oligonucleótido adecuado, o sometiendo la secuencia de ADN a mutagénesis generada por PCR. Además, la mutagénesis aleatoria puede ser realizada usando cualquier combinación de estos agentes mutagenizantes. El agente mutagenizante puede, p. ej., ser uno que induce transiciones, transversiones, inversiones, aleatorización, deleciones, y/o inserciones.

[0067] Entre los ejemplos de un agente físico o químico mutagenizante adecuado para este fin se incluyen radiación ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metilo-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), O-metil hidroxilamina, ácido nitroso, etilmetano sulfonato (EMS), bisulfito de sodio, ácido fórmico, y análogos de nucleótido. Cuando se utilizan tales agentes, la mutagénesis se realiza normalmente incubando la secuencia de ADN que codifica la enzima progenitora para ser

mutagenizada en presencia del agente mutagenizante de elección bajo condiciones adecuadas para que la mutagénesis tenga lugar, y seleccionando el ADN mutado con las propiedades deseadas.

5 [0068] Cuando la mutagénesis se realiza utilizando un oligonucleótido, el oligonucleótido puede ser dopado o adicionado con los tres nucleótidos no progenitoras durante la síntesis del oligonucleótido en las posiciones que deben ser cambiadas. El dopaje o adicionado se puede realizar de modo que los codones para los aminoácidos indeseados sean evitados. El oligonucleótido adicionado o dopado se puede incorporar en el ADN que codifica la enzima de α -amilasa por cualquier técnica publicada, utilizando por ejemplo PCR, LCR o cualquier ADN polimerasa y ligasa como se estime apropiado.

10 [0069] Preferiblemente, el dopaje se realiza usando el "dopaje aleatorio constante", donde el porcentaje de tipo salvaje y la mutación en cada posición está predefinido. Además, el dopaje puede ser dirigido hacia 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 se puede hacer, p. ej., para permitir la introducción del 90% de tipo salvaje y del 10% de mutaciones en cada posición. Una consideración adicional en la elección de un esquema de dopaje se basa en genética así como en
15 restricciones estructurales de las proteínas. El esquema de dopaje se puede realizar usando el programa DOPE que, entre otras cosas, asegura que se evita la introducción de codones de parada.

[0070] Cuando se usa la mutagénesis generada por PCR, tanto un gen tratado químicamente como uno no tratado que codifica una α -amilasa progenitora se somete a PCR bajo condiciones que aumentan la desincorporación de nucleótidos
20 (Deshler 1992; Leung et al., Technique, Vol.1, 1989, pp. 11-15).

[0071] Una cepa mutágena de *E. coli* (Fowler et al., Molec. Gen. Genet., 133, 1974, pp. 179-191), *S. cerevisiae* o cualquier otro organismo microbiano se puede utilizar para la mutagénesis aleatoria del ADN que codifica la α -amilasa por, por ejemplo, transformación de un plásmido que contiene el progenitor de glicosilasa en la cepa mutágena, creciendo la cepa mutágena con el plásmido y aislando el plásmido mutado de la cepa mutágena. El plásmido mutado puede ser
25 posteriormente transformado en el organismo de expresión.

[0072] La secuencia de ADN que debe ser mutagenizada puede estar convenientemente presente en una biblioteca genómica o de ADNc obtenida a partir de un organismo que expresa la α -amilasa progenitora. 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 expuesto de otra manera al agente mutagenizante. El ADN que debe ser mutagenizado también puede estar presente en una célula huésped tanto siendo integrado en el genoma de dicha célula como estando presente en un vector albergado en la célula. Finalmente, el ADN que debe ser mutagenizado puede estar en forma aislada. Se entenderá que la secuencia de ADN que debe ser sometida a mutagénesis aleatoria es preferiblemente una secuencia ADNc o de ADN genómico.
35

[0073] En algunos casos puede ser conveniente amplificar la secuencia de ADN mutada antes de realizar el paso de expresión b) o el paso de selección c). Tal amplificación se puede realizar conforme a métodos conocidos en la técnica, siendo el método actualmente preferido la amplificación generada por PCR utilizando cebadores de oligonucleótidos preparados en base al ADN o secuencia de aminoácidos de la enzima progenitora.
40

[0074] Después de la incubación con o exposición al agente mutagenizante, el ADN mutado se expresa por cultivo de una célula huésped adecuada que lleva la secuencia de ADN bajo condiciones que permiten 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 lleve la secuencia de ADN que codifica la enzima progenitora durante el tratamiento de mutagénesis. Ejemplos de células huésped adecuadas son las siguientes: bacterias gram positivas tal 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* o *Streptomyces murinus*; y bacterias gram-negativas tales como *E. Coli*.
45

[0075] La secuencia de ADN mutada puede además comprender una secuencia de ADN que codifica funciones que permiten la expresión de la secuencia de ADN mutada.
50

Mutagénesis aleatoria localizada

[0076] La mutagénesis aleatoria puede estar ventajosamente localizada en una parte de la α -amilasa progenitora en cuestión. Esto puede, por ejemplo, ser ventajoso cuando se ha identificado que ciertas regiones de la enzima son de importancia particular para una propiedad dada de la enzima, y cuando se modifican se espera que resulten en una variante con propiedades mejoradas. Tales regiones se pueden identificar normalmente cuando la estructura terciaria de la enzima progenitora ha sido dilucidada y relacionada con la función de la enzima.
60

[0077] La mutagénesis aleatoria, localizada o específica de una región, se realiza convenientemente usando técnicas de mutagénesis generada por PCR como se ha descrito anteriormente o cualquier otra técnica adecuada conocida en la técnica. Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la parte de la secuencia de ADN a ser modificada puede ser aislada, por ejemplo, por inserción en un vector adecuado, y dicha parte puede ser posteriormente sometida a mutagénesis usando cualquiera de los métodos de mutagénesis mencionados anteriormente.

Métodos alternativos de suministro de variantes de α -amilasa

[0078] Entre los métodos alternativos para suministrar variantes de la invención se incluyen métodos de transposición de genes conocidos en la técnica incluyendo los métodos por ejemplo descritos en los documentos WO 95/22625 (de Affymax Technologies N.V.) y WO 96/00343 (de Novo Nordisk A/S).

Expresión de variantes de α -amilasa

[0079] Según la invención, una secuencia de ADN que codifica la variante producida por métodos anteriormente descritos, o por cualquier método alternativo conocido en la técnica, puede ser expresada, en forma enzimática, usando un vector de expresión que normalmente incluye las secuencias de control que codifican un promotor, operador, sitio de unión al ribosoma, señal de iniciación de la traducción, y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores.

[0080] El vector de expresión recombinante que lleva la secuencia de ADN que codifica una variante de α -amilasa de la invención puede ser cualquier vector que pueda ser sometido convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que debe ser introducido. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej. un plásmido, un bacteriófago o un elemento extracromosómico, minicromosoma o un cromosoma artificial. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el(los) cromosoma(s) en el(los) que ha sido integrado.

[0081] En el vector, la secuencia de ADN debería estar operativamente conectada a una secuencia del promotor adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede ser derivada de genes que codifican proteínas bien homólogas o heterólogas a la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN que codifica una variante de α -amilasa de la invención, especialmente en un huésped bacteriano, son el promotor del operón *lac* de *E. coli*, los promotores del gen *dagA* de agarasa de *Streptomyces coelicolor*, los promotores del gen de α -amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, los promotores del gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, los promotores de la α -amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, los promotores de los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis* etc. Para la transcripción en un huésped fúngico, ejemplos de promotores útiles son estos derivados del gen que codifica la TAKA amilasa de *A. oryzae*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la α -amilasa neutra de *A. niger*, la α -amilasa estable en ácido de *A. niger*, la glucoamilasa de *A. niger*, la lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteasa alcalina de *A. oryzae*, la triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae* o la acetamidasa de *A. nidulans*.

[0082] El vector de expresión de la invención puede también comprender un terminador de transcripción adecuado y, en eucariotas, las secuencias de poliadenilación conectadas operativamente a la secuencia de ADN que codifica la variante de α -amilasa de la invención. Las secuencias de terminación y poliadenilación pueden adecuadamente derivar de las mismas fuentes que el promotor.

[0083] El vector puede además comprender una secuencia de ADN que permita que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de tales secuencias son los orígenes de replicación de plásmidos pUC19; pACYC177; pUB110; pE194, pAMB1 y pIJ702.

[0084] El vector puede también comprender un marcador seleccionable, p. ej., un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped, tal como los genes *dal* de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, o uno que confiere resistencia antibiótica tal como resistencia a la ampicilina, la canamicina, el cloranfenicol o la tetraciclina. Además, el vector puede incluir marcadores *Aspergillus* de selección tales como *amdS*, *argB*, *niaD* y *sC*, un marcador que da lugar a resistencia a higromicina, o la selección se puede realizar por co-transformación, por ejemplo como se describe en el documento WO 91/17243.

[0085] Mientras que la expresión intracelular puede ser ventajosa en algunos aspectos, por ejemplo cuando se usan bacterias determinadas como células huésped, es generalmente preferido que la expresión sea extracelular. En general, las α -amilasas de *Bacillus* mencionadas aquí comprenden una prerregión que permite la secreción de la proteasa expresada en

el medio de cultivo. Si se desea, esta prerregión puede ser sustituida por una prerregión diferente o secuencia señal, convenientemente realizada por sustitución de las secuencias de ADN que codifican las prerregiones respectivas.

5 [0086] Los procedimientos usados para enlazar el constructo de ADN de la invención que codifica una variante de α -amilasa, el promotor, terminador y otros elementos, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados conteniendo la información necesaria para la replicación, son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989).

10 [0087] La célula de la invención, comprendiendo bien un constructo de ADN o bien un vector de expresión de la invención tal como se ha definido anteriormente, se ha utilizado ventajosamente como célula huésped en la producción recombinante de una variante de α -amilasa de la invención. La célula se puede transformar con el constructo de ADN de la invención que codifica la variante, convenientemente integrando el constructo de ADN (en una o más copias) en el cromosoma huésped. Esta integración se considera generalmente una ventaja ya que la secuencia de ADN es más propensa a ser mantenida de forma estable en la célula. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped se puede realizar según
15 métodos convencionales, p. ej. por recombinación homóloga o heteróloga. Alternativamente, la célula se puede transformar con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en relación con los diferentes tipos de células huésped.

[0088] La célula de la invención puede ser una célula de un organismo más alto tal como un mamífero o un insecto, pero es preferiblemente una célula microbiana, por ejemplo una célula bacteriana o fúngica (incluyendo levadura).

20 [0089] Ejemplos de bacterias adecuadas son las bacterias gram positivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalo-philus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, o *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas tal como *E.coli*. La transformación de las bacterias puede, por ejemplo, efectuarse por transformación de protoplastos o usando células competentes de una manera conocida per se.

