

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 496 568**

51 Int. Cl.:

C12N 9/28 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2000 E 07106717 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.06.2014 EP 1818396**

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

30 Prioridad:

30.03.1999 DK 43799

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

19.09.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ANDERSEN, CARSTEN;
JØRGENSEN, CHRISTEL THEA;
BISGÅRD-FRANTZEN, HENRIK;
SVENDSEN, ALLAN y
KJÆRULFF, SØREN**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 496 568 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

Variantes de alfa-amilasa

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere, entre otras cosas, a variantes nuevas de alfa-amilasas progenitoras tipo Termamyl, sobre todo a variantes que presentan propiedades alteradas, en particular un modelo de seccionamiento alterado (con respecto al progenitor) que es ventajoso con respecto a las aplicaciones de las variantes, en particular, en el tratamiento del almidón industrial (p. ej., licuefacción o sacarificación del almidón).

Antecedentes de la invención

[0002] Las alfa-amilasas (alfa-1,4-glucan4-hidrolasas, EC 3.2.1.1) constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del almidón y otros oligo y polisacáridos 1,4-glicosídicos lineales y ramificados.

[0003] Hay un cuerpo muy extenso de patentes y bibliografía científica relacionadas con esta clase de enzimas industrialmente muy importantes. Varias alfa-amilasas tales como las variantes de las alfa-amilasas tipo Termamyl son conocidas a partir de, p. ej., WO 90/11352, WO 95/10603, WO 95/26397, WO 96/23873, WO 96/23874 y WO 97/41213.

[0004] La reciente descripción relacionada con las alfa-amilasas comprende el documento WO 96/23874 el cual proporciona datos estructurales de cristales tridimensionales por rayos X para una alfa-amilasa tipo Termamyl, a la que se hace referencia como BA2, que consiste en 300 residuos de aminoácidos N-terminales de alfa-amilasa de *B. amyloliquefaciens* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 6 en la presente y los aminoácidos 301-483 del extremo C-terminal de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4 en la presente (estando disponible comercialmente con el nombre comercial TermamylTM), y que está por tanto muy relacionada con las alfa-amilasas de *Bacillus* industrialmente importantes (que en este contexto se incluyen dentro del significado de los términos "alfa-amilasas de tipo Termamyl", y que incluyen, entre otros, las alfa-amilasas de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. stearothermophilus*). El documento WO 96/23874 también describe la metodología para diseñar, basándose en un análisis de la estructura de una alfa-amilasa progenitora tipo Termamyl, variantes de la alfa-amilasa progenitora tipo Termamyl que presentan propiedades alteradas relativas al progenitor.

[0005] WO 96/23874 y WO 97/41213 (Novo Nordisk) exponen variantes de la alfa-amilasa tipo Termamyl con un modelo de seccionamiento alterado que contiene mutaciones en los residuos de aminoácidos V54; D53; Y56; Q333; G57 y A52 de la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 4 en la presente.

Breve descripción de la invención

[0006] La presente invención se refiere a alfa-amilasas tal y como se define en la reivindicación 1, que son ventajosas con respecto al tratamiento industrial del almidón (licuefacción del almidón, sacarificación y similares).

[0007] Los inventores han encontrado de forma sorprendente variantes con propiedades alteradas, en particular un modelo de seccionamiento alterado que tiene una capacidad reducida mejorada para seccionar un sustrato cerca del punto de ramificación, y que además tienen una especificidad de sustrato mejorada y/o una actividad específica mejorada, en comparación con el WO 96/23874 y WO 97/41213 (Novo Nordisk) descrita como variantes de alfa-amilasa de tipo Termamyl con un modelo de seccionamiento alterado que contiene mutaciones en los residuos de aminoácidos V54;D53;Y56;Q333;G57 y A52 de la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 4 en la presente.

[0008] La invención además se refiere a constructos de ADN que codifican variantes de la invención, a composición que comprende alfa-amilasas de la invención, a vectores de expresión recombinantes que transportan los constructos de ADN, a las células transformadas con los constructos de ADN, y al uso de alfa-amilasas y composiciones de la invención, solas o en combinación con otras enzimas alfa-amilolíticas, en varios procesos industriales, p. ej., en la licuefacción del almidón, y en composiciones de detergentes, tales como composiciones de limpieza para la ropa, para lavavajillas y para superficies duras; para la producción de etanol, como la producción de etanol para combustible, para bebidas e industrial; para el desencolado de telas, tejidos o prendas etc.

Nomenclatura

[0009] En la presente descripción y reivindicaciones, se usan los códigos convencionales de una sola letra y de tres letras para residuos de aminoácidos. Para mayor facilidad de referencia, las variantes de alfa-amilasa de la invención se describen usando la nomenclatura siguiente:

Aminoácido(s) original(es):posición(es):aminoácido(s) sustituido(s)

65

[0010] Según esta nomenclatura, por ejemplo la sustitución de alanina por asparraguina en la posición 30 se indica como:

Ala30Asn o A30N

una deleción de alanina en la misma posición está mostrada como:

Ala30* o A30*

y la inserción de un residuo de aminoácido adicional, tal como la lisina, se indica como:

* 30aLys o *30aK

[0011] Una deleción de un segmento consecutivo de residuos de aminoácidos, tal como los residuos de aminoácidos 30-33, se indica como (30-33)* o Δ(A30-N33) o delta(A30-N33).

[0012] Cuando una alfa-amilasa específica contiene una "deleción" en comparación con otras alfa-amilasas y se hace una inserción en esa posición esto se indica como:

* 36aAsp o *36aD

para la inserción de un ácido aspártico en la posición 36

Las mutaciones múltiples están separadas por signos de suma, por ejemplo:

Ala30Asp + Glu34Ser o A30N+E34S

representando mutaciones en las posiciones 30 y 34 sustituyendo la alanina y el ácido glutámico por asparraguina y serina, respectivamente. Las mutaciones múltiples pueden también ser separadas como sigue, es decir, significando lo mismo que la suma:

Ala30Asp/Glu34Ser o A30N/E34S

[0013] Cuando uno o más residuos de aminoácidos alternativos pueden ser insertados en una posición esto se indica como

A30N,E o

A30N o A30E

[0014] Además, cuando una posición adecuada para la modificación está identificada en la presente sin que se haya sugerido una modificación específica, o A30X, se entenderá que cualquier residuo de aminoácido puede ser sustituido por el residuo de aminoácido presente en la posición. Así, por ejemplo, cuando se menciona una modificación de una alanina en la posición 30, pero no se especifica, o se especifica como "X", se entenderá que la alanina puede ser delecionada o sustituida por cualquier otro aminoácido, es decir, cualquier: R,N,D,C,Q,E,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V.

Descripción detallada de la invención

[0015]

Figura 1 muestra SEC ID NO:1 de WO95/26397.

Figura 2 muestra SEC ID NO:2 de WO95/26397.

Figura 3 muestra la secuencia de *Bacillus sp. #707* alfa-amilasa de Tsukamoto et al, Biochemical and Biophysical Research Communications, FSI (1988), págs. 25-31.

Alfa-amilasa tipo Termamyl

[0016] Es bien sabido que varias alfa-amilasas producidas por *Bacillus spp.* son muy homólogas a nivel aminoácido. Por ejemplo, se ha encontrado que la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4 (comercialmente disponible como Termamyl™) tiene un 89% de homología con la alfa-amilasa de *B. amiloliquefaciens* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 6 y aproximadamente un 79% de homología con la alfa-amilasa de *B. stearothermophilus* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 8. Además las alfa-amilasas homólogas incluyen una alfa-amilasa derivada de una cepa de *Bacillus sp.* NCIB 12289; NCIB 12512; NCIB 12513 o DSM 9375; todas ellas están descritas de forma detallada en WO 95/26397; y la alfa-amilasa #707 descrita por Tsukamoto et al, Biochemical and Biophysical Research Communications, 151 (1988), págs. 25-31.

[0017] Además las alfa-amilasas homólogas incluyen la alfa-amilasa producida por la cepa de *B. licheniformis* descrita en EP 0252666 (ATCC 27811), y las alfa-amilasas identificadas en WO 91/00353 y WO 94/18314. Otras alfa-amilasas comerciales tipo Termamyl de *B. licheniformis* son Optitherm™ y Takatherm™ (disponibles por Solvay), Maxamyl™ (disponible por Gist-Brocades/Genencor), Spezym AA™ y Spezyme Delta AA™ (disponible por Genencor), y Keistase™ (disponible por Daiwa).

[0018] Debido a la homología sustancial encontrada entre estas alfa-amilasas, se considera que éstas pertenecen a la misma clase de alfa-amilasas, es decir a la clase de "alfa-amilasas de tipo Termamyl".

[0019] Por consiguiente, en el presente contexto, el término "alfa-amilasa tipo Termamyl" se destina a indicar una alfa-amilasa, que a nivel aminoácido muestra una homología sustancial al Termamyl™, es decir, la alfa-amilasa de *B. licheniformis* con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4 en la presente. En otras palabras, una alfa-amilasa tipo Termamyl es una alfa-amilasa, que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4 u 8 en

la presente, y la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 1 o 2 de WO 95/26397 (ver figuras 1 y 2; respectivamente) o en Tsukamoto et al.; 1988 (ver figura 3), o i) que muestra al menos el 90%, incluso especialmente más preferido al menos el 95% de homología, más preferiblemente al menos el 97%, más preferiblemente al menos el 99% de homología con al menos una de dichas secuencias de aminoácidos.

[0020] En relación con la propiedad i), la "homología" se determina usando el programa GAP del paquete GCG versión 7.3 (Junio 1993) usando valores por defecto para penalizaciones de GAP, es decir una penalización por la creación de GAP de 3.0 y una penalización por la extensión de GAP de 0.1; (Genetic Computer Group (1991) Programme Manual for the GCG Package, version 7, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711).

[0021] Un alineamiento estructural entre Termamyl y una alfa-amilasa tipo Termamyl puede ser usado para identificar posiciones equivalentes/correspondientes en otras alfa-amilasas tipo Termamyl. Un método para obtener dicho alineamiento estructural es el uso del programa Pile Up del paquete GCG usando valores por defecto para penalizaciones de gap, es decir, una penalización por la creación de espacios de 3.0 y una penalización por la extensión de espacios de 0.1. Otros métodos de alineamiento estructural incluyen el análisis del cluster hidrofóbico (Gaboriaud et Al., (1987), FEBS LETTERS 224, pp. 149-155) y el enhebrado inverso (Huber, T ; Torda, AE, PROTEIN SCIENCE Vol. 7, No. 1 pp. 142-149 (1998).

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

Alfa-amilasas progenitoras híbridas

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

[0024] La alfa-amilasa híbrida progenitora puede ser una, que en base a la homología del aminoácido y/o a la reacción cruzada inmunológica y/o a la hibridación del ADN (tal como se ha definido anteriormente) puede ser determinada como perteneciente a la familia de la alfa-amilasa tipo Termamyl. En este caso, la alfa-amilasa híbrida está normalmente compuesta al menos por una parte de una alfa-amilasa tipo Termamyl y parte(s) de una o más alfa-amilasas seleccionadas de alfa-amilasas tipo Termamyl o alfa-amilasas no de tipo Termamyl de origen microbiano (bacteriano o fúngico) y/o mamífero.

[0025] Así, la alfa-amilasa híbrida progenitora puede comprender una combinación de secuencias de aminoácidos parciales que derivan de al menos dos alfa-amilasas tipo Termamyl, o de al menos una alfa-amilasa tipo Termamyl y al menos una alfa-amilasa bacteriana no de tipo Termamyl, o de al menos una alfa-amilasa de tipo Termamyl y al menos una alfa-amilasa fúngica. La alfa-amilasa tipo Termamyl de la cual deriva una secuencia de aminoácidos parcial puede, p. ej., ser cualquiera de estas alfa-amilasas específicas tipo Termamyl a las que se hace referencia en la presente.

[0026] Por ejemplo, la alfa-amilasa progenitora puede comprender una parte C-terminal de una alfa-amilasa derivada de una cepa de *B. licheniformis*, y una parte N-terminal de una alfa-amilasa derivada de una cepa de *B. amyloliquefaciens* o de una cepa de *B. stearrowthermophilus*.

[0027] La alfa-amilasa que no es del tipo Termamyl puede, p. ej., ser una alfa-amilasa fúngica, una alfa-amilasa mamífera o vegetal o una alfa-amilasa bacteriana (diferente de una alfa-amilasa tipo Termamyl). Ejemplos específicos de alfa-amilasas de este tipo incluyen la TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, la alfa-amilasa ácida de *A. niger*, la alfa-amilasa de *Bacillus subtilis*, la alfa-amilasa porcina pancreática y una alfa-amilasa de cebada. Todas estas alfa-amilasas tienen estructuras dilucidadas, que son marcadamente diferentes de la estructura de una alfa-amilasa tipo Termamyl típica según se ha hecho referencia en la presente.

[0028] Las alfa-amilasas fúngicas mencionadas arriba, es decir, derivadas de *A. Niger* y *A. oryzae*, son muy homólogas a nivel aminoácido y generalmente consideradas como pertenecientes a la misma familia de las alfa-amilasas. La alfa-amilasa fúngica derivada de *Aspergillus oryzae* está comercialmente disponible bajo el nombre comercial Fungamyl™.

[0029] Además, cuando se hace referencia a una variante particular de una alfa-amilasa tipo Termamyl (variante de la invención) - de una manera convencional - por referencia a la modificación (p. ej., delección o sustitución) de residuos de aminoácidos específicos en la secuencia de aminoácidos de una alfa-amilasa específica tipo Termamyl, debe entenderse que variantes de otras alfa-amilasas tipo Termamyl modificadas en la(s) posición(es) equivalente(s) (según está determinado a partir del mejor alineamiento posible de las secuencias de aminoácidos entre las secuencias de aminoácidos respectivas) están comprendidas por la presente.

[0030] Una forma de realización preferida de una variante de la invención es una derivada de una alfa-amilasa de *B. licheniformis* (como la alfa-amilasa progenitora tipo Termamyl), p. ej., una de aquellas a las que se ha hecho referencia antes, tal como la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4.

5

Construcción de variantes de la invención

[0031] La construcción de la variante de interés puede ser realizada mediante el cultivo de un microorganismo que comprende una secuencia de ADN que codifica la variante bajo condiciones que son propicias para producir la variante. La variante puede ser recuperada posteriormente del resultante caldo de cultivo. Esto será descrito con más detalle a continuación.

10

Propiedades alteradas

15

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

20

[0033] En una forma de realización preferida las variantes anteriores de la invención comprenden una mutación en una posición correspondiente al menos a una de las siguientes mutaciones en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4:

T49L, T49F, T49V, T49Y, T49I, A52S+V54N+T49L o

T49L+A52V+G107A+A111V

25

[0034] También se han descrito variantes que comprenden al menos una mutación que corresponde a las siguientes mutaciones en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4:

T49L+G107A;

30

T49I+G107A;

T49L+G107A+V54I;

T49I+G107A+V54I;

A52S+V54N+T49L+G107A;

A52S+V54I+T49L+G107A;

35

A52S+T49L+G107A;

A52T+T49L+G107A;

A52S+V54N+T49I+G107A;

A52S+V54I+T49I+G107A;A52S+T49I+G107A;

T49L+G108A;

40

T49I+G108A;

T49L+G108A+V54I;

T49I+G108A+V54I.

45

[0035] Todas las variantes de la invención mencionadas arriba tienen propiedades alteradas (lo que significa propiedades aumentadas o disminuidas), en particular al menos una de las siguientes propiedades relativa a la alfa-amilasa progenitora: capacidad reducida para disociar un sustrato cerca del punto de ramificación, especificidad de sustrato mejorada y/o actividad específica mejorada, unión del sustrato alterada, termoestabilidad alterada, perfil de pH/actividad alterado, perfil de pH/estabilidad alterado, estabilidad alterada hacia la oxidación, dependencia del Ca²⁺ alterada.

50

Estabilidad

[0036] En el contexto de la presente invención, las mutaciones (incluyendo las sustituciones y/o deleciones de aminoácidos) importantes con respecto al logro de la estabilidad, en particular la estabilidad mejorada (es decir, más alta o más baja), a un pH especialmente bajo (es decir, pH 4-6) incluyen cualquiera de las mutaciones mencionadas en la sección "propiedades alteradas", más arriba y las variantes mencionadas justo abajo.

55

[0037] Las variantes siguientes: Q360A, K; N102A, N326A,L, N190G, N190K; Y262A,K,E (usando la numeración BAN, es decir, SEC ID N: 6) fueron también evaluadas por la estabilidad del pH. Una alfa-amilasa progenitora preferida puede ser BA2 anteriormente descrita. La estabilidad del pH fue determinada como se describe en la sección "Materiales & Métodos".

5

Estabilidad de Ca²⁺

10

[0038] Una estabilidad de Ca²⁺ alterada significa que la estabilidad de la enzima bajo la depleción de Ca²⁺ ha sido mejorada, es decir, mayor o menor estabilidad. En el contexto de la presente invención, las mutaciones (incluso las sustituciones del aminoácido) importantes con respecto al logro de la estabilidad de Ca²⁺ alterada, en particular estabilidad de Ca²⁺ mejorada, es decir, mayor o menor estabilidad, a un pH especialmente bajo (es decir, pH 4-6) incluyen cualquiera de las mutaciones mencionadas en la sección "propiedades alteradas" más arriba.

15

Actividad específica

20

[0039] En otro aspecto de la presente invención, las mutaciones importantes con respecto al logro de las variantes que presentan una actividad específica alterada, en particular una actividad específica aumentada o disminuida, especialmente a temperaturas entre 60-100°C, preferiblemente 70-95°C, especialmente 80-90°C, incluyen cualquiera de las mutaciones catalogadas en la sección "propiedades alteradas" más arriba.