[0090] El organismo de levadura puede ser seleccionado favorablemente de unas especies de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*. El hongo filamentoso puede ventajosamente pertenecer a unas especies de *Aspergillus*, por ejemplo *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*. Las células fúngicas se pueden
30 transformar por un proceso que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguida de la regeneración de la pared celular en cierto modo conocido per se. Un procedimiento adecuado para la transformación de células huésped de *Aspergillus* se describe en el documento EP 238 023.

[0091] En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una variante de α -amilasa de la invención, este método comprende el cultivo de una célula huésped como se ha descrito anteriormente bajo condiciones propicias a la producción de la variante y a la recuperación de la variante de las células y/o medio de cultivo.

[0092] El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de la célula huésped en cuestión y la obtención de la expresión de la variante de α -amilasa de la invención. Medios adecuados
40 están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas (p. ej. como se describe en catálogos de the American Type Culture Collection).

[0093] La variante de α -amilasa segregada de las células huésped pueden convenientemente ser recuperadas del medio de cultivo por procedimientos bien conocidos, incluyendo separación de las células del medio por centrifugado o filtración, y la precipitación de los componentes proteínicos del medio mediante una sal tal como sulfato de amonio, seguido del uso de procedimientos cromatográficos tales como cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de afinidad, o similar.

Aplicaciones industriales

50 [0094] Las variantes de α -amilasa de esta invención poseen propiedades valiosas que permiten una variedad de aplicaciones industriales. En particular, las variantes enzimáticas de la invención son aplicables como componente en el lavado, lavado de la vajilla y composiciones de detergentes de limpieza de superficies rígidas. Numerosas variantes son particularmente útiles en la producción de edulcorantes y etanol a partir de almidón, y/o para el descolado textil. Condiciones para los procesos de conversión de almidón convencional, incluyendo licuefacción de almidón y/o procesos de
55 sacarificación, se describen en, por ejemplo, US 3,912,590 y en publicaciones de patentes EP n.º 252 730 y 63 909.

Producción de edulcorantes de almidón:

[0095] Un proceso "tradicional" para la conversión del almidón en jarabes de fructosa normalmente consiste en tres
60 procesos enzimáticos consecutivos, es decir, 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 mediante una α -amilasa (p. ej. Termamyl™) a valores de pH entre 5,5 y 6,2 y a temperaturas de 95-160°C durante un periodo de aprox. 2 horas. Para asegurar una estabilidad de enzima óptima bajo estas condiciones, se añade calcio 1 mM (40 ppm de iones de calcio libres).

[0096] Después del proceso de licuefacción las dextrinas se convierten en dextrosa por adición de una glucoamilasa (p. ej. AMGT™) y una enzima desramificante, tal como una isoamilasa o una pululanasa (p. ej. Promozyme™). Antes de este paso el pH se reduce a un valor inferior a 4,5, manteniendo la alta temperatura (por encima de 95°C), y la actividad de licuefacción de la α -amilasa se desnaturaliza. La temperatura se reduce a 60°C, y se añade la glucoamilasa y la enzima desramificante. El proceso de sacarificación se lleva a cabo durante 24-72 horas.

[0097] Después del proceso de sacarificación, el pH se aumenta a un valor en el rango de 6-8, preferiblemente pH 7,5, y el calcio se elimina por intercambio iónico. El jarabe de dextrosa se convierte luego en jarabe de fructosa utilizando, por ejemplo, una glucosaisomerasa inmovilizada (tal como Sweetzyme™).

[0098] Al menos 1 mejora enzimática de este proceso podría ser prevista. Reducción de la dependencia de calcio de la α -amilasa de licuefacción. La adición de calcio libre es requerida para asegurar una estabilidad adecuadamente alta de la α -amilasa, pero el calcio libre inhibe fuertemente la actividad de la glucosaisomerasa y necesita ser eliminado, mediante una unidad de operación costosa, hasta una extensión que reduce el nivel de calcio libre por debajo de 3-5 ppm. Se podrían obtener ahorros en el coste si tal operación pudiera ser evitada y el proceso de licuefacción pudiera ser realizado sin adición de iones de calcio libre.

[0099] Para conseguir esto, se requiere una α -amilasa tipo Termamyl menos dependiente de calcio que sea estable y altamente activa a concentraciones bajas de calcio libre (< 40 ppm). Tal α -amilasa tipo Termamyl debería tener un pH óptimo a un pH en el rango de 4,5-6,5, preferiblemente en el rango de 4,5-5,5.

Composiciones detergentes

[0100] Como se ha mencionado anteriormente, variantes de la invención pueden ser incorporadas adecuadamente en composiciones detergentes. La termoestabilidad aumentada a bajas concentraciones de calcio sería muy beneficiosa para el rendimiento de la amilasa en detergentes, es decir, la región alcalina. Se hace referencia, por ejemplo, a los documentos WO 96/23874 y WO 97/07202 para detalles adicionales en lo que se refiere a ingredientes pertinentes de composiciones de detergentes (tales como detergentes para lavar la ropa o la vajilla), métodos apropiados de formulación de las variantes en tales composiciones de detergentes, y a ejemplos de tipos pertinentes de composiciones de detergentes.

[0101] Composiciones de detergentes que comprenden una variante de la invención pueden adicionalmente comprender una o más enzimas adicionales, tales como una lipasa, cutinasa, proteasa, celulasa, peroxidasa o lacasa, y/u otra α -amilasa.

[0102] Las variantes de α -amilasa de la invención pueden ser incorporadas en detergentes a las concentraciones empleadas de forma convencional. Es actualmente contemplado que una variante de la invención se puede incorporar en una cantidad correspondiente a 0,00001-1 mg (calculado como proteína enzimática pura activa) de α -amilasa por litro de solución de detergente para lavar la ropa/la vajilla usando niveles de dosificación convencionales de detergente.

[0103] La invención también se refiere a una composición comprendiendo una mezcla de una o más variantes de la invención derivadas de (como la α -amilasa progenitora tipo Termamyl) la α -amilasa de *B. stearothermophilus* que tiene la secuencia mostrada en SEC ID NO: 3 y una alfa-amilasa tipo Termamyl derivada de la α -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia mostrada en SEC ID NO: 4.

[0104] Además, la invención también se refiere a una composición comprendiendo una mezcla de una o más variantes según la invención derivada de (como la α -amilasa progenitora tipo Termamyl) la α -amilasa de *B. stearothermophilus* que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 3 y una alfa-amilasa híbrida que comprende una parte de la α -amilasa de *B. amyloliquefaciens* mostrada en la SEC ID NO: 5 y una parte de la α -amilasa de *B. licheniformis* mostrada en la SEC ID NO: 4. Esta α -amilasa híbrida tipo Termamyl mencionada comprende los 445 residuos de aminoácidos C-terminales de *B. licheniformis* mostrados en la SEC ID NO: 4 y los 37 residuos de aminoácidos N-terminales de la α -amilasa derivada de *B. amyloliquefaciens* mostrada en la SEC ID NO: 5. Esta última α -amilasa híbrida mencionada puede de manera adecuada comprender las mutaciones siguientes: H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S (utilizando la numeración en SEC ID n.º: 4). En los ejemplos siguientes de dicha α -amilasa tipo Termamyl progenitor híbrido, se usan en combinación con variantes de la invención, estas variantes se pueden utilizar en composiciones de la invención.

ES 2 436 066 T3

[0105] En una forma de realización específica de la invención la composición comprende una mezcla de TVB146 y LE174, por ejemplo, en una proporción de 2:1 a 1:2, tal como 1:1.

[0106] Una variante de α -amilasa de la invención o una composición de la invención puede en un aspecto de la invención ser utilizada para el lavado y/o lavado de la vajilla; para el descolado textil o para la licuefacción de almidón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Enzimas:

[0107] BSG alfa-amilasa: alfa-amilasa de *B. stearothermophilus* representada en la SEC ID NO: 3.

[0108] Variante TVB146 de alfa-amilasa: una variante de alfa-amilasa de *B. stearothermophilus* representada en la SEC ID NO: 3 con las mutaciones siguientes: con la delección en las posiciones I181-G182 + N193F. Variante LE174 de alfa-amilasa híbrida:

LE174 es una alfa-amilasa híbrida tipo Termamyl que es idéntica a la secuencia de Termamyl, es decir, la α -amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en SEC ID n.º: 4, a excepción de que los 35 residuos de aminoácidos N-terminales (de la proteína madura) han sido sustituidos por los 33 residuos N-terminales de BAN (proteína madura), es decir, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la SEC ID NO: 5, que además tiene las siguientes mutaciones:

H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S (utilizando la numeración en SEC ID n.º: 4). LE174 fue construida por SOE- PCR (Higuchi et al. 1988, Nucleic Acids Research 16:7351).

Fermentación y purificación de variantes de α -amilasa

[0109] Una cepa de *B. subtilis* que alberga el plásmido de expresión pertinente se dispone en líneas en una placa de LB-agar con 10 μ g/mL de canamicina a partir de materia prima a -80°C, y crecida durante toda la noche a 37°C. Las colonias se transfieren a 100 mL de medios BPX suplementados con 10 μ g/mL de canamicina en un matraz de agitación de 500 mL.

Composición de medio BPX:

[0110]

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 ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	9 g/l
Pluronic™	0,1 g/l

[0111] El cultivo se agita a 37°C a 270 r.p.m. durante 5 días.

[0112] Las células y el detrito celular se eliminan del caldo de fermentación por centrifugado a 4500 r.p.m. en 20-25 minutos. Después el sobrenadante se filtra para obtener una solución completamente clara. El filtrado se concentra y se lava en un filtro UF (membrana de corte de 10000) y el tampón se cambia a acetato 20mM pH 5,5. El filtrado UF se aplica en una S-sefarosa F.F. y la elución se realiza por elución de fase con NaCl 0,2M en el mismo tampón. El eluato se dializa contra Tris 10mM, pH 9,0 y se aplica en un Q-sepharose F.F. y se eluye con un gradiente lineal de 0-0,3M NaCl sobre 6 volúmenes de columna. Las fracciones que contienen la actividad (medidas por el ensayo Phadebas) se agrupan, el pH se ajustó a pH 7,5 y color restante se eliminó mediante un tratamiento con carbón activo 0.5% p/v en 5 minutos.

Determinación de actividad - (KNU)

[0113] Una unidad Kilo de alfa-amilasa (1 KNU) es la cantidad de enzima que degrada 5,26 g de almidón (Merck, Amylum Solubile, Erg. B 6, lote 9947275) por hora en el método estándar de Novo Nordisk para la determinación de alfa-amilasa

ES 2 436 066 T3

basada en las condiciones siguientes:

Sustrato	almidón soluble
Contenido de calcio en solvente	0,0043 M
Tiempo de reacción	7-20 minutos
Temperatura	37°C
pH	5,6

[0114] Una descripción detallada del método analítico de Novo Nordisk (AF 9) está disponible bajo solicitud.

5

Determinación de actividad de BS-amilasa KNU(S)

1. Campo de aplicación

[0115] Este método se utiliza para determinar la actividad α -amilasa en fermentación y recuperación de muestras y productos formulados y granulados.