25

Modelo de seccionamiento alterado

30

[0041] En el proceso de la licuefacción del almidón es deseable usar una alfa-amilasa, que sea capaz de degradar las moléculas de almidón en oligosacáridos ramificados largos, más que una alfa-amilasa, dando lugar a la formación de oligosacáridos ramificados más cortos (como las alfa-amilasas tipo Termamyl convencionales). Los oligosacáridos ramificados cortos (precursores de la panosa) no son hidrolizados de manera satisfactora por las pululanases, las cuales se usan después del tratamiento de la alfa-amilasa en el proceso de licuefacción, o simultáneamente con una amiloglucosidasa de sacarificación (glucoamilasa), o antes de añadir una amiloglucosidasa de sacarificación (glucoamilasa). Así, en presencia de los precursores de panosa, la mezcla del presente producto después del tratamiento con glucoamilasa contiene una proporción significativa de la llamada dextrina límite, corta y ramificada, es decir, el trisacárido panosa. La presencia de panosa reduce el rendimiento de la sacarificación significativamente y es por lo tanto indeseable.

35

40

[0042] Se ha indicado anteriormente (patente estadounidense 5,234,823) que, durante la sacarificación con glucoamilasa y pululanasa, la presencia de actividad alfa-amilasa residual que surge del proceso de licuefacción, puede llevar a rendimientos más bajos de glucosa, si la alfa-amilasa no es inactivada antes de la fase de sacarificación. Esta inactivación puede ser normalmente realizada ajustando el pH por debajo de 4.7 a 95°C, antes de reducir la temperatura a 60°C para la sacarificación.

45

[0043] La razón de este efecto negativo en el rendimiento de la glucosa no está completamente entendido, pero se asume que la alfa-amilasa licuefactante (por ejemplo Termamyl 120 L de *B. licheniformis*) genera "dextrinas límites" (que son sustratos pobres en pululanasa), mediante la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa-glucosídicos cerca y en ambos lados de los puntos de ramificación en la amilopectina. Las hidrólisis de estas dextrinas límite por la glucoamilasa conduce a una generación del trisacárido panosa, que es sólo lentamente hidrolizado por la glucoamilasa.

50

[0044] El desarrollo de una alfa-amilasa termoestable, que no tenga esta desventaja, sería una mejora significativa, puesto que no se requeriría una inactivación por separado.

55

[0045] Así, el objetivo de la presente invención es conseguir una alfa-amilasa mutante con características de degradación del almidón modificadas de forma apropiada pero que conserve la termostabilidad de la alfa-amilasa progenitora tipo Termamyl.

60

[0046] Por consiguiente, la invención se refiere a una variante de una alfa-amilasa tipo Termamyl, con una capacidad reducida mejorada para disociar un sustrato cerca del punto de ramificación, y que además tiene especificidad de sustrato mejorada y/o actividad específica mejorada.

65

[0047] Es de particular interés una variante, que secciona un sustrato de amilopectina, desde el extremo reductor, más de una unidad de glucosa desde el punto de ramificación, preferiblemente más de dos o tres unidades de glucosa desde el punto de ramificación, es decir, a más distancia desde el punto de ramificación que aquella que se obtiene usando una alfa-amilasa de *B. licheniformis* de tipo salvaje.

[0048] Se puede mencionar aquí que según WO 96/23874, se prevén variantes que comprenden al menos una de las siguientes mutaciones para prevenir un seccionamiento cerca del punto de ramificación:

V54L, I, F, Y, W, R, K, H, E, Q;
 D53L, I, F, Y, W;
 Y56W;
 Q333W;

5 G57, todos los residuos de aminoácidos posibles;
 A52, residuos de aminoácidos más grandes que A, p. ej., A52W, Y, L, F, I.

10 [0049] Las mutaciones de interés particular en relación con la obtención de variantes según la invención con una capacidad reducida mejorada para seccionar un sustrato cerca del punto de ramificación, y teniendo además una especificidad de sustrato mejorada y/o una actividad específica mejorada, incluyen las mutaciones en las siguientes posiciones en la alfa-amilasa *B. licheniformis*, SEC ID NO: 4:
 H156;A181;N190;A209;Q264 y I201.

15 [0050] También, la alfa-amilasa de *B. licheniformis* mostrada en la SEC ID NO: 4 que comprende una o más de las siguientes mutaciones puede ser usada como esqueleto (usando la SEC ID NO: 4 para la numeración de las mutaciones):

E119C;
 S130C;
 D124C;
 R127C;

20 A52 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular;
 S85 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular;
 N96 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular;
 V129 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular;
 25 A269 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular;
 A378 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular;
 S148 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular S148N;
 E211 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular E211Q;
 N188 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular N188S, N188P M197 todos los residuos de aminoácidos
 30 posibles, en particular M197T, M197A, M197G, M197I, M197L, M197Y, M197F, M197I;
 W138 all possible amino acid residues, in particular W138Y;
 D207 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular D207Y;
 H133 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular H133Y;
 H205 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular H205H, H205C, H205R;
 35 S187 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular S187D;
 A210 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular A210S, A210T;
 H405 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular H405D;
 K176 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular K176R;
 F279 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular F279Y;
 40 Q298 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular Q298H;
 G299 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular G299R;
 L308 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular L308F;
 T412 todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular T412A;

45 [0051] Además, la alfa-amilasa de *B. licheniformis* mostrada en la SEC ID NO: 4 comprendiendo al menos una de las siguientes mutaciones puede ser usada como esqueleto:
 M15 todos los residuos de aminoácidos posibles;
 A33 todos los residuos de aminoácidos posibles;

50 [0052] En una forma de realización preferida una variante de la invención comprende al menos una mutación en una posición correspondiente a las mutaciones siguientes en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4:

T49L, A52S+V54N+T49L; or

T49V, T49I, T49Y, T49F.

[0053] En una forma de realización preferida una variante de la invención comprende al menos una mutación en una posición correspondiente a las siguientes mutaciones en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4:

5

T49L+G107A;

T49I+G107A;

T49L+G107A+V54I;

T49I+G107A+V54I;

10 A52S+V54N+T49L+G107A;

A52S+V54I+T49L+G107A;

A52S+T49L+G107A;

A52T+T49L+G107A;

A52S+V54N+T49I+G107A;

15 A52S+V54I+T49I+G107A;

A52S+T49I+G107A;

T49L+G108A;

T49I+G108A;

20 T49L+G108A+V54I;

T49I+G108A+V54I.

Mutaciones generales en variantes de la invención

25 [0054] Puede ser preferido que una variante de la invención comprenda una o más modificaciones además de las perfiladas arriba. Así, puede ser ventajoso que uno o más residuos de prolina presente(s) en la parte de la variante de la alfa-amilasa que es modificada sea/sean sustituido(s) con un residuo que no sea de prolina que puede ser cualquiera de los posibles residuos de origen natural que no sean de prolina, y que preferiblemente sea una alanina, glicina, serina, treonina, valina o leucina.

30

[0055] Análogamente, puede ser preferido que uno o más residuos de cisteína presentes entre los residuos de aminoácidos con los cuales la alfa-amilasa progenitora es modificada sea/sean sustituido(s) con un residuo que no sea de cisteína tal como serina, alanina, treonina, glicina, valina o leucina.

35 [0056] Además, una variante de la invención puede - en combinación con cualquiera de las modificaciones perfiladas arriba - ser modificada de modo que uno o más Asp y/o Glu presente en un fragmento del aminoácido correspondiente al fragmento del aminoácido 185-209 de la SEC ID n°. 4 sea sustituido por Asn y/o Gln, respectivamente. También es de interés la sustitución, en la alfa-amilasa de tipo Termamyl, de uno o más de los residuos de Lys presentes en un fragmento e aminoácido correspondiente al fragmento de aminoácido 185-209 de la SEC ID NO: 4 por un Arg.

40

[0057] Será entendido que la presente invención comprende variantes que incorporan dos o más de las modificaciones perfiladas arriba.

45 [0058] Además, puede ser ventajoso introducir mutaciones puntuales en cualquiera de las variantes descritas en la presente.

Métodos para preparar variantes de la alfa-amilasa

50 [0059] Diferentes métodos para introducir mutaciones en genes son conocidos en la técnica. Después de una breve discusión sobre la clonación de secuencias de ADN que codifican la alfa-amilasa, se discutirán unos métodos para generar mutaciones en sitios específicos dentro de la secuencia de codificación de la alfa-amilasa.

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

55 [0060] La secuencia de ADN codificadora de una alfa-amilasa progenitora puede ser aislada de cualquier célula o microorganismo que produzca la alfa-amilasa en cuestión, usando varios métodos bien conocidos en la técnica. En primer lugar, se debería construir una biblioteca de ADN genómico y/o de ADNc usando ADN cromosómico o ARN

mensajero del organismo productor de la alfa-amilasa que debe ser estudiada. Después, si la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa es conocida, se pueden sintetizar sondas de oligonucleótidos homólogas y marcadas y se pueden utilizar para identificar clones codificadores de la alfa-amilasa de una biblioteca genómica preparada a partir del organismo en cuestión. De forma alternativa, una sonda de oligonucleótidos marcada conteniendo secuencias homólogas a un gen de alfa-amilasa conocido podría ser usada como una sonda para identificar clones codificadores de la alfa-amilasa, usando condiciones de hibridación y de lavado de astringencia más bajas.