2. Principio

[0116] La BS-amilasa degrada el sustrato (4,6-etiliden(G7)-p-nitrofenil(G1)- α ,D-maltoheptaósido (escrito como etiliden-G7-PNP) en, entre otras cosas, G2-PNP y G3-PNP, donde G denota glucosa y PNP, P- nitrofenol.

[0117] G2-PNP y G3-PNP son degradados por la α -glucosidasa, que se añade en exceso, en glucosa y el p-nitrofenol de color amarillo.

20

[0118] La reacción de color se monitoriza in situ y el cambio en la absorbancia frente al tiempo se calcula como una expresión de la velocidad de la reacción y así de la actividad de la enzima. Véanse las pautas de Boehringer Mannheim 1442 309 para detalles adicionales.

25

2.1 Condiciones de reacción

[0119]

Reacción:

Temperatura	: 37°C
pH	: 7,1
Tiempo de preincubación:	2 minutos

Detección:

Longitud de onda	: 405 nm
Tiempo de medición	3 minutos

30

3. Definición de Unidades

[0120] La actividad de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermofius* (BS-amilasa) se determina respecto a un estándar de actividad declarada y establecida en unidades Kilo Novo (*Stearothermophilus*) o KNU(S)).

35

4. Especificidad y sensibilidad

[0121] Límite de determinación: aprox. 0,4 KNU(s)/g

5. Equipo

40

[0122]

Analizador de Cobas Fara

ES 2 436 066 T3

Diluido (p. ej. Hamilton Microlab 1000)

Equilibrio analítico (p. ej. Mettler AE 100)

5

Placas de agitación

6. Reactivos/sustratos

10 [0123] Un equipo ya preparado se utiliza en este análisis para determinar la actividad de α -amilasa. Obsérvese que los reactivos específicos para el sustrato y la α -glucosidasa no se usan como se describe en las pautas de Boehringer Mannheim. No obstante, las designaciones "tampón", "cristal 1", "cristal 1a" y "cristal 2" son aquellas a las que se hace referencia en estas pautas.

15 6.1. Sustrato

[0124] 4,6-etiliden(G₇)-p-nitrofenil(G₁)- α ,D-maltoheptaósido (escrito como etiliden-G₇-PNP) por ejemplo Boehringer Mannheim 1442 309

20 6.2 Reactivo auxiliar de α -glucosidasa

[0125] α -glucosidasa, por ejemplo Boehringer Mannheim 1442 309

25 6.3 Solución BRIJ 35

[0126]

BRIJ 35 (30% p/v de Sigma 430 AG-6)	1000 mL
Agua desmineralizada	hasta 2 000 mL

6.4 Estabilizador

30 [0127]

Solución Brij 35	33 mL
CaCl ₂ *2H ₂ O (Merck 2382)	882 g
Agua desmineralizada	hasta 2 000 mL

7. Muestras y estándares

35 7.1 Curva estándar

Ejemplo: preparación de la curva estándar de BS-amilasa

40 [0128] El estándar pertinente se diluye a 0,60 KNU(s)/mL de la siguiente manera. Una cantidad calculada de estándar se pesa y se añade a un matraz aforado de 200 mL, que se rellena hasta aproximadamente la marca de 2/3 con agua desmineralizada. Se añade estabilizador correspondiente al 1% del volumen del matraz y el matraz se rellena hasta la marca con agua desmineralizada. Se utiliza un Hamilton Microlab 1000 para producir las diluciones mostradas abajo. Se usa agua desmineralizada con 1% de estabilizador como diluyente.

Dilución n.º	Solución de reserva enzimática	1% estabilizador	KNU(s)/mL
1	20µL	580µL	0,02
2	30µL	570µL	0,03
3	40µL	560µL	0,04
4	50µL	550µL	0,05
5	60µL	540µL	0,06

ES 2 436 066 T3

7.2 Control de nivel

5 [0129] Un control del nivel de BS amilasa de Novo Nordisk A/S está incluido en todas las series usando el Cobas Fara. El control se diluye con estabilizador al 1% de modo que la dilución final está en el rango de la curva estándar. Todos los pesos y diluciones están anotados en la lista de trabajo. □

7.3 Soluciones de muestra

10 Determinación única

[0130] Muestras de fermentación (no muestras finales) a partir de la producción, todas las muestras de fermentación de instalaciones experimentales y muestras de estabilidad de almacenamiento se pesan y analizan sólo una vez.
Determinación doble sobre 1 serie:

15

Se pesan muestras de proceso, muestras de fermentación final a partir de la producción, muestras de estudios de GLP y muestras de R&D y se analizan dos veces.

Determinaciones dobles sobre 2 series:

20

Se pesan muestras de producto acabado y se analizan dos veces en dos series separadas.

Concentración máxima de muestras en polvo: 5%

25

[0131] Las muestras de prueba se diluyen con agua desmineralizada con estabilizador al 1% hasta aprox. 0,037 KNU(s)/mL basándose en su actividad prevista. La dilución final se realiza directamente en el recipiente de muestra.

8. Procedimiento

30

8.1 Programa de menú de Cobas

[0132]

35

- el Programa de Menú de Cobas se utiliza para sugerir el peso/diluciones de muestras y el control de nivel que debe ser utilizado.

- las muestras se introducen en el programa con un único código de identificación y se imprime una lista de trabajo.

40

- las muestras y el control se pesan y se diluyen como se establece en la lista de trabajo con los datos del peso escritos a mano que se insertan en el cuaderno de trabajo para el análisis de BS-amilasa

- los resultados se computerizan automáticamente por el Cobas Fara como se describe en el artículo 9 y se imprime junto con la curva estándar.

45

- las listas de trabajos y los resultados impresos se insertan en el cuaderno de trabajo para el análisis de BS-amilasa.

8.2 Instalación de Cobas Fara

50

[0133]

- las muestras se colocan en el portamuestras

55

- los cinco estándares se colocan en el bastidor de calibrado en las posiciones 1 a 5 (el estándar más fuerte en la posición 5), y el control se coloca en el mismo bastidor en la posición 10.

- el sustrato se transfiere a un contenedor reactivo de 30 mL y se coloca en el bastidor de reactivo en la posición 2 (soporte 1).

60

- el reactivo auxiliar de α -glucosidasa se transfiere a un contenedor reactivo de 50 mL y se coloca en el estante reactivo en la posición 2 (soporte C)

8.3 Análisis Cobas Fare

[0134] Los principios principales del análisis son los siguientes:

20µL de muestra y 10µL de agua de lavado se pipetean en la cubeta junto con 250µL de reactivo auxiliar de α-glucosidasa. La cubeta gira durante 10 segundos y los reactivos se expulsan en las cubetas horizontales. 25µL de sustrato y 20µL de agua de lavado se extraen con la pipeta. Después de un 1 segundo de espera para asegurar que la temperatura es de 37°C, la cubeta gira otra vez y el sustrato se mezcla en las cubetas horizontales. La absorbancia se mide por primera vez después 120 segundos y luego cada 5 segundos. La absorbancia se mide un total de 37 veces para cada muestra.

9. Cálculos

[0135] La actividad de las muestras se calcula con respecto al estándar Novo Nordisk A/S.

[0136] La curva estándar se traza por el analizador. La curva debe ser suavemente curvada, aumentando firmemente a una absorbancia de alrededor de 0,25 para el estándar n.º 5.

[0137] La actividad de las muestras en KNU(S)/mL se lee fuera de la curva estándar por el analizador.

[0138] Los cálculos finales para permitir los pesos/diluciones han usado emplean la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad en KNU(S)/g} = S \times V \times F/W$$

S= lectura del resultado del análisis (KNU(S)/mL)
 V= volumen del matraz aforado usado en mL
 F= factor de dilución para la segunda dilución
 W= peso de muestra enzimática en g

9.2 Cálculo de valores medios

[0139] Los resultados se declaran con 3 dígitos significativos. No obstante, para la actividad de la muestra < 10 KNU(S)/g, sólo se dan 2 dígitos significativos.

[0140] Las siguientes reglas se aplican en el cálculo de valores medios:

1. Los datos que se desvían más de 2 desviaciones estándar del valor medio no se incluyen en el cálculo.
2. Determinación única y doble sobre una serie:
 El valor medio se calcula en base a los resultados situados en la área de actividad de la curva estándar.
3. Determinaciones dobles sobre dos series: todos los valores se incluyen en el valor medio. Se omiten los valores atípicos.

10. Exactitud y precisión

[0141] El coeficiente de variación es 2,9% basado en la validación retrospectiva de los resultados del análisis para varios productos finales y el control de nivel.

Ensayo de actividad de α-amilasa

[0142] La actividad de α-amilasa se determina por un método utilizando comprimidos Phadebas® como sustrato. Los comprimidos de Phadebas (ensayo de amilasa de Phadebas®, suministrado por Pharmacia Diagnostic) contienen un polímero de almidón coloreado de azul insoluble entrecruzado que se ha mezclado con albúmina de suero bovino y una sustancia de tampón y se ha dispuesto en comprimidos.

[0143] Para cada medida se suspende un comprimido en un tubo que contiene 5 mL de tampón Britton-Robinson 50 mM (ácido acético 50 mM, ácido fosfórico 50 mM, ácido bórico 50 mM, CaCl₂ 0,1 mM, el pH se ajusta al valor de interés con NaOH). La prueba se realiza en un baño maría a la temperatura de interés. La α-amilasa que debe ser evaluada se diluye en x mL de tampón Britton-Robinson 50 mM. 1 mL de esta solución de α-amilasa se añade a 5 mL del tampón Britton-Robinson 50 mM. El almidón se hidroliza por la α-amilasa dando fragmentos azules solubles. La absorbancia de la solución

ES 2 436 066 T3

azul resultante, medida espectrofotométricamente a 620 nm, está en función de la actividad de α -amilasa.

[0144] Es importante que la absorbancia medida a 620 nm después de 10 o 15 minutos de incubación (tiempo de prueba) esté en el rango de 0,2 a 2,0 unidades de absorbancia a 620 nm. En este rango de absorbancia hay linealidad entre la actividad y la absorbancia (ley de Lambert-Beer). La dilución de la enzima debe por lo tanto ajustarse en base a este criterio. Bajo un conjunto específico de condiciones (temp., pH, tiempo de reacción, condiciones de tampón) 1 mg de una α -amilasa dada hidrolizará una cantidad determinada de sustrato y se producirá un color azul. La intensidad del color se mide a 620 nm. La absorbancia medida es directamente proporcional a la actividad específica (actividad/mg de proteína de α -amilasa pura) de la α -amilasa en cuestión bajo el conjunto de condiciones dado .

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Construcción de variantes de BSG α -amilasa (SEQ ID n.º: 3)

[0145] El gen que codifica BSG, amyS, se localiza en plásmido pPL1117. Este plásmido contiene también el gen que confiere resistencia frente a canamicina y un origen de replicación, ambos obtenidos del plásmido pUB110 (Griczan, T.J. et al (1978) J.Bact 134:318-329).