[0061] Otro método para identificar clones codificadores de la alfa-amilasa implican la inserción de fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, la transformación de bacterias alfa-amilasa-negativas con la resultante biblioteca de ADN genómico, y después la colocación en placas de las bacterias transformadas en agar conteniendo un sustrato para alfa-amilasa, de ese modo permitiendo identificar los clones que codifican la alfa-amilasa.

[0062] De forma alternativa, la secuencia de ADN codificadora de la enzima puede ser preparada sintéticamente por métodos estándar, p. ej., el método de la fosforamidita descrito por S.L. Beaucage y M.H. Caruthers (1981) o el método descrito por Mattes et al. (1984). En el método de la fosforamidita, los oligonucleótidos son sintetizados, p. ej., en un sintetizador de ADN automático, purificados, anillados, ligados y clonados en los vectores apropiados.

[0063] Finalmente, la secuencia de ADN puede ser de origen mezclado genómico y sintético, de origen mezclado sintético y de ADNc o de origen mezclado genómico y de ADNc, preparado ligando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (si fuera apropiado, los fragmentos correspondientes a varias partes de la secuencia de ADN entera), de acuerdo con las técnicas estándar. La secuencia de ADN puede también ser preparada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4,683,202 o R.K. Saiki et al. (1988).

Mutagénesis sitio dirigida

[0064] Una vez que una secuencia de ADN codificadora de la alfa-amilasa haya sido aislada, y que se hayan identificado los sitios deseables para la mutación, se pueden introducir mutaciones usando los oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios para la mutación deseados; los nucleótidos mutantes son insertados durante la síntesis de los oligonucleótidos. En un método específico, un espacio monocatenario de ADN, que conecta la secuencia codificadora de la alfa-amilasa, es creado en un vector que transporta el gen de la alfa-amilasa. A continuación el nucleótido sintético, que contiene la mutación deseada, es anillado hasta una parte homóloga del ADN monocatenario. El espacio restante es luego rellenado con ADN polimerasa I (fragmento Klenow) y el constructo es ligado usando T4 ligasa. Un ejemplo específico de este método está descrito en Morinaga et al. (1984). US 4,760,025 describe la introducción de oligonucleótidos que codifican las mutaciones múltiples mediante la realización de alteraciones mínimas del casete. No obstante, una variedad incluso superior de mutaciones puede ser introducida en cualquier momento por el método de Morinaga, ya que se puede introducir una multitud de oligonucleótidos de varias longitudes.

[0065] Otro método para introducir mutaciones en las secuencias de ADN codificadoras de la alfa-amilasa está descrito en Nelson y Long (1989). Implica la generación en 3 fases 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 la PCR. A partir del fragmento generado por reacción en cadena de la polimerasa, un fragmento de ADN que transporta la mutación puede ser aislado por el seccionamiento con endonucleasas de restricción y reinsertados en un plásmido de expresión.

Mutagénesis aleatoria

[0066] La mutagénesis aleatoria se realiza de manera adecuada bien como una mutagénesis aleatoria localizada o región-específica en al menos tres partes del gen que traduce la secuencia de aminoácidos mostrada en cuestión, o dentro del gen entero.

[0067] La mutagénesis aleatoria de una secuencia de ADN que codifica una alfa-amilasa progenitora puede ser convenientemente realizada usando cualquier método conocido en la técnica.

[0068] En relación con lo anterior, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para generar una variante de una alfa-amilasa progenitora, p. ej., donde la variante muestra una capacidad reducida de seccionamiento de un sustrato oligosacárido cerca del punto de ramificación, y además presenta especificidad de sustrato mejorada y/o una actividad específica mejorada con respecto al progenitor, el método:

(a) sometiendo una secuencia de ADN codificadora de la alfa-amilasa progenitora a una mutagénesis aleatoria, (b) expresando la secuencia de ADN mutada obtenida en la fase (a) en una célula huésped, y (c) seleccionando las células huéspedes que expresan una variante de la alfa-amilasa con una propiedad alterada (es decir, termoestabilidad) con respecto a la alfa-amilasa progenitora

[0069] La fase (a) del método anterior de la invención es preferiblemente realizado usando 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, aleatorizaciones, deleciones, y/o inserciones.

5 [0070] Ejemplos de un agente mutagenizante físico o químico adecuado para este propósito incluyen la irradiación ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), O-metil hidroxilamina, ácido nitroso, etil metano sulfonato (EMS), bisulfito de sodio, ácido fórmico, y análogos nucleótidos. Cuando estos agentes son usados, la mutagénesis es normalmente realizada incubando la secuencia de ADN que codifica la enzima progenitora que debe ser mutagenizada en presencia del agente mutagenizante de elección bajo condiciones adecuadas para que ocurra la mutagénesis, y seleccionando el ADN mutado que tenga las propiedades deseadas. Cuando la mutagénesis se realiza por el uso de un oligonucleótido, el oligonucleótido puede ser dopado o adicionado con los tres nucleótidos no progenitores durante la síntesis del oligonucleótido en las posiciones que deben ser cambiadas. El dopaje o adicionado puede hacerse de modo que se eviten los codones para los aminoácidos indeseados. El oligonucleótido dopado o adicionado puede ser incorporado en el ADN que codifica la enzima alfa-amilasa mediante cualquier técnica publicada, usando p. ej., PCR, LCR o cualquier ADN-polimerasa y ligasa según se considere apropiado. Preferiblemente, el dopaje se realiza usando un "dopaje aleatorio constante", donde el porcentaje de tipo salvaje y mutación en cada posición está predefinido. Además, el dopaje puede estar dirigido hacia una preferencia para introducir ciertos nucleótidos, y por tanto hacia una preferencia para introducir uno o más residuos de aminoácidos específicos. El dopaje puede hacerse, p. ej., para permitir la introducción del 90% de tipo salvaje y el 10% de mutaciones en cada posición. Una consideración adicional para la elección de un esquema de dopaje se basa en la genética así como en las limitaciones estructurales de las proteínas. El esquema del dopaje puede hacerse usando el programa DOPE, que, entre otras cosas, asegura que se evita la introducción de codones de parada. Cuando se utiliza la mutagénesis generada por PCR, bien un gen tratado o no tratado químicamente que codifica una alfa-amilasa progenitora es sometido a PCR bajo condiciones que aumentan la desincorporación de nucleótidos (Deshler 1992; Leung et al., Technique, Vol.1, 1989, pp. 11-15). Una cepa mutágena de *E. coli* (Fowler et al., Molec. Gen. Genet.; 133, 1974; págs. 179-191), *S. cerevisiae* o cualquier otro organismo microbiano puede ser usada para la mutagénesis aleatoria del ADN que codifica la alfa-amilasa por, p. ej., transformando un plásmido que contenga la glicosilasa progenitora en la cepa mutágena, haciendo crecer la cepa mutágena con el plásmido y aislando el plásmido mutado de la cepa mutágena. El plásmido mutado puede ser posteriormente transformado en el organismo de expresión. La secuencia de ADN para ser mutagenizada puede estar convenientemente presente en una biblioteca genómica o de ADNc obtenida a partir de un organismo que expresa la alfa-amilasa progenitora. De forma alternativa, 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, por el contrario, puede ser expuesto al agente mutagenizante. El ADN que debe ser mutagenizado puede también estar presente en una célula huésped bien estando integrado en el genoma de dicha célula o estando presente en un vector contenido 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 de ADNc o de ADN genómico. En algunos casos puede ser conveniente el hecho de amplificar la secuencia de ADN mutada antes de realizar la fase de expresión b) o la fase de selección c). Tal amplificación puede ser realizada de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica, el método actualmente preferido es la amplificación generada por PCR usando cebadores oligonucleótidos preparados en base a la secuencia de ADN o secuencia de aminoácidos de la enzima madre. Después de la incubación con o exposición al agente mutagenizante, el ADN mutado es expresado mediante el cultivo de una célula huésped adecuada que transporta la secuencia de ADN bajo condiciones que permiten que la expresión tenga lugar. La célula huésped usada para este propósito puede ser una que haya sido transformada con la secuencia de ADN mutada, opcionalmente presente en un vector, o una que fuera transportada por la secuencia de ADN codificadora de la enzima madre durante el tratamiento por mutagénesis. Ejemplos de células huéspedes adecuadas son las siguientes: bacterias gram positivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; y bacterias gram-negativas tales como *E. coli*. 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.

Mutagénesis aleatoria localizada

55 [0071] La mutagénesis aleatoria puede estar ventajosamente localizada en una parte de la alfa-amilasa progenitora en cuestión. Esto puede, p. ej., ser ventajoso cuando ciertas regiones de la enzima han sido identificadas por ser de importancia particular para una propiedad dada de la enzima, y cuando se modifican se prevé que resulten en una variante con propiedades mejoradas. Tales regiones pueden normalmente ser identificadas cuando la estructura terciaria de la enzima madre ha sido dilucidada y relacionada con la función de la enzima.

60 [0072] La mutagénesis aleatoria localizada, o, región-específica se realiza convenientemente usando técnicas de mutagénesis generada por PCR según el modo descrito anteriormente o cualquier otra técnica adecuada conocida en la técnica. De forma alternativa, la secuencia de ADN que codifica la parte de la secuencia de ADN que debe ser modificada puede ser aislada, p. ej., 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 para proporcionar variantes de la alfa-amilasa

[0073] Los métodos alternativos para proporcionar variantes de la invención incluyen el método de redistribución de genes conocido en la técnica incluyendo p. ej. los métodos, descritos en WO 95/22625 (de Affymax Technologies N.V.) y WO 96/00343 (de Novo Nordisk A/S).

Expresión de variantes de la alfa-amilasa

[0074] Según la invención, una secuencia de ADN que codifica la variante producida por los métodos descritos anteriormente, 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 del ribosoma, señal de iniciación de la traducción, y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores.

[0075] El vector de expresión recombinante que transporta la secuencia de ADN que codifica una variante de la alfa-amilasa de la invención puede ser cualquier vector, que puede convenientemente ser sometido 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. De forma alternativa, el vector puede ser uno que, al introducirse en una célula huésped, se integre en el genoma de la célula huésped y se replique con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se haya integrado.

[0076] En el vector, la secuencia de ADN debería ser operativamente conectada a una secuencia del promotor adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN, que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede derivar de proteínas codificadoras de genes bien homólogas o heterólogas a la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN codificadora de una variante de alfa-amilasa de la invención, especialmente en un huésped bacteriano, son el promotor del operón *lac* de *E. coli*, los promotores del gen de la agarasa *dagA* de *Streptomyces coelicolor*, los promotores del gen de la alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, los promotores del gen de la amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, los promotores de la alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, los promotores de los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis* etc. para la transcripción en un huésped fúngico, ejemplos de promotores útiles son aquellos derivados del gen que codifica la TAKA amilasa de *A. oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la alfa-amilasa neutra de *A. niger*, la alfa-amilasa estable en ácido de *A. niger*, la glucoamilasa *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*.

[0077] El vector de expresión de la invención puede comprender también un terminador de la transcripción adecuado y, en eucariotas, secuencias de poliadenilación operativamente conectadas a la secuencia de ADN que codifica la variante de la alfa-amilasa de la invención. Las secuencias de terminación y de poliadenilación pueden de manera adecuada derivar de las mismas fuentes que el promotor.

[0078] El vector puede además comprender una secuencia de ADN que permita que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de secuencias de este tipo son los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

[0079] El vector puede también comprender un marcador seleccionable, p. ej., un gen cuyo producto implementa una carencia en la célula huésped, tal como los genes *dal* de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, o uno que confiera resistencia a los antibióticos tal como resistencia a la ampicilina, canamicina, cloranfenicol o a la tetraciclina. Además, el vector puede comprender marcadores de la selección de *Aspergillus* tales como *amdS*, *argB*, *niaD* y *sC*, un marcador que de lugar a la resistencia a la higromicina, o la selección puede ser realizada por cotransformación, p. ej., como se describe en WO 91/17243.

[0080] Mientras que la expresión intracelular puede ser ventajosa en algunos aspectos, p. ej., cuando se usan ciertas bacterias como las células huéspedes, es generalmente preferido que la expresión sea extracelular. En general, las alfa-amilasas de *Bacillus* mencionadas aquí comprenden una prerregión que permite la secreción de la proteasa expresada en el medio de cultivo. Si fuera deseable, esta prerregión puede ser sustituida por una prerregión diferente o una secuencia señal, convenientemente realizada por la sustitución de las secuencias de ADN que codifican las prerregiones respectivas.

[0081] Los procedimientos usados para ligar el constructo de ADN de la invención que codifica una variante de alfa-amilasa, el promotor, terminador y otros elementos, respectivamente, y para insertarlos en los vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook et Al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989).

[0082] La célula de la invención, que comprende sea un constructo de ADN o sea un vector de expresión de la invención tal como se ha definido anteriormente, se utiliza ventajosamente como una célula huésped para la producción recombinante de una variante de alfa-amilasa de la invención. La célula puede ser transformada con el constructo de ADN de la invención que codifica la variante, integrando convenientemente el constructo de ADN (en una o más copias) en el cromosoma huésped. Esta integración está generalmente considerada como una ventaja puesto que la secuencia de ADN tiene más probabilidad de ser mantenida de manera estable en la célula. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped puede ser realizada según métodos convencionales, p. ej., por recombinación homóloga o heteróloga. De forma alternativa, la célula puede ser transformada con un vector de expresión según el modo descrito anteriormente en relación con los diferentes tipos de células huéspedes.

[0083] La célula de la invención puede ser una célula de un organismo mayor tal como un mamífero o un insecto, pero es preferiblemente una célula microbiana, p. ej., una célula bacteriana o fúngica (incluida la levadura).

[0084] Ejemplos de bacterias adecuadas son bacterias gram-positivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, o *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas tales como *E.coli*. La transformación de las bacterias puede, por ejemplo, efectuarse mediante la transformación del protoplasto o usando células competentes según cierto modo conocido per se.

[0085] El organismo de la levadura puede ser seleccionado de forma favorable de unas especies de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*. El hongo filamentoso puede ventajosamente ser una especie de *Aspergillus*, p. ej., *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus Niger*. Las células micóticas pueden ser transformadas por un proceso que implica la formación del protoplasto y la transformación de los protoplastos seguido de la regeneración de la pared celular en cierto modo conocido per se. Un procedimiento adecuado para la transformación de células huéspedes de *Aspergillus* está descrito en EP 238 023.

[0086] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una variante de la alfa-amilasa de la invención, dicho método comprende el cultivo de una célula huésped según el modo descrito anteriormente bajo las condiciones propicias para la producción de la variante y la recuperación de la variante de las células y/o del medio de cultivo.

[0087] El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para hacer crecer la célula huésped en cuestión y obtener la expresión de la variante de la alfa-amilasa de la invención. Los medios adecuados están disponibles por proveedores comerciales o pueden ser preparados según las recetas publicadas (p. ej., como se describe en catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo).

[0088] La variante de la alfa-amilasa segregada a partir de las células huéspedes puede convenientemente ser recuperada del medio de cultivo por procedimientos bien conocidos, incluyendo la separación de las células del medio por centrifugado o filtración, y la precipitación de componentes proteínicos del medio mediante una sal tal como sulfato de amonio, seguido del uso de procedimientos cromatográficos tal como la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, o similar.

Aplicaciones industriales

[0089] Las variantes de la alfa-amilasa de esta invención poseen propiedades valiosas que permiten una variedad de aplicaciones industriales. En particular, variantes enzimáticas de la invención son aplicables como un componente para composiciones de detergentes para el lavado, para lavavajillas y para la limpieza de superficies duras. Numerosas variantes son particularmente útiles en la producción de edulcorantes y etanol, p. ej., etanol para combustible, para bebidas o industrial, a partir de almidón, y/o para el desecolado textil. Las condiciones para los procesos de conversión del almidón convencionales, incluyendo la licuefacción del almidón y/o procesos de sacarificación, están descritos en, p. ej., 3,912,590 y en las publicaciones de patentes EP Nos. 252 730 y 63 909.

Producción de edulcorantes a partir de almidón:

[0090] Un proceso "tradicional" para la conversión de almidón en jarabes de fructosa normalmente consiste en tres procesos consecutivos enzimáticos, es decir, un proceso de licuefacción seguido de un proceso de sacarificación y un proceso de isomerización. Durante el proceso de licuefacción, el almidón es degradado en dextrinas por una alfa-amilasa (p. ej., TermamylTM) 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 la estabilidad enzimática bajo estas condiciones; se añade 1 mM de calcio (40 ppm de iones de calcio libre).

[0091] Después del proceso de licuefacción las dextrinas son convertidas en dextrosa mediante la adición de una glucoamilasa (p. ej., AMGTM) y una enzima desramificante, tal como una isoamilasa o una pululanasa (p. ej., PromozymeTM). Antes de esta fase el pH es reducido a un valor inferior a 4.5, manteniendo la temperatura elevada (por

encima de 95°C), y la actividad licuefactante de la alfa-amilasa es desnaturalizada. La temperatura es reducida a 60°C, y se añaden la enzima glucoamilasa y la desramificante. El proceso de sacarificación continua durante 24-72 horas.

5 [0092] Después del proceso de sacarificación el pH es aumentado a un valor en la gama de 6-8, preferiblemente pH 7.5, y el calcio se elimina por intercambio iónico. El jarabe de dextrosa es luego convertido en jarabe rico en fructosa usando, p. ej., una glucosaisomerasa inmovilizada (tal como Sweetzyme™).

10 [0093] Al menos una mejora enzimática de este proceso podría ser prevista: reducción de la dependencia del calcio de la alfa-amilasa licuefactante. Se requiere la adición de calcio libre para asegurar una estabilidad adecuadamente alta de la alfa-amilasa, pero el calcio libre inhibe fuertemente la actividad de la glucosaisomerasa y necesita ser eliminado, mediante una operación individual cara, hasta el punto de reducir el nivel de calcio libre por debajo de 3-5 ppm. Se podrían obtener ahorros en el coste si esta operación pudiera ser evitada y el proceso de licuefacción fuera realizado sin la adición de iones de calcio libre.