[0146] La secuencia de ADN de la parte madura de amyS se muestra como SEC ID n.º: 11 y la secuencia de aminoácidos de la proteína madura se muestra como SEC ID n.º: 3

[0147] La variante TVB145 de BSG, que contiene una delección de 6 nucleótidos correspondientes a los aminoácidos I181-G182 en la proteína madura, se construye como sigue:

[0148] La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utiliza para amplificar la parte del gen amyS (del plásmido pPL1117), localizada entre los cebadores de ADN BSG1 (SEC ID N.º: 15) y BSGM2 (SEC ID N.º: 18). BSG1 es idéntico a una parte del gen amyS mientras que BSGM2 contiene la delección de 6 pb de nucleótidos. Se realiza una reacción PCR estándar: 94°C durante 5 minutos, 25 ciclos de (94°C durante 45 segundos, 50°C durante 45 segundos, 72°C durante 90 segundos), 72°C durante 7 minutos usando la polimerasa Pwo bajo condiciones recomendadas por el fabricante, Boehringer Mannheim GmbH.

[0149] La banda amplificada de aproximadamente 550pb resultante se utilizó como megacebador (Barik, S and Galinski, MS (1991): Biotechniques 10: 489-490) junto con el cebador BSG3 en una segunda PCR con pPL1117 como molde dando como resultado un fragmento de ADN de aproximadamente 1080 pb.

[0150] Este fragmento de ADN se digiere con endonucleasas de restricción Acc65I y Sall y el fragmento resultante de aproximadamente 550 pares de bases se liga en plásmido pPL1117 digerido con las mismas enzimas y transformado en la cepa SHA273 de *Bacillus subtilis* delecionada de proteasa y de amilasa (descrita en WO92/11357 y WO95/10603). Los transformantes resistentes a la canamicina y degradantes del almidón se analizaron para la presencia de las mutaciones deseadas (digestión de restricción para verificar la introducción de un sitio HindIII en el gen). La secuencia de ADN entre los sitios de restricción Acc65I y Sall fue verificada por la secuenciación del ADN para asegurar la presencia de sólo las mutaciones deseadas.

[0151] La variante TVB146 de BSG que contiene la misma delección de 6 nucleótidos como TVB145 y una sustitución adicional de asparagina 193 para una fenilalanina, N193F, se construyó de manera similar a TVB145 utilizando el cebador BSGM3 (SEC ID n.º: 19) en la primera PCR.

[0152] La variante TVB161 de BSG, conteniendo la delección de I181-G182, N193F, y L204F, se construye de manera similar a las dos variantes precedentes con la excepción de que el molde para las reacciones de la PCR es el plásmido pTVB146 (pPL1117 conteniendo las mutaciones de TVB146 dentro de amyS y el oligonucleótido mutagénico para la primera PCR sea BSGM3.

[0153] La variante TVB162 de BSG, conteniendo la delección de I181-G182, N193F, y E210H, se construye de manera similar a TVB161 a excepción de que el oligonucleótido mutagénico es BSGM4 (SEC ID N.º: 20).

[0154] La variante TVB163 de BSG, conteniendo la delección de I181-G182, N193F, y E214Q, se construye de manera similar a TVB161 a excepción de que el oligonucleótido mutagénico es BSGM5 (SEC ID N.º: 21).

[0155] Las variantes de BSG construidas anteriormente se fermentaron y purificaron como se ha descrito anteriormente en

la sección "Materiales y Métodos".

Ejemplo 2

5 Medida de la estabilidad dependiente del pH y del calcio

[0156] Normalmente, el proceso de licuefacción industrial se realiza usando pH 6,0-6,2 como pH de licuefacción y una adición de 40 ppm de calcio libre para mejorar la estabilidad a 95°C-105°C. Algunas sustituciones aquí propuestas han sido hechas para mejorar la estabilidad a

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

15 [0157] Se han utilizado dos métodos diferentes para medir las mejoras en la estabilidad obtenida por las diferentes sustituciones en la α -amilasa de *B.stearothermophilus*:

Método 1. Un ensayo que mide la estabilidad a pH reducido, pH 5,0, en presencia de 5 ppm de calcio libre.

20 [0158] Se incubaron 10 μ g de la variante bajo las siguientes condiciones: una solución de acetato 0,1 M, pH ajustado a pH 5,0, que contiene 5ppm de calcio y un 5% p/p de almidón de maíz común (libre de calcio). La incubación se realizó al baño maría a 95°C durante 30 minutos.

Método 2. Un ensayo que mide la estabilidad en ausencia de calcio libre y donde el pH se mantiene a pH 6,0.

25 [0159] Este ensayo mide la reducción en la sensibilidad de calcio: se incubaron 10 μ g de la variante bajo las siguientes condiciones: una solución de acetato 0,1 M, pH ajustado a pH 6,0, que contiene un 5% p/p de almidón de maíz común (libre de calcio). La incubación se realizó al baño maría a 95°C durante 30 minutos.

30 Determinación de estabilidad

[0160] Todos los ensayos de estabilidad 1, 2 se han hecho utilizando la misma configuración. El método fue:

35 [0161] La enzima se incubó bajo las condiciones pertinentes (1-4). Las muestras se tomaron a 0, 5, 10, 15 y 30 minutos y se diluyeron 25 veces (la misma dilución para todas las muestras tomadas) en el tampón de ensayo (0,1M 50mM Tampón de Britton pH 7,3) y la actividad se midió utilizando el ensayo Phadebas (Farmacia) bajo condiciones estándar pH 7,3, 37°C.

40 [0162] La actividad medida antes de la incubación (0 minutos) se utilizó como referencia (100%). El descenso en el porcentaje se calculó como función del periodo de incubación. La tabla muestra la actividad residual después de 30 minutos de incubación.

Método de estabilidad 1. / Mejora de estabilidad a pH bajo

[0163]

45

MINUTOS DE INCUBACIÓN	PESO AMILASA SEC. ID. N.º:3 (BSG)	VARIANTE SEC. ID N.º: 3 CON DELECCIÓN EN POS. I181-G182 (TVB145)	VARIANTE SEC. ID N.º: 3 CON DELECCIÓN EN POS. I181-G182 + N193F (TVB146)	VARIANTE SEC. ID N.º: 3 CON DELECCIÓN EN POS. I181-G182 + N193F + E214Q (TVB163)
0	100	100	100	100
5	29	71	83	77
10	9	62	77	70
15	3	50	72	67
30	1	33	62	60

ES 2 436 066 T3

[0164] Método de estabilidad 1. / Mejora de estabilidad a pH bajo La temperatura descrita en el método 1 se ha reducido de 95°C a 70°C ya que las amilasas mencionadas para SEC ID n.º: 1 y 2 tienen una termoestabilidad inferior que para SEC ID n.º: 3.

MINUTOS DE INCUBACIÓN	PESO AMILASA SEC. ID. N.º: 2	VARIANTE SEC. ID N.º: 2 CON DELECIÓN EN POS. D183-G184	AMILASA DE SEC. ID N.º: 1	VARIANTE DE SEC. ID N.º: 1 CON DELECIÓN EN POS. T183-G184
0	100	100	100	100
5	73	92	41	76
10	59	88	19	69
15	48	91	11	62
30	28	92	3	59

5

Método de estabilidad 2. / Sensibilidad de calcio bajo

[0165]

MINUTOS DE INCUBACIÓN	PESO DE AMILASA DE SEC ID NO: 3 (BSG)	VARIANTE DE SEC ID NO: 3 CON DELECIÓN EN POS. I181-G182 (TVB145)	VARIANTE DE SEC ID NO: 3 CON DELECIÓN EN POS. I181-G182 + N193F (TVB146)	VARIANTE DE SEC ID NO: 3 CON DELECIÓN EN POS. I181-G182 + N193F + E214Q (TVB163)
0	100	100	100	100
5	60	82	81	82
10	42	76	80	83
15	31	77	81	79
30	15	67	78	79

10

Determinación de actividad específica.

[0166] La actividad específica se determinó utilizando el ensayo Phadebas (Pharmacia) como actividad/mg de enzima. La actividad fue determinada usando el ensayo de α -amilasa descrito en la sección Materiales y Métodos de la presente.

15

[0167] La actividad específica de la enzima progenitora y una mutación única y una doble se determinaron para:

BSG: SEC ID NO:3 (enzima progenitora) 20000 NU/mg

20

TVB145: SEC ID NO:3 con la delección en posiciones

I181-G182: (mutación única) 34600 NU/mg

25

TVB146: SEC ID NO:3 con la delección en posiciones

I181-G182 + N193F: (mutación doble) 36600 NU/mg

30

TVB163: SEC ID NO:3 con la delección en posiciones

I181-G182+N193F+E214Q: (mutación Triple) 36300 NU/mg

35

ES 2 436 066 T3

EJEMPLO 3

Cocción a presión y licuefacción en instalación experimental con variante de alfa-amilasa TVB146

[0168] Se realizaron experimentos de licuefacción en una instalación experimental en el sistema mini-jet usando una dosis de 50 NU (S)/g DS a pH 5,5 con 5 ppm de Ca^{++} añadido, para comparar el rendimiento de la variante de BSG alfa-amilasa TVB146 formulada (SEC ID N.º: 3 con delección en posiciones I181-G182 + N193F) con aquella de BSG alfa-amilasa progenitora (SEC ID N.º: 3). La reacción se monitorizó por medición del aumento DE (método Neocuproine) como función del tiempo.

[0169] Se prepararon suspensiones de almidón de maíz de 11,8 kg Cerestar C*farm GL 03406 (89 % de almidón) en agua desionizada y se compensó hasta 30 kg. El pH se ajustó a 5,5 a temperatura ambiente, después de la adición de 0,55 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Se utilizaron las siguientes enzimas:

TVB146	108 KNU(S)/g, 146 KNU(SM9)/g
BSG amilasa	101 KNU(S)/g, 98 KNU(SM9)/g

[0170] Se añadió una cantidad de enzima correspondiente a 50 NU (SM9)/g DS, y la conductividad se ajustó a 300mS utilizando NaCl. Las condiciones estándar fueron las siguientes:

Concentración de sustrato	35 % p/p (inicial) 31,6-31,9 % p/p (final)
Temperatura	105°C, 5 min (licuefacción primaria) 95°C, 90 min (licuefacción secundaria)
pH (inicial)	5,5

[0171] Después del sometimiento a presión, el almidón licuado se recogió y transportó en termo-matracas sellados de la instalación experimental al laboratorio, donde se continuó la licuefacción secundaria a 95 °C.

[0172] Se tomaron 10 mL de muestra a intervalos de 15 minutos de 15-90 minutos. 2 gotas de HCl 1 N se adicionaron para inactivar la enzima. De estas muestras, se pesaron 0,3-0,1 g (según el DE previsto) y se diluyeron a 100 mL. Se determinaron luego los azúcares reductores según el método Neocuproine (determinación de azúcar reductor con precisión mejorada. Dygert, Li, Florida and Thomas (1965). Anal. Biochem 13, 368) y se determinaron los valores DE. El desarrollo de DE como función de tiempo se da en la siguiente tabla:

	TVB146	BSG
Tiempo (min.)	DE (neocuproina)	
15	2,80	2,32
30	4,88	3,56
45	6,58	4,98
60	8,17	6,00
75	9,91	7,40
90	11,23	8,03

[0173] Como se puede observar la variante de alfa-amilasa TVB146 dio un rendimiento significativamente mejor bajo condiciones de aplicación industrialmente relevantes a niveles bajos de calcio que la BSG alfa-amilasa progenitora.