15 [0094] Para conseguirlo, se requiere una alfa-amilasa menos calcio-dependiente del tipo Termamyl que sea estable y muy activa a concentraciones bajas de calcio libre (< 40 ppm). Tal alfa-amilasa tipo Termamyl debería tener un pH óptimo a un pH en la gama de 4.5-6.5, preferiblemente en la gama de 4.5-5.5.

20 [0095] La invención también se refiere a una composición que comprende una mezcla de una o más variantes de la invención derivadas de (igual que la alfa-amilasa progenitora tipo Termamyl) la alfa-amilasa de *B. stearrowthermophilus* que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 8 y una alfa-amilasa tipo Termamyl derivada de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 4.

25 [0096] Una variante de la alfa-amilasa de la invención o una composición de la invención puede en cierto aspecto de la invención ser usada para la licuefacción del almidón, en una composición de detergente, como composiciones para el lavado de la ropa, de la vajilla y para la limpieza de superficies duras, para la producción de etanol, como la producción de etanol para combustible, para bebidas e industrial, para el descolado textil, de tejidos y prendas.

30 MATERIALES Y MÉTODOS

Enzimas:

LE174: variante de la alfa-amilasa híbrida:

35 [0097] LE174 es una alfa-amilasa tipo Termamyl híbrida que es idéntica a la secuencia de Termamyl, es decir, la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en la SEC ID NO: 4, a excepción de que los 35 residuos de los aminoácidos N-terminales (de la proteína madura) han sido sustituidos por los 33 residuos de BAN N-terminales (proteína madura), es decir, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la SEC ID NO: 6, que además tiene las mutaciones siguientes:

40 H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S (SEC ID NO: 4).

LE429 variante de la alfa-amilasa híbrida:

45 [0098] LE429 es una alfa-amilasa tipo Termamyl híbrida que es idéntica a la secuencia de Termamyl, es decir, la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en la SEC ID NO: 4, a excepción de que los 35 residuos de los aminoácidos N-terminales (de la proteína madura) han sido sustituidos por los 33 residuos de BAN N-terminales (proteína madura), es decir, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la SEC ID NO: 6, que además tiene las mutaciones siguientes: H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+I201F (SEC ID NO: 4). LE429 está mostrada como la SEC ID NO: 2 y fue construida por SOE-PCR (Higuchi et al. 1988, Nucleic Acids Research 16:7351).

50 [0099] Dextrozyme™ E: una mezcla equilibrada de glucoamilasa (AMG) y pululanasa obtenible a partir de cepas seleccionadas de *Aspergillus Niger* y *Bacillus deramificans* (disponible por Novo Nordisk A/S)

Fermentación y purificación de variantes de la alfa-amilasa

55 [0100] Una cepa de *B. subtilis* que alberga el plásmido de expresión pertinente es alineada en una placa de LB-agar con 10 micro g/ml de canamicina de stock a -80°C, y se deja crecer durante toda la noche a 37°C.

[0101] Las colonias son transferidas a 100 ml de medios de BPX suplementados con 10 micro g/ml de canamicina en un matraz de agitación de 500 ml.

Composición de medio de BPX :

Almidón de patata	100 g/l
Harina de cebada	50 g/l
BAN 5000 SKB	0.1 g/l
Caseinato sódico	10 g/l
Harina de soja	20 g/l
Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	9 g/l

Pluronic™ 0.1 g/l

[0102] El cultivo se agita a 37°C a 270 rpm durante 5 días.

5 [0103] Las células y el detrito celular son eliminados del caldo de fermentación por centrifugado a 4500 rpm en 20-25 minutos. Después el sobrenadante es filtrado para obtener una solución completamente clara. El producto filtrado es concentrado y lavado en un filtro UF (membrana con 10000 cortes) y el tampón es cambiado a 20mM de acetato a pH 5.5. El producto filtrado de UF es aplicado en una S-Sepharose F.F. y la elución se realiza por fases con 0.2M de NaCl en el mismo tampón. El eluato es dializado contra 10mM de Tris, pH 9.0 y aplicado en una Q-Sepharose F.F. y eluido con un gradiente lineal de 0-0.3M de NaCl por 6 volúmenes de columna. Las fracciones que contienen la actividad (medida por el ensayo de Phadebas) son agrupadas, el pH fue ajustado a pH 7.5 y el color restante fue eliminado por un tratamiento con 0.5% P/vol. de carbón activo en 5 minutos.

Determinación de la actividad - (KNU)

15 [0104] Una Unidad Kilo de alfa-amilasa (1 KNU) es la cantidad de enzima que rompe 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 basándose en la condición siguiente:

Sustrato	almidón soluble
Contenido de calcio en solvente	0.0043 M
Tiempo de reacción	7-20 minutos
Temperatura	37°C
pH	5.6

20 [0105] La descripción detallada del método analítico de Novo Nordisk (AF 9) está disponible bajo petición.

Ensayo para la actividad alfa-amilasa

25 [0106] La actividad alfa-amilasa está determinada por un método que utiliza comprimidos de Phadebas® como sustrato. Los comprimidos de Phadebas (Test de Amilasa de Phadebas®, suministrado por Pharmacia Diagnostic) contiene un polímero de almidón de color azul insoluble reticulado, que ha sido mezclado con albúmina de suero bovino y una sustancia tampón y dispuesto en comprimidos.

30 [0107] Para cada medición individual un comprimido es suspendido en un tubo que contiene 5 ml de tampón Britton-Robinson 50 mM (50 mM de ácido acético; 50 mM de ácido fosfórico; 50 mM de ácido bórico; 0.1 mM de CaCl₂, pH ajustado al valor de interés con NaOH). La prueba se realiza al baño maría a la temperatura de interés. La alfa-amilasa que debe evaluarse es diluida en x ml de tampón Britton-Robinson 50 mM. 1 ml de esta solución de alfa-amilasa se añade a los 5 ml de tampón Britton-Robinson 50 mM. El almidón es hidrolizado por la alfa-amilasa dando fragmentos azules solubles. La absorbencia de la solución azul resultante, medida espectrofotométricamente a 620 nm, es una función de la actividad de la alfa-amilasa.

35 [0108] Es importante que la absorbencia de 620 nm medida después de 10 o 15 minutos de incubación (tiempo de testado) esté en la gama de 0.2 a 2.0 unidades de absorbencia a 620 nm. En este rango de absorbencia hay linealidad entre actividad y absorbencia (ley de Lambert-Beer). La dilución de la enzima debe en consecuencia ser ajustada para cumplir este criterio. Bajo un grupo específico de condiciones (temp., pH, tiempo de reacción, condiciones del tampón) 1 mg de una alfa-amilasa dada hidrolizará una cantidad determinada de sustrato y un color azul será producido. La intensidad del color es medida a 620 nm. La absorbencia medida es directamente proporcional a la actividad específica (actividad/mg de proteína de la alfa-amilasa pura) de la alfa-amilasa en cuestión según el grupo de condiciones dado.

45 **Determinación de la actividad específica**

[0109] La actividad específica se determina usando el ensayo de Phadebas (Pharmacia) como actividad/mg de enzima.

Medición del perfil de actividad del pH (estabilidad del pH)

50 [0110] La variante es almacenada en 20 mM de Tris pH 7.5, 0.1 mM, CaCl₂ y evaluada a 30°C; 50 mM de Britton-Robinson; 0.1 mM de CaCl₂. La actividad del pH es medida a pH 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 7.0, 8.0, 9.5, 9.5, 10; y 10.5; usando el ensayo Phadebas anteriormente descrito.

55 **Determinación de la actividad de AGU y como AGU/mg**

[0111] Una unidad Novo de amiloglucosidasa (AGU) se define como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto a 37°C y pH 4.3. Una descripción detallada del método analítico (AEL-SM-0131) está disponible bajo petición por Novo Nordisk.

60

[0112] La actividad está determinada como AGU/ml por un método modificado después de (AEL-SM-0131) usando el kit Glucose GOD-Perid de Boehringer Mannheim; 124036. Estándar: AMG estándar, lote 7-1195, 195 AGU/ml.

5 [0113] 375 microL de sustrato (maltosa al 1 % en 50 mM de acetato sódico, pH 4.3) es incubado 5 minutos a 37°C. Se añaden 25 microL de enzima diluidos en acetato sódico. La reacción es detenida después de 10 minutos añadiendo 100 microL de NaOH 0.25 M. 20 microL son transferidos a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se añaden 200 microL de solución GOD-Perid. Después de 30 minutos a la temperatura ambiente, la absorbencia es medida a 650 nm y la actividad calculada en AGU/ml a partir del ANG estándar.

10 [0114] La actividad específica en AGU/mg es luego calculada a partir de la actividad (AGU/ml) dividida con la concentración proteínica (mg/ml).