EJEMPLO 4

Cocción a presión y Licuefacción con una combinación de variantes de alfa-amilasa (TVB146 y LE174)

[0174] La cocción a presión y licuefacción usando una combinación de las variantes de alfa-amilasa, TVB146 y LE174 (proporción 1:1) se realizaron en las condiciones siguientes:

Almidón de maíz en polvo de grado alimentario Sustrato A.E. Staley (100lbs)

ES 2 436 066 T3

D.S. 35% usando agua DI

Ca²⁺ Libre 2,7ppm a pH 5,3 (ningún añadido, del almidón sólo) pH inicial 5,3

- 5 La dosis unidad de AF9 (AF9 está disponible bajo pedido) para cada variante enzimática fue 28 NU/g de almidón db para una dosis total de 56 NU/g

Temperatura en la licuefacción primaria 105°C

- 10 Tiempo de mantenimiento en la licuefacción primaria 5 minutos

Temperatura en la licuefacción secundaria 95°C

- 15 [0175] A 15 minutos en licuefacción secundaria se añadieron 1,5 g de hidrolizado a un litro volumétrico pesado que contiene 500cc de agua DI y 1 mL de HCl uno normal y se registró el peso exacto añadido. Este se repitió a intervalos de 15 minutos hasta a 90 minutos con un punto adicional a 127 minutos. Estos se diluyeron hasta un litro y se determinó para equivalencia de dextrosa por medio del método de Neocuproina como se describe por Dygert, Li, Florida and Thomas. Determination of reducing sugar with improved precision (1965). Anal. Biochem 13: 368. Determinación de azúcar reductor con precisión mejorada (1965). Anal. Biochem 13, 368.

- 20 [0176] Los resultados fueron los siguientes:

Tiempo	DE
15	3,2
30	4,8
45	6,3
60	7,8
75	9,4
90	10,4
127	13,1

REFERENCIAS CITADAS

- 25 [0177]
- Klein, C., et al., Biochemistry 1992, 31, 8740-8746 .
- 30 Mizuno, H., et al., J. Mol. Biol. (1993) 234, 1282-1283 .
- Chang, C., et al, J. Mol. Biol. (1993) 229, 235-238 .
- 35 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 .
- 40 Brady, R.L., et al., Acta Crystallogr. sect. B, 47, 527-535 .
- Swift, H.J., et al., Acta Crystallogr. sect. B, 47, 535-544 .
- 45 A. Kadziola, Ph.D. Thesis: "An alpha-amylase from Barley and its Complex with a Substrate Analogue Inhibitor Studied by X-ray Crystallography", Department of Chemistry University of Copenhagen 1993 .
- MacGregor, E.A., Food Hydrocolloids, 1987, Vol.1, n.º 5-6 .
- B. Diderichsen and L. Christiansen, Cloning of a maltogenic α -amylase from *Bacillus stearothermophilus*, FEMS Microbiol.

ES 2 436 066 T3

letters: 56: pp. 53-60 (1988).

Hudson et al., Practical Immunology, Third edition (1989), Blackwell Scientific Publications .

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

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

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

10

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

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

15

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

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

20

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

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

25

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 .

LISTADO DE SECUENCIAS

30

[0178]

<110> Novozymes A/S

35

<120> Mutantes de alfa-amilasa

<130> 5276.215- EP

<160> 21

40

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 485

<212> PRT

45

<213> Bacillus sp.

<400> 1

ES 2 436 066 T3

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

ES 2 436 066 T3

145 150 155 160
 His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys
 165 170 175
 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp
 180 185 190
 Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met
 195 200 205
 Asp His Pro Glu Val Ile His Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr
 210 215 220
 Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His
 225 230 235
 Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr
 245 250 255
 Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu
 260 265 270
 Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val
 275 280 285
 Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly
 290 295 300
 Gly Tyr Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys
 305 310 315
 His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro
 325 330 335
 Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Gln Trp Phe Lys Pro Leu Ala
 340 345 350
 Tyr Ala Leu Val Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr
 355 360 365
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser

ES 2 436 066 T3

370 375 380
Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Phe Ala Tyr Gly Thr
385 390 395 400
Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
405 410 415
Gly Asn Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp
420 425 430
Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Asn Lys Ala Gly
435 440 445
Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile
450 455 460
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
465 470 475 480
Val Trp Val Lys Gln
485

- 5 <210> 2
<211> 485
<212> PRT
<213> Bacillus sp.

<400> 2

ES 2 436 066 T3

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His
1 5 10 15

Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ser
20 25 30

Asn Leu Arg Asn Arg Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Trp
35 40 45

Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
50 55 60

Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
65 70 75 80

ES 2 436 066 T3

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

ES 2 436 066 T3

Gly Asn Tyr Asp Met Ala Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Gln Lys
 305 310 315 320

His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro
 325 330 335

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

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

Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Ser Val Pro Ala Met Lys Ala
 370 375 380

Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Asn Phe Ala Tyr Gly Thr
 385 390 395 400

Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
 405 410 415

Gly Asn Thr Thr His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp
 420 425 430

Gly Pro Gly Gly Glu Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Asn Lys Ala Gly
 435 440 445

Gln Val Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Lys Pro Gly Thr Val Thr Ile
 450 455 460

Asn Ala Asp Gly Trp Ala Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
 465 470 475 480

Ile Trp Val Lys Arg
 485

<210> 3

<211> 514

<212> PRT

5 <213> Bacillus stearothermophilus

<400> 3

ES 2 436 066 T3

Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu
1 5 10 15

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

Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys
35 40 45

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

Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Ala Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr
65 70 75 80

Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met
85 90 95

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

Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln
115 120 125

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

Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His
145 150 155 160

Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr
165 170 175

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

Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His
195 200 205

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

ES 2 436 066 T3

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

ES 2 436 066 T3

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

Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp
465 470 475 480

Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Trp Ser Ile Thr Thr
485 490 495

Arg Pro Trp Thr Asp Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val
500 505 510

Ala Trp

<210> 4

<211> 483

<212> PRT

<213> Bacillus licheniformis

<400> 4

5

ES 2 436 066 T3

Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
 1 5 10 15

Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu
 20 25 30

Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
 35 40 45

Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
 50 55 60

Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
 65 70 75 80

Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn
 85 90 95

Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr
 100 105 110

ES 2 436 066 T3

Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val
 115 120 125

Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro
 130 135 140

Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe
 145 150 155 160

Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys
 165 170 175

Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn
 180 185 190

Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
 195 200 205

Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln
 210 215 220

Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
 225 230 235 240

Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met
 245 250 255

Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn
 260 265 270

Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
 275 280 285

His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
 290 295 300

Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser
 305 310 315 320

Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
 325 330 335

ES 2 436 066 T3

Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
 340 345 350

Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
 355 360 365

Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile
 370 375 380

Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His
 385 390 395 400

Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
 405 410 415

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

Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr
 435 440 445

Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser
 450 455 460

Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr
 465 470 475 480

Val Gln Arg

- <210> 5
- <211> 480
- <212> PRT
- <213> Bacillus amyloliquefaciens
- <400> 5

ES 2 436 066 T3

Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
1 5 10 15

Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
 20 25 30

Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser

ES 2 436 066 T3

	35		40		45														
Gln	Ser	Asp	Asn	Gly	Tyr	Gly	Pro	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asp	Leu	Gly	Glu				
	50					55					60								
Phe	Gln	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly	Thr	Lys	Ser	Glu				
65					70					75					80				
Leu	Gln	Asp	Ala	Ile	Gly	Ser	Leu	His	Ser	Arg	Asn	Val	Gln	Val	Tyr				
				85					90					95					
Gly	Asp	Val	Val	Leu	Asn	His	Lys	Ala	Gly	Ala	Asp	Ala	Thr	Glu	Asp				
			100					105					110						
Val	Thr	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Ala	Asn	Arg	Asn	Gln	Glu	Thr	Ser				
		115					120					125							
Glu	Glu	Tyr	Gln	Ile	Lys	Ala	Trp	Thr	Asp	Phe	Arg	Phe	Pro	Gly	Arg				
	130					135					140								
Gly	Asn	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	His	Trp	Tyr	His	Phe	Asp	Gly				
145					150					155					160				
Ala	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Ile	Ser	Arg	Ile	Phe	Lys	Phe	Arg				
				165					170					175					
Gly	Glu	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Ser	Ser	Glu	Asn	Gly	Asn				
			180					185					190						
Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Val	Asp	Tyr	Asp	His	Pro	Asp	Val				
		195					200					205							
Val	Ala	Glu	Thr	Lys	Lys	Trp	Gly	Ile	Trp	Tyr	Ala	Asn	Glu	Leu	Ser				
	210					215					220								
Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Ile	Lys	Phe	Ser	Phe				
225					230					235					240				
Leu	Arg	Asp	Trp	Val	Gln	Ala	Val	Arg	Gln	Ala	Thr	Gly	Lys	Glu	Met				
				245					250					255					
Phe	Thr	Val	Ala	Glu	Tyr	Trp	Gln	Asn	Asn	Ala	Gly	Lys	Leu	Glu	Asn				

ES 2 436 066 T3

260 265 270
 Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
 275 280 285
 His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
 290 295 300
 Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser Arg His Pro Glu Lys Ala
 305 310 315 320
 Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
 325 330 335
 Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
 340 345 350
 Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
 355 360 365
 Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp Asn Ile
 370 375 380
 Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro Gln His
 385 390 395 400
 Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
 405 410 415
 Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
 420 425 430
 Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys Asn Ala Gly Glu Thr
 435 440 445
 Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Lys Ile Gly Ser
 450 455 460
 Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp Gly Ser Val Ser Ile Tyr
 465 470 475 480

ES 2 436 066 T3

<210> 6
<211> 485
<212> PRT
<213> Bacillus sp.
<400> 6

5

ES 2 436 066 T3

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
 1 5 10 15
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Asn Ser Asp Ala Ser
 20 25 30
 Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
 35 40 45
 Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
 50 55 60
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
 65 70 75 80
 Thr Arg Ser Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly
 85 90 95
 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
 100 105 110
 Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn
 115 120 125
 Gln Glu Val Thr Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Arg Phe Asp
 130 135 140
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
 145 150 155 160
 His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Arg Leu Asn Asn Arg
 165 170 175
 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly His Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp
 180 185 190
 Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met
 195 200 205

ES 2 436 066 T3

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

ES 2 436 066 T3

Gly Ala Gly Gly Ser Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly
 435 440 445

Gln Val Trp Ser Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile
 450 455 460

Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
 465 470 475 480

Ile Trp Val Asn Lys
 485

<210> 7

<211> 485

<212> PRT

<213> Bacillus sp.

5

<400> 7

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
 1 5 10 15

Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala
 20 25 30

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

Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
 50 55 60

Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
 65 70 75 80

Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly
 85 90 95

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

Gly Thr Glu Ile Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn
 115 120 125

ES 2 436 066 T3

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

Phe Pro Gly Arg Gly Asn Asn His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
145 150 155 160

His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys
165 170 175

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

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

Asp His Pro Glu Val Ile His Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr
210 215 220

Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His
225 230 235 240

Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr
245 250 255

Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu
260 265 270

Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val
275 280 285

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

Gly Tyr Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys
305 310 315 320

His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro
325 330 335

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

ES 2 436 066 T3

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

Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser
370 375 380

Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Phe Ala Tyr Gly Thr
385 390 395 400

Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
405 410 415

Gly Asn Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp
420 425 430

Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Asn Lys Ala Gly
435 440 445

Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile
450 455 460

Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
465 470 475 480

Val Trp Val Lys Gln
485

<210> 8

<211> 485

<212> PRT

5 <213> Bacillus sp.

<400> 8

ES 2 436 066 T3

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His
1 5 10 15

Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ser
 20 25 30

Asn Leu Arg Asn Arg Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Trp
 35 40 45

ES 2 436 066 T3

Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
 50 55 60
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
 65 70 75 80
 Thr Arg Ser Gln Leu Glu Ser Ala Ile His Ala Leu Lys Asn Asn Gly
 85 90 95
 Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
 100 105 110
 Ala Thr Glu Asn Val Leu Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn
 115 120 125
 Gln Glu Ile Ser Gly Asp Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
 130 135 140
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
 145 150 155 160
 His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Phe Gln Asn Arg
 165 170 175
 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp
 180 185 190
 Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met
 195 200 205
 Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Arg Trp Gly Glu Trp Tyr
 210 215 220
 Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His
 225 230 235 240
 Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Ala
 245 250 255
 Thr Gly Lys Glu Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu
 260 265 270

ES 2 436 066 T3

Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val
 275 280 285

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

Gly Asn Tyr Asp Met Ala Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Gln Lys
 305 310 315 320

His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro
 325 330 335

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

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

Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Ser Val Pro Ala Met Lys Ala
 370 375 380

Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Asn Phe Ala Tyr Gly Thr
 385 390 395 400

Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
 405 410 415

Gly Asn Thr Thr His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp
 420 425 430

Gly Pro Gly Gly Glu Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Asn Lys Ala Gly
 435 440 445

Gln Val Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Lys Pro Gly Thr Val Thr Ile
 450 455 460

Asn Ala Asp Gly Trp Ala Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
 465 470 475 480

Ile Trp Val Lys Arg
 485

ES 2 436 066 T3

<210> 9
<211> 1455
<212> ADN
<213> Bacillus sp.
<400> 9

5

ES 2 436 066 T3

catcataatg gaacaaatgg tactatgatg caatatttcg aatggatttt gccaaatgac
60
gggaatcatt ggaacaggtt gagggatgac gcagctaact taaagagtaa agggataaca
120
gctgatgga tcccacctgc atggaagggg acttcccaga atgatgtagg ttatggagcc
180
tatgatttat atgatcttgg agagttaac cagaagggga cggttcgtac aaaatatgga
240
acacgcaacc agctacaggc tgcggtgacc tctttaaaaa ataacggcat tcaggtatat
300
ggtgatgtcg tcatgaatca taaagggtga gcagatggta cggaaattgt aatgcggtga
360
gaagtgaatc ggagcaaccg aaaccaggaa acctcaggag agtatgcaat agaagcgtgg
420
acaaagtttg attttcttgg aagaggaaat aaccattcca gctttaagtg gcgctggtat
480
cattttgatg ggacagattg ggatcagtca cgccagcttc aaaacaaaat atataaattc
540
aggggaacag gcaaggcctg ggactgggaa gtcgatacag agaatggcaa ctatgactat
600
cttatgtatg cagacgtgga tatggatcac ccagaagtaa tacatgaact tagaaactgg
660
ggagtgtggt atacgaatac actgaacctt gatggattta gaatagatgc agtgaaacat
720
ataaaatata gctttacgag agattggctt acacatgtgc gtaacaccac aggtaaacca
780
atgtttgcag tggctgagtt ttggaaaaat gaccttgggt caattgaaaa ctatttgaat
840
aaaacaagtt ggaatcactc ggtgtttgat gttcctctcc actataattt gtacaatgca
900
tctaatagcg gtggttatta tgatatgaga aatattttaa atggttctgt ggtgcaaaaa
960
catccaacac atgccgttac ttttgttgat aaccatgatt ctacgcccg ggaagcattg
1020

ES 2 436 066 T3

gaatcctttg ttcaacaatg gtttaaacca cttgcatatg cattggttct gacaagggaa
1080

caaggttatc cttccgtatt ttatggggat tactacggta tcccaacca tgggtgtccg
1140

gctatgaaat ctaaaataga ccctcttctg caggcacgtc aaacttttgc ctatgggtacg
1200

cagcatgatt actttgatca tcatgatatt atcggttgga caagagaggg aaatagctcc
1260

catccaaatt caggccttgc caccattatg tcagatggtc caggtggtaa caaatggatg
1320

tatgtgggga aaaataaagc gggacaagtt tggagagata ttaccggaaa taggacaggc
1380

accgtcacia ttaatgcaga cggatggggt aatttctctg ttaatggagg gtccgtttcg
1440

gtttgggtga agcaa
1455

- 5 <210> 10
<211> 1455
<212> ADN
<213> Bacillus sp.

<400> 10

ES 2 436 066 T3

catcataatg ggacaaatgg gacgatgatg caatactttg aatggcactt gcctaataatgat
60

gggaatcact ggaatagatt aagagatgat gctagtaatc taagaaatag aggtataacc
120

gctatattgga ttccgcctgc ctggaaaggg acttcgcaaa atgatgtggg gtatggagcc
180

tatgatcttt atgatttagg ggaatttaaat caaaagggga cggttcgtac taagtatggg
240

acacgtagtc aattggagtc tgccatccat gctttaaaga ataatggcgt tcaagtttat
300

ggggatgtag tgatgaacca taaaggagga gctgatgcta cagaaaacgt tcttgctgtc
360

gaggtgaatc caaataaccg gaatcaagaa atatctgggg actacacaat tgaggcttgg
420

actaagtttg atttccagg gaggggtaat acatactcag actttaaatg gcgttggtat
480

ES 2 436 066 T3

catttcgatg gtgtagattg ggatcaatca cgacaattcc aaaatcgtat ctacaaattc
540

cgaggatgatg gtaaggcatg ggattgggaa gtagattcgg aaaatggaaa ttatgattat
600

ttaatgtatg cagatgtaga tatggatcat ccggaggtag taaatgagct tagaagatgg
660

ggagaatggt atacaaatac attaaatctt gatggattta ggatcogatgc ggtgaagcat
720

attaaatata gctttacacg tgattggttg acccatgtaa gaaacgcaac gggaaaagaa
780

atgtttgctg ttgctgaatt ttggaaaaat gatttaggtg ccttggagaa ctatttaa
840

aaaacaaact ggaatcattc tgtctttgat gtcccccttc attataatct ttataacgcg
900

tcaaatagtg gaggcaacta tgacatggca aaacttctta atggaacggt tgttcaaaag
960

catccaatgc atgccgtaac ttttgtggat aatcacgatt ctcaacctgg ggaatcatta
1020

gaatcatttg tacaagaatg gtttaagcca cttgcttatg cgcttatttt aacaagagaa
1080

caaggctatc cctctgtctt ctatggtgac tactatggaa ttccaacaca tagtgtccca
1140

gcaatgaaag ccaagattga tccaatctta gaggcgcgtc aaaattttgc atatggaaca
1200

caacatgatt attttgacca tcataatata atcggatgga cacgtgaagg aaataccacg
1260

catcccaatt caggacttgc gactatcatg tcggatgggc cagggggaga gaaatggatg
1320

tacgtagggc aaaataaagc aggtcaagtt tggcatgaca taactggaaa taaaccagga
1380

acagttacga tcaatgcaga tggatgggct aatttttcag taaatggagg atctgtttcc
1440

atgtgggtga aacga
1455

ES 2 436 066 T3

<210> 11
<211> 1548
<212> ADN
<213> Bacillus sp.
<400> 11

5

ES 2 436 066 T3

gccgcaccgt ttaacggcac catgatgcag tattttgaat ggtacttgcc ggatgatggc
60
acgttatgga ccaaagtggc caatgaagcc aacaacttat ccagccttgg catcacogct
120
ctttggctgc cgcccgetta caaaggaaca agccgcagcg acgtagggta cggagtatac
180
gacttgatg acctcggoga attcaatcaa aaagggaccg tccgcacaaa atacggaaca
240
aaagctcaat atcttcaagc cattcaagcc gccacgcog ctggaatgca agtgtacgcc
300
gatgtcgtgt tcgaccataa aggcggcgct gacggcacgg aatgggtgga cgccgtcgaa
360
gtcaatccgt cggaccgcaa ccaagaaatc tcgggcacct atcaaatcca agcatggacg
420
aaatttgatt ttcccgggog gggcaacacc tactccagct ttaagtggcg ctggtaccat
480
tttgacggcg ttgattggga cgaaagccga aaattgagcc gcatttaca attccogcggc
540
atcggcaaaq cgtgggattg ggaagtagac acggaaaacg gaaactatga ctacttaatg
600
tatgccgacc ttgatatgga tcatcccga gtcgtgaccg agctgaaaaa ctgggggaaa
660
tggtatgtca acacaacgaa cattgatggg ttccggcttg atgccgtcaa gcatattaag
720
ttcagttttt ttctgattg gttgtcgtat gtgcgttctc agactggcaa gccgctattt
780
accgtcgggg aatattggag ctatgacatc aacaagttgc acaattacat tacgaaaaca
840
gacggaacga tgtctttggt tgatgccccg ttacacaaca aattttatac cgcttccaaa
900
tcagggggcg catttgatat gcgcacgtta atgaccaata ctctcatgaa agatcaaccg
960
acattggcog tcaccttctg tgataatcat gacaccgaac cggccaagc gctgcagtca
1020
tgggtcgacc catggttcaa accgttggct tacgccttta ttctaactcg gcaggaagga
1080

ES 2 436 066 T3

taccctgctg tcttttatgg tgactattat ggcattccac aatataacat tccttcgctg
1140

aaaagcaaaa tcgatccgct cctcatcggc cgcagggatt atgcttacgg aacgcaacat
1200

gattatcttg atcaactcga catcatcggg tggacaaggg aagggggcac tgaaaaacca
1260

ggatccggac tggccgcact gatcaccgat gggccgggag gaagcaaatg gatgtacgtt
1320

ggcaaacaa acgctggaaa agtggtctat gaccttaccg gcaaccggag tgacaccgtc
1380

accatcaaca gtgatggatg gggggaattc aaagtcaatg gcggttcggg ttcggtttgg
1440

gttctagaa aaacgaccgt ttctaccatc gctcggccga tcacaaccgg accgtggact
1500

ggtgaattcg tccgttggac cgaaccacgg ttggtggcat ggccttga
1548

<210> 12

<211> 2084

<212> ADN

<213> Bacillus sp.