EJEMPLOS

15 EJEMPLO 1 (ejemplo referencial)

Construcción de variantes de Termamyl según la invención

[0115] Termamyl (alfa-amilasa de *B. licheniformis* de la SEC ID NO: 4) es expresada en *B. subtilis* a partir de un plásmido denominado pDN1528. Este plásmido contiene el gen completo que codifica Termamyl, *amyL*, cuya expresión es dirigida por su propio promotor. Además, el plásmido contiene el origen de replicación, *ori*, del plásmido pUB110 y el gen *cat* del plásmido pC194 lo que confiere resistencia al cloranfenicol. pDN1528 está mostrado en la Fig. 9 de WO 96/23874. Se preparó un vector específico de la mutagénesis conteniendo una mayor parte de la región de codificación de la SEC ID NO: 3. Las características más importantes de este vector, denominado pJeEN1, incluyen un origen de replicación derivado de los plásmidos pUC, el gen *cat* que confiere resistencia al cloranfenicol, y una versión conteniendo un desplazamiento del marco de lectura del gen *bla*, cuyo tipo salvaje normalmente confiere resistencia a la ampicilina (fenotipo *amp^R*). Esta versión mutada resulta en un fenotipo *amp*. El plásmido pJeEN1 está mostrado en la Fig. 10 de WO 96/23874, y el origen de replicación de *E. coli*, *ori*, *bla*, *cat*, la versión truncada en 5' del gen de la amilasa de Termamyl y sitios de restricción seleccionados están indicados en el plásmido.

30 [0116] Se introducen mutaciones en *amyL* por el método descrito por Deng y Nickoloff (1992, *Anal. Biochem.* 200, págs. 81-88) a excepción de que los plásmidos con el "cebador de selección" (cebador #6616; ver más abajo) incorporados están seleccionados en base al fenotipo *amp^R* de células transformadas de *E. coli* que contienen un plásmido con un gen *bla* reparado, en vez de utilizar la selección por digestión de la enzima de restricción perfilada por Deng y Nickoloff. Los productos químicos y enzimas usados para la mutagénesis fueron obtenidos a partir del kit de mutagénesis Chameleon[®] de Stratagene (número de fabricación 200509).

[0117] Después de la verificación de la secuencia de ADN en los plásmidos variantes, el gen truncado, conteniendo la alteración deseada, es subclonado en pDN1528 como un fragmento PstI-EcoRI y transformado en la cepa SHA273 pobre en proteasa y amilasa de *Bacillus subtilis* (descrita en WO92/11357 y WO95/10603) para expresar la enzima variante.

[0118] La variante de Termamyl V54W fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5' a 3', de izquierda a derecha):
PG GTC GTA GGC ACC GTA GCC CCA ATC CGC TTG (SEC ID NO: 9)

45 [0119] La variante de Termamyl A52W + V54W fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5' a 3', de izquierda a derecha):
PG GTC GTA GGC ACC GTA GCC CCA ATC CCA TTG GCT CG (SEC ID NO: 10)
Cebador #6616 (escrito 5' a 3', de izquierda a derecha; P se refiere a un 5' fosfato):
50 P CTG TGA CTG GTG AGT ACT CAA CCA AGT C (SEC ID NO: 11)

[0120] La variante de Termamyl V54E fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):
55 PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCC TCA TCC GCT TG (SEC ID NO: 12)

[0121] La variante de Termamyl V54M fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):
PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCC ATA TCC GCT TG (SEC ID NO: 13)

60 [0122] La variante de Termamyl V54I fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):
PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCA ATA TCC GCT TG (SEC ID NO: 14)

65 [0123] Las variantes de Termamyl Y290E y Y290K fueron construidas usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):
PGC AGC ATG GAA CTG CTY ATG AAG AGG CAC GTC AAA C (SEC ID NO:15)

ES 2 496 568 T3

- [0124] Y representa una mezcla igual de C y T. La presencia de un codón que codifica bien glutamato o lisina en la posición 290 fue verificada por la secuenciación del ADN.
- 5 [0125] La variante de Termamyl N190F fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):
PCA TAG TTG CCG AAT TCA TTG GAA ACT TCC C (SEC ID NO: 16)
- 10 [0126] La variante de Termamyl N188P+N190F fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):
PCA TAG TTG CCG AAT TCA GGG GAA ACT TCC CAA TC (SEC ID NO: 17)
- 15 [0127] La variante de Termamyl H140K+H142D fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):
PCC GCG CCC CGG GAA ATC AAA TTT TGT CCA GGC TTT AAT TAG (SEC ID NO: 18)
- [0128] La variante de Termamyl H156Y fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):
20 PCA AAA TGG TAC CAA TAC CAC TTA AAA TCG CTG (SEC ID NO: 19)
- [0129] La variante de Termamyl A181T fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):
PCT TCC CAA TCC CAA GTC TTC CCT TGA AAC (SEC ID NO: 20)
- 25 [0130] La variante de Termamyl A209V fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):
PCTT AAT TTC TGC TAC GAC GTC AGG ATG GTC ATA ATC (SEC ID NO: 21)
- 30 [0131] La variante de Termamyl Q264S fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):
PCG CCC AAG TCA TTC GAC CAG TAC TCA GCT ACC GTA AAC (SEC ID NO: 22)
- [0132] La variante de Termamyl S187D fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):
35 PGC CGT TTT CAT TGT CGA CTT CCC AAT CCC (SEC ID NO: 23)
- [0133] La variante de Termamyl DELTA(K370-G371-D372) (es decir, delecionada de los residuos de aminoácidos nos. 370, 371 y 372) fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):
40 PGG AAT TTC GCG CTG ACT AGT CCC GTA CAT ATC CCC (SEC ID NO: 24)
- [0134] La variante de Termamyl DELTA(D372-S373-Q374) fue construida usando el siguiente cebador de la mutagénesis (escrito 5'-3', de izquierda a derecha):
PGG CAG GAA TTT CGC GAC CTT TCG TCC CGT ACA TAT C (SEC ID NO: 25)
- 45 [0135] Las variantes de Termamyl A181T y A209V fueron combinadas a A181T+A209V mediante la digestión del plásmido tipo pDN1528 conteniendo A181T (es decir, pDN1528 conteniendo dentro de *amyL* la mutación dando como resultado la alteración de A181T) y el plásmido tipo pDN1528 conteniendo A209V (es decir, pDN1528 conteniendo dentro de *amyL* la mutación dando como resultado la alteración de A209V) con la enzima de restricción *ClaI* que corta los plásmidos tipo pDN1528 dos veces dando como resultado un fragmento de 1116 pares de bases y la parte del vector (es decir que contiene el origen de replicación del plásmido) de 3850 pares de bases. El fragmento que contiene la mutación A209V y la parte del vector conteniendo la mutación de A181T fueron purificados por el kit de extracción en gel QIAquick (adquirido de Qiagen) después de la separación en un gel de agarosa. El fragmento y el vector fueron ligados y transformados en la cepa de *Bacillus subtilis* baja en proteasa y amilasa a la que se ha hecho referencia más arriba. El plásmido de *amy+* (zonas de aclarado en placas de agar con contenido en almidón) y transformantes resistentes al cloranfenicol fueron analizados para la presencia de ambas mutaciones en el plásmido.
- 50
- 55 [0136] De forma similar según se ha descrito anteriormente, H156Y y A209V fueron combinados utilizando las endonucleasas de restricción *Acc65I* y *EcoRI*, dando H156Y+A209V.
- 60 [0137] H156Y +A209V y A181T+A209V fueron combinados en H156Y+ A181T+A209V usando las endonucleasas de restricción *Acc65I* y *HindIII*.
- [0138] Los 35 residuos N-terminales de la parte madura de la variante de Termamyl H156Y+ A181T+A209V fueron sustituidos por los 33 residuos N-terminales de alfa-amilasa de *B. amyloliquefaciens* (SEC ID NO: 4) (que en este contexto se denomina BAN) por un enfoque de SOE-PCR (Higuchi et al. 1988, *Nucleic Acids Research* 16:7351) como sigue:
- 65

ES 2 496 568 T3

Cebador 19364 (secuencia 3' 5': CCT CAT TCT GCA GCA GCA GCC GTA AAT GGC ACG CTG (SEQ ID NO: 26)

Cebador 19362: CCA GAC GGC AGT AAT ACC GAT ATC CGA TAA ATG TTC CG (SEC ID NO: 27)

Cebador 19363: CGG ATA TCG GTA TTA CTG CCG TCT GGA TTC (SEC ID NO: 28)

Cebador 1C: CTC GTC CCA ATC GGT TCC GTC (SEC ID NO: 29)

5

[0139] Una PCR estándar, reacción en cadena de la polimerasa, se efectuó usando la polimerasa Pwo termoestable de Boehringer Mannheim según las instrucciones del fabricante y el ciclo de temperatura: 5 minutos a 94°C; 25 ciclos de (94°C durante 30 segundos; 50°C durante 45 segundos; 72°C durante 1 minuto); 72°C durante 10 minutos.

10

[0140] Un fragmento de aproximadamente 130 bp fue amplificado en una primera PCR denominada PCR1 con los cebadores 19364 y 19362 en un fragmento de ADN conteniendo el gen codificador de la alfa-amilasa de *B. amyloliquefaciens*.

15

[0141] Un fragmento de aproximadamente 400 bp fue amplificado en otra PCR denominada PCR2 con los cebadores 19363 y 1C en el molde pDN1528.