<400> 12

5

ES 2 436 066 T3

gccccgcaca tacgaaaaga ctggctgaaa acattgagcc tttgatgact gatgatttgg
60

ctgaagaagt ggatcgattg tttgagaaaa gaagaagacc ataaaaatac ctgtctgtc
120

atcagacagg gtatttttta tgcgtgccag actgtccgct gtgtaaaaat aaggaataaa
180

ggggggttgt tattatttta ctgatatgta aaatataatt tgtataagaa aatgagaggg
240

agaggaaaca tgattcaaaa acgaaagcgg acagtttcgt tcagacttgt gcttatgtgc
300

acgctgttat ttgtcagttt gccgattaca aaaacatcag ccgtaaattgg cacgctgatg
360

cagtattttg aatggtatac gccgaacgac ggccagcatt ggaaacgatt gcagaatgat
420

gcggaacatt tatcggatat cggaatcact gccgtctgga ttcctcccgc atacaaagga
480

ES 2 436 066 T3

ttgagccaat ccgataacgg atacggacct tatgatttgt atgatttagg agaattccag
540

caaaaagggg cggtcagaac gaaatacggc acaaaatcag agcttcaaga tgcgatcggc
600

tcactgcatt cccggaacgt ccaagtatac ggagatgtgg ttttgaatca taaggctggt
660

gctgatgcaa cagaagatgt aactgccgtc gaagtcaatc cggccaatag aatcaggaa
720

acttcggagg aatatcaaat caaagcgtgg acggattttc gttttccggg ccgtggaaac
780

acgtacagtg attttaaatg gcattggtat catttcgacg gagcggactg ggatgaatcc
840

cggaagatca gccgcactct taagtttcgt ggggaaggaa aagcgtggga ttgggaagta
900

tcaagtgaat acggcaacta tgactattta atgtatgctg atgttgacta cgaccacct
960

gatgtcgtgg cagagacaaa aaaatggggg atctggtatg cgaatgaact gtcattagac
1020

ggcttcogta ttgatgcgc caaacatatt aaatttcat ttctgogtga ttgggttcag
1080

gcggtcagac aggcgacggg aaaagaaatg ttacgggtg cggagtattg gcagaataat
1140

gccgggaaac tcgaaaacta cttgaataaa acaagcttta atcaatccgt gtttgatgtt
1200

ccgcttcatt tcaatttaca ggcggcttcc tcacaaggag gcggatatga tatgagcgt
1260

ttgctggacg gtaccgttgt gtccaggcat ccggaaaagg cggttacatt tgttgaaat
1320

catgacacac agccgggaca gtcattggaa tcgacagtcc aaacttggtt taaaccgctt
1380

gcatacgcct ttattttgac aagagaatcc ggttatcctc aggtgttota tggggatatg
1440

taagggaaa aagggacatc gccaaaaggaa attccctcac tgaaagataa tatagagccg
1500

attttaaaag cgcgtaagga gtacgcatac gggccccagc acgattatat tgaccaccgg
1560

gatgtgatcg gatggacgag ggaaggtgac agctccgccc ccaaatcagg tttggccgct
1620

ES 2 436 066 T3

ttaatcacgg acggacccgg cggatcaaag cggatgtatg cgggectgaa aaatgccggc
1680

gagacatggt atgacataac gggcaaccgt tcagatactg taaaaatcgg atctgacggc
1740

tggggagagt ttcattgtaa cgatgggtcc gtctccattt atgttcagaa ataaggtaat
1800

aaaaaacac ctccaagctg agtgccggta tcagcttgga ggtgcgttta tttttcagc
1860

cgtatgacaa ggtcggcatc aggtgtgaca aatacgggat gctggctgtc ataggtgaca
1920

aatccggggt ttgcgcggtt tggtttttc acatgtotga tttttgtata atcaacaggc
1980

acggagccgg aatctttcgc cttggaaaaa taagcggcga tcgtagctgc ttccaatag
2040

gattgttcat cgggatcget gcttttaac acaacgtggg atcc
2084

- 5 <210> 13
<211> 1455
<212> ADN
<213> Bacillus sp.

<400> 13

ES 2 436 066 T3

catcataatg gaacaaatgg tactatgatg caatatttcg aatggatatt gccaaatgac
60

gggaatcatt ggaacaggtt gagggatgac gcagctaact taaagagtaa agggataaca
120

gctgatgga tcccacctgc atggaagggg acttcccaga atgatgtagg ttatggagcc
180

tatgatttat atgatcttgg agagttaac cagaagggga cggttcgtac aaaatatgga
240

acacgcaacc agctacaggc tgcggtgacc tctttaaaaa ataacggcat tcaggtatat
300

ggtgatgtcg tcatgaatca taaaggtgga gcagatggta cggaaattgt aatgctggta
360

gaagtgaatc ggagcaaccg aaaccaggaa acctcaggag agtatgcaat agaagcgtgg
420

acaaagtttg attttcttgg aagaggaaat aaccattcca gctttaagtg gcgctggtat
480

ES 2 436 066 T3

cattttgatg ggacagattg ggatcagtca cgccagcttc aaaacaaaat atataaatc
540

aggggaacag gcaaggcctg ggactgggaa gtcgatacag agaatggcaa ctatgactat
600

cttatgtatg cagacgtgga tatggatcac ccagaagtaa tacatgaact tagaaactgg
660

ggagtgtggt atacgaatac actgaacctt gatggattta gaatagatgc agtgaaacat
720

ataaaatata gctttacgag agattggctt acacatgtgc gtaacaccac aggtaaacca
780

atgtttgcag tggctgagtt ttggaaaaat gaccttgggtg caattgaaaa ctatttgaat
840

aaaacaagtt ggaatcactc ggtgtttgat gttcctctcc actataattt gtacaatgca
900

tctaatagcg gtggttatta tgatatgaga aatattttaa atggttctgt ggtgcaaaaa
960

catccaacac atgccgttac ttttgttgat aaccatgatt ctccagcccg ggaagcattg
1020

gaatcctttg ttcaacaatg gtttaaacca cttgcatatg cattggttct gacaagggaa
1080

caaggttatc cttccgtatt ttatggggat tactacggta tccaaccca tgggtttccg
1140

gctatgaaat ctaaaataga ccctcttctg caggcaagtc aaacttttgc ctatggtaag
1200

cagcatgatt actttgatca tcatgatatt atcggttgga caagagaggg aaatagctcc
1260

catccaaatt caggccttgc caccattatg tcagatggtc caggtggtaa caaatggatg
1320

tatgtgggga aaaataaagc gggacaagtt tggagagata ttaccggaaa taggacaggc
1380

accgtcacia ttaatgcaga cggatggggg aatttctctg ttaatggagg gtccgtttcg
1440

gtttgggtga agcaa
1455

ES 2 436 066 T3

<210> 14
<211> 1455
<212> ADN
<213> Bacillus sp.
<400> 14

5

ES 2 436 066 T3

catcataatg ggacaaatgg gacgatgatg caatactttg aatggcactt gcctaataatgat
60
gggaatcact ggaatagatt aagagatgat gctagtaatc taagaaatag aggtataacc
120
gctatattgga ttccgcctgc ctggaaaggg acttcgcaaa atgatgtggg gtatggagcc
180
tatgatcttt atgatttagg ggaatttaaat caaaagggga cggttcgtac taagtatggg
240
acacgtagtc aattggagtc tgccatccat gctttaaaga ataatggcgt tcaagtttat
300
ggggatgtag tgatgaacca taaaggagga gctgatgcta cagaaaacgt tcttgctgtc
360
gaggatgaatc caaataaccg gaatcaagaa atatctgggg actacacaat tgaggcttgg
420
actaagtttg atttccagg gaggggtaat acatactcag actttaaatg gcgttggtat
480
catttcgatg gtgtagattg ggatcaatca cgacaattcc aaaatcgtat ctacaaattc
540
cgaggatgatg gtaaggcatg ggattgggaa gtagattcgg aaaatggaaa ttatgattat
600
ttaatgtatg cagatgtaga tatggatcat ccggaggtag taaatgagct tagaagatgg
660
ggagaatggt atacaaatac attaaatctt gatggattta ggatcgatgc ggtgaagcat
720
attaaatata gctttacacg tgattggttg acccatgtaa gaaacgcaac gggaaaagaa
780
atgtttgctg ttgctgaatt ttggaaaaat gatttaggtg ccttgagaaa ctatttaaat
840
aaaacaaact ggaatcattc tgtctttgat gtcccccttc attataatct ttataacgcg
900
tcaaatagtg gaggcaacta tgacatggca aaacttotta atggaacggt tgttcaaaag
960
catccaatgc atgccgtaac ttttgtggat aatcacgatt ctcaacctgg ggaatcatta
1020
gaatcatttg tacaagaatg gtttaagcca cttgcttatg cgcttatttt aacaagagaa
1080

ES 2 436 066 T3

caaggetatc cctctgtctt ctatggtgac tactatggaa ttccaacaca tagtgtccca
1140

gcaatgaaag ccaagattga tccaatotta gaggegcgtc aaaattttgc atatggaaca
1200

caacatgatt attttgacca tcataatata atcggatgga cacgtgaagg aaataccacg
1260

catcccaatt caggacttgc gactatcatg tcggatgggc cagggggaga gaaatggatg
1320

taogtagggc aaaataaagc aggtcaagtt tggcatgaca taactggaaa taaaccagga
1380

acagttacga tcaatgcaga tggatgggct aatttttcag taaatggagg atctgtttcc
1440

atttgggtga aacga
1455

5 <210> 15
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador BSG1
<400> 15

ccatgatgca gtattttgaa tgg
23

15 <210> 16
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Cebador BSG3
<400> 16

gtcaccataa aagacgcacg gg
22

25
30 <210> 17
<211> 70
<212> ADN
<213> Artificial

ES 2 436 066 T3

<220>
<223> Cebador BSGM1

5 <400> 17

gtcatagttt ccgaattccg tgtctacttc ccaatcccaa tcccaagctt tgccgcggaa
60

tttgtaaattg
70

10 <210> 18
<211> 41
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Cebador BSGM2
<400> 18

ctacttccca atcccaagct ttgcccggga atttgtaaatt g
41

20 <210> 19
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

25 <220>
<223> Cebador BSGM3
<400> 19

ggatgatcca tgtcaaagtc ggcatac
27

30 <210> 20
<211> 25
<212> ADN
35 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador BSGM4
40 <400> 20

ctcggtcacc acgtggggat gatcc
25

45 <210> 21
<211> 24

ES 2 436 066 T3

<212> ADN
<213> Artificial

5 <220>
<223> Cebador BSGM5
<400> 21

ccagtttttc agctgggtca cgac
24

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Variante de una α -amilasa tipo Termamyl progenitora, donde la α -amilasa tipo Termamyl progenitora se selecciona de:
- (i) SEC ID n.º: 1, SEC ID n.º: 2, SEC ID n.º: 3, SEC ID n.º: 4, SEC ID n.º: 5, SEC ID n.º: 6, SEC ID n.º: 7 o SEC ID n.º: 8
o
(ii) una α -amilasa progenitora de tipo Termamyl con al menos un 80% de homología a una de las secuencias en (i); y
- 10 donde la variante tiene actividad de α -amilasa y comprende las mutaciones R181* y G182* y una sustitución seleccionada de N195A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V (con respecto a SEC ID n.º: 6) o en posiciones correspondientes en otras α -amilasas de tipo Termamyl progenitoras, y donde la variante muestra una termoestabilidad aumentada a pH ácido y/o a una concentración de Ca^{2+} inferior a 40 ppm, en comparación con una variante correspondiente que comprende las mutaciones R181* y G182* sin la sustitución a N195.
- 15 2. Constructo de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una variante de α -amilasa según la reivindicación 1.
3. Vector de expresión recombinante que lleva un constructo de ADN según la reivindicación 2.
- 20 4. Célula que se transforma con un constructo de ADN según la reivindicación 2 o un vector según la reivindicación 3.
5. Célula según la reivindicación 4, que es un microorganismo.
- 25 6. Aditivo de detergente que incluye una variante de α -amilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1, opcionalmente en forma de granulado que no forma polvo, líquido estabilizado o enzima protegida.
7. Composición de detergente que incluye una variante de α -amilasa según la reivindicación 1.
- 30 8. Composición para detergente de lavado de vajilla manual o automático que incluye una variante de α -amilasa según la reivindicación 1.
9. Composición de lavado de ropa manual o automático que incluye una variante de α -amilasa según la reivindicación 1.
- 35 10. Composición comprendiendo:
- (i) una mezcla de la α -amilasa de *B. licheniformis* con la secuencia mostrada en SEC ID n.º: 4 con una o más variantes según la reivindicación 1 derivada de (como la α -amilasa progenitora de tipo Termamyl) la α -amilasa de *B. stearothermophilus* con la secuencia mostrada en SEC ID n.º: 3 o
- 40 (ii) una mezcla de la α -amilasa de *B. stearothermophilus* con la secuencia mostrada en SEC ID n.º: 3 con una o más variantes según la reivindicación 1 derivadas de una o varias otras α -amilasas de tipo Termamyl progenitoras; o
- (iii) una mezcla de una o más variantes según la reivindicación 1 derivada de (como la α -amilasa progenitora de tipo Termamyl) la α -amilasa de *B. stearothermophilus* con la secuencia mostrada en SEC ID n.º: 3 con una o más variantes según la invención derivadas de una o varias otras α -amilasas progenitoras de tipo Termamyl.
- 45 11. Uso de una variante de α -amilasa según la reivindicación 1 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 para lavado de ropa y/o vajilla.
- 50 12. Uso de una variante de α -amilasa según la reivindicación 1 o una composición según la reivindicación 9 para el desencolado textil.
- 55 13. Uso de una variante de α -amilasa según la reivindicación 1 o una composición según la reivindicación 9 para la licuefacción de almidón.

ES 2 436 066 T3

	1				50
1	HHNGTNGTMM	QYFEWHL PND	GNHWNRLRDD	ASNLNRNGIT	AIWIPPAWKG
2	..NGTNGTMM	QYFEWYLPND	GNHWNRLRSD	ASNLKDKGIS	AVWIPPAWKG
3	HHNGTNGTMM	QYFEWYLPND	GNHWNRLRDD	AANLKSKGIT	AVWIPPAWKG
4	...VNGTLM	QYFEWYTPND	GQHWKRLQND	AEHLSDIGIT	AVWIPPAYKG
5	..ANLNGTLM	QYFEWYMPND	GQHWRRLLQND	SAYLAEHGIT	AVWIPPAYKG
6	.AAPFNGTMM	QYFEWYLPDD	GTLWTKVANE	ANNLSSLGIT	ALWLPPAYKG
	51				100
1	TSQNDVGYGA	YDLYDLGEFN	QKGTVRTKYG	TRSQLESaih	ALKNNGVQVY
2	ASQNDVGYGA	YDLYDLGEFN	QKGTIRTKYG	TRNQLQAAVN	ALKSNGIQVY
3	TSQNDVGYGA	YDLYDLGEFN	QKGTVRTKYG	TRNQLQAAVT	SLKNNGIQVY
4	LSQSDNGYGP	YDLYDLGEFQ	QKGTVRTKYG	TKSELQDAIG	SLHSRNVQVY
5	TSQADVGYGA	YDLYDLGEFH	QKGTVRTKYG	TKGELQSAIK	SLHSRDINVY
6	TSRSDVGYGV	YDLYDLGEFN	QKGTVRTKYG	TKAQYLQAIQ	AAHAAGMQVY
	101				150
1	GDVVMNHKGG	ADATENVLAV	EVNPNNRNQE	ISGDYTIeAW	TKFDFFPGRGN
2	GDVVMNHKGG	ADATEMVRVAV	EVNPNNRNQE	VSGEYTIeAW	TKFDFFPGRGN
3	GDVVMNHKGG	ADGTEIVNAV	EVNRSNRNQE	TSGEYAIEAW	TKFDFFPGRGN
4	GDVVLNHKAG	ADATEDVTAV	EVNPNANRNQE	TSEYQIKAW	TDFRFPGRGN
5	GDVVINHKGG	ADATEDVTAV	EVDPADRNRV	ISGEHLIKAW	THFHFPGRGS
6	ADVVFDPHKGG	ADGTEWVDAV	EVNPSDRNQE	ISGTYQIQAW	TKFDFFPGRGN
	151				200
1	TYSDFKWRWY	HFDGVDWDQS	RQFQNRIYKF	RGDGKAWDWE	VDSENGNYDY
2	THSNFKWRWY	HFDGVDWDQS	RKLNNRIYKF	RGDGKAWDWE	VDTENGNyDY
3	NHSSFkWRWY	HFDGTDWDQS	RQLQNKIYKF	RGTGKAWDWE	VDTENGNyDY
4	TYSDFKWHWY	HFDGADWDES	RKI.SRIFKF	RGEGKAWDWE	VSENGNYDY
5	TYSDFKWHWY	HFDGTDWDES	RKL.NRIYKF	..QGKAWDWE	VSNENGNyDY
6	TYSSFkWRWY	HFDGVDWDES	RKL.SRIYKF	RGIGKAWDWE	VDTENGNyDY

Figura 1

ES 2 436 066 T3

	201				250
1	LMYADVDMDH	PEVVNELRRW	GEWYTNTLNL	DGFRIDAVKH	IKYSFTRDWL
2	LMYADIDMDH	PEVVNELRNW	GVWYTNTLGL	DGFRIDAVKH	IKYSFTRDWS
3	LMYADVDMDH	PEVIHELNRW	GVWYTNTLNL	DGFRIDAVKH	IKYSFTRDWL
4	LMYADVDDYDH	PDVVAETKKW	GIWYANELSL	DGFRIDAANKH	IKFSFLRDWV
5	LMYADIDYDH	PDVAAEIKRW	GTWYANELQL	DGFRLDVAVKH	IKFSFLRDWV
6	LMYADLDMDH	PEVVTELKNW	GKWIYVNTNI	DGFRLDVAVKH	IKFSFFPDWL
	251				300
1	THVRNATGKE	MFAVAEFWKN	DLGALENYLN	KTNWNHSVFD	VPLHYNLYNA
2	IHVRSATGKN	MFAVAEFWKN	DLGAIENYLN	KTNWNHSVFD	VPLHYNFYNA
3	THVRNTTGKP	MFAVAEFWKN	DLGAIENYLN	KTSWNHSAFD	VPLHYNLYNA
4	QAVRQATGKE	MFTVAEYWQN	NAGKLENYLN	KTSFNQSVFD	VPLHFNLQAA
5	NHVREKTGKE	MFTVAEYWQN	DLGALENYLN	KTNFNHSVFD	VPLHYQFHAA
6	SYVRSQTGKP	LFTVGEYWSY	DINKLHNYIT	KTDGTMSLFD	APLHNKFYTA
	301				350
1	SNSGGNYDMA	KLLNGTVVQK	HPMHAVTFVD	NHDSQPGEAL	ESFVQEWFKP
2	SKSGGNYDMR	QIFNGTVVQR	HPMHAVTFVD	NHDSQPPEAL	ESFVEEWFKP
3	SNSGGYYDMR	NILNGSVVQK	HPTHAVTFVD	NHDSQPGEAL	ESFVQQWFKP
4	SSQGGGYDMR	RLLDGTVVSR	HPEKAVTFVE	NHDTQPGQSL	ESTVQTFWFKP
5	STQGGGYDMR	KLLNGTVVSK	HPLKSVTFVD	NHDTQPGQSL	ESTVQTFWFKP
6	SKSGGAFDMR	TLMTNTLMKD	QPTLAVTFVD	NHDTEPGQAL	QSWVDPWFKP
	351				400
1	LAYALILTRE	QGYPVVFYGD	YGIPTHS..	.VPAMKAKID	PILEARQNFA
2	LAYALTLTRE	QGYPVVFYGD	YGIPTHG..	.VPAMKSKID	PILEARQKYA
3	LAYALVLTRE	QGYPVVFYGD	YGIPTHG..	.VPAMKSKID	PLLQARQTFA
4	LAYAFILTRE	SGYPQVVFYGD	MYGTKGTSPK	EIPSLKDNIE	PILKARKEYA
5	LAYAFILTRE	SGYPQVVFYGD	MYGTKGDSQR	EIPALKHKIE	PILKARKQYA
6	LAYAFILTRQ	EGYPCVVFYGD	YGIPOYN..	.IPSLKSKID	PLLIARRDYA
	401				450
1	YGTQHDFYDH	HNIIGWTREG	NTTHPNSGLA	TIMSDGPGGE	KWYVVGQNK
2	YGRQN.....
3	YGTQHDFYDH	HDIIGWTREG	NSSHNSGLA	TIMSDGPGGN	KWYVVGKNKA
4	YGPQHDFYDH	PDVIGWTREG	DSSAAKSGLA	ALITDGPGGG	KRMYAGLKNA
5	YGAQHDFYDH	HDIIGWTREG	DSSVANSGLA	ALITDGPGGG	KRMYVGRQNA
6	YGTQHDFYLDH	SDIIGWTREG	GTEKPGSGLA	ALITDGPGGG	KWYVVGKQHA

Figura 1 (continuación)

```

451                                                    500
1  GQVWHDITGN KPGTVTINAD GWANFSVNGG SVSIWVKR.. .....
2  .....
3  GQVWRDITGN RTGTVTINAD GWGNFSVNGG SVSVWVKQ.. .....
4  GETWYDITGN RSDTVKIGSD GWGEFHVNDG SVSIYVQ... .....
5  GETWHDITGN RSEPVINSE GWGEFHVNGG SVSIYVQR.. .....
6  GKVFYDLTGN RSDTVTINSD GWGEFKVNGG SVSVWVPRKT TVSTIARPI

501                519
1  .....
2  .....
3  .....
4  .....
5  .....
6  TRPWTGEFVR WTEPRLVAW

```

Figura 1 (continuación)