20

[0142] PCR1 y PCR2 fueron purificadas a partir de un gel de agarosa y usadas como moldes en PCR3 con los cebadores 19364 y 1C, que dieron como resultado un fragmento de aproximadamente 520 bp. Este fragmento contiene así una parte del ADN que codifica el N-término de BAN fusionado a una parte del ADN que codifica el Termamyl a partir del 35º aminoácido.

25

[0143] El fragmento de 520 bp fue subclonado en un plásmido tipo pDN1528 (conteniendo la variante de Termamyl del gen que codifica H156Y+ A181T+A209V) mediante la digestión con las endonucleasas de restricción *Pst*I y *Sac*II, la ligadura y la transformación de la cepa de *B. subtilis* tal y como se ha descrito anteriormente. La secuencia de ADN entre los sitios de restricción *Pst*I y *Sac*II fue verificada por la secuenciación del ADN en los plásmidos extraídos de *amy*+ y los transformantes resistentes al cloranfenicol.

30

[0144] El constructo final conteniendo el N-término correcto de BAN y H156Y+ A181T+A209V fue denominado BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+A209V.

35

[0145] N190F fue combinado con BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+A209V dando BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+N190F+A209V realizando la mutagénesis según el modo descrito anteriormente a excepción de que la secuencia de *amy*L en pJeEN1 fue sustituida por la variante de Termamyl de la secuencia de ADN que codificaba BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+A209V

40

[0146] Q264S fue combinado con BAN(1-35)+ H156y+ A181T+A209V dando BAN(1-35)+ H156y+ A181T+A209V+Q264S realizando la mutagénesis según el modo descrito anteriormente a excepción de que la secuencia de *amy*L en pJeEN fue sustituida por la variante de Termamyl de la secuencia de ADN que codificaba BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+A209V

45

[0147] BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+A209V+Q264S y BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+N190F+A209V fueron combinados en BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+N190F+A209V+Q264S utilizando las endonucleasas de restricción *Bsa*HI (el sitio *Bsa*HI fue introducido cerca de la mutación de A209V) y *Pst*I.

50

[0148] I201F fue combinado con BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+N190F+A209V+Q264S dando BAN(1-35)+ H156Y+ A181T+N190F+A209V+Q264S+I201F (SEC ID NO: 2) realizando la mutagénesis según el modo descrito anteriormente. Se utilizó el cebador de la mutagénesis AM100, se introdujo la sustitución I201F y se eliminó simultáneamente un sitio de restricción *Cl*aI, facilitando la identificación de los mutantes.

[0149] cebador AM100:

5'GATGTATGCCGACTTCGATTATGACC 3' (SEC ID NO: 30)

EJEMPLO 2 (ejemplo referencial)

55

Construcción de variantes de la alfa-amilasa tipo Termamyl con un modelo de seccionamiento alterado según la invención

60

[0150] La variante de la alfa-amilasa termoestable de *B. licheniformis* consistente comprendiendo los 445 residuos de los aminoácidos C-terminales de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* mostrada en la SEC ID NO: 4 y los 37 residuos de los aminoácidos N-terminales de la alfa-amilasa derivada de *B. amyloliquefaciens* mostrada en la SEC ID NO: 6, y comprendiendo además las mutaciones siguientes:

H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S+I201F (la construcción de esta variante está descrita en el ejemplo 1, y la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 2)

tiene una capacidad reducida de seccionar un sustrato cerca del punto de ramificación.

[0151] En un intento de mejorar adicionalmente la capacidad reducida de seccionar un sustrato cerca del punto de ramificación de dicha variante de la alfa-amilasa, se efectuó una mutagénesis sitio dirigida usando el método Mega-primer como se describe por Sarkar y Sommer; 1990 (BioTechniques 8: 404-407).

5 Construcción de LE313: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S+V54N:

[0152] El cebador específico del gen 27274 y el cebador mutagénico AM115 se utilizan para amplificar por PCR un fragmento de ADN de aproximadamente 440 bp a partir de un plásmido tipo pDN1528 (albergando las mutaciones BAN(1-35) +H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S en el gen que codifica la amilasa de la SEC ID NO: 4).

10

[0153] El fragmento de 440 bp es purificado a partir de un gel de agarosa y se usa como Mega-primer junto con el cebador 113711 en una segunda PCR realizada en el mismo molde.

15

[0154] El fragmento resultante de aproximadamente 630 bp es digerido con las enzimas de restricción EcoR V y Acc65 I y el fragmento de ADN resultante de aproximadamente 370 bp es purificado y ligado con el plásmido tipo pDN1528 digerido con las mismas enzimas. Las células competentes SHA273 de *Bacillus subtilis* (bajas en amilasa y proteasa) son transformadas con la ligadura y los transformantes resistentes al cloranfenicol son controlados por la secuenciación del ADN para verificar la presencia de las mutaciones correctas en el plásmido.

Cebador 27274:

20

5' CATAGTTGCCGAATTCATTGGAACTTCCC 3' (SEC ID NO: 31)

Cebador 1B:

5' CCGATTGCTGACGCTGTTATTTGC 3' (SEC ID NO: 32)

Cebador AM115:

5' GCCAAGCGGATAACGGCTACGGTGC 3' (SEC ID NO:33)

25

[0155] Construcción de LE314: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S + A52S se realiza en una vía similar, a excepción de que se usa el cebador mutagénico AM116.

AM116:

5' GAACGAGCCAATCGGACGTGGGCTACGG 3' (SEC ID NO: 34)

30

[0156] Construcción de LE315: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S + A52S+V54N se realiza en una vía similar, a excepción de que se usa el cebador mutagénico AM117.

AM117:

5' GGAACGAGCCAATCGGATAACGGCTACGGTGC 3' (SEC ID NO: 35)

35

[0157] Construcción de LE316: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S + T49L se realiza en una vía similar, a excepción de que se usa el cebador mutagénico AM118.

A.M118:

5' GCATATAAGGGACTGAGCCAAGCGG 3' (SEC ID NO: 36)

40

[0158] Construcción LE317: híbrido BAN/ Termamyl + H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S + T49L+G107A se realiza en una vía similar, a excepción de que se usan el cebador mutagénico AM118 y el cebador mutagénico AN119 simultáneamente.

AM119:

45

5' CAACCACAAAGCCGCGCTGATGCG 3' (SEC ID NO: 37)

[0159] Construcción de LE318: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S + A52S+V54N+T49L+G107A se realiza en una vía similar, a excepción de que se usan el cebador mutagénico AM120 y el cebador mutagénico AM119 simultáneamente.

50

AM120:

5' GCATATAAGGGACTGAGCCAATCGGATAACGGCTACGGTGC 3' (SEC ID NO: 38)

[0160] Construcción de LE319: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S+A52S+V54N+T49L se realiza en una vía similar, a excepción de que se usa el cebador mutagénico AM120.

55

[0161] Construcción de LE320: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S + G107A se realiza en una vía similar, a excepción de que se usa el cebador mutagénico AM119.

[0162] Construcción de LE322: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S + Q51R+A52S se realiza en una vía similar, a excepción de que se usa el cebador mutagénico AM121.

60

AM121:

5' GAACGAGCCGATCGGACGTGGGCTACGG 3' (SEC ID NO:39)

[0163] Construcción de LE323: híbrido BAN/Termamyl + H156Y+A181T+N190F+ A209V+Q264S + A52N se realiza en una vía similar, a excepción de que se usa el cebador mutagénico AM122.

65

AM122:

T49L+A52T+G107A	95.8%	1.66%	1.03%	1.48%
T49L+A52F+G107A	95.7%	1.69%	1.16%	1.42%
T49L+A52L+G107A	95.5%	1.70%	1.40%	1.38%
T49L+A52I+G107A	95.9%	1.72%	1.31%	1.07%
T49L+A52V+G107A	94.7%	1.69%	1.16%	2.44%
T49L+A52V+G107A+A111V	94.5%	1.75%	0.72%	2.99%
LE429	94.9%	1.71%	1.85%	1.51%

Ejemplo 5

5 [0172] El experimento del ejemplo 3 fue repetido para varias variantes de LE429 con la excepción de que la licuefacción se efectuó a 95°C, pH 6.0 y la sacarificación a 60°C, pH 4.5, 40 ppm de CaCl₂, seguido de la inactivación. La variante a la que se hace referencia más abajo es la variante de LE429. Los resultados encontrados son los siguientes:

Perfil variante/azúcar	DP4+	DP3	DP2	DP1
T49F	1.15	0.92	1.83	96.12
T49D+G107A	0.84	1.03	1.82	96.3
T49I+G107A	0.97	0.64	1.84	96.55
T49L+G107A	0.96	0.81	1.82	96.42
T49L+A52S+G107A	1.37	0.75	1.88	96.01
T49L+A52T+G107A	0.87	0.81	1.8	96.52
T49L+A52F+G107A	0.98	0.83	1.87	96.31
T49V+G107A	0.65	0.8	2.13	96.43
T49Y+G107A	0.83	0.94	1.89	96.35
LE429	1.16	1.21	1.77	95.87

10 REFERENCIAS CITADAS

[0173]
 Klein, C., et al., *Biochemistry* 1992, **31**, 8740-8746,
 Mizuno, H., et al., *J. Mol. Biol.* (1993) **234**, 1282-1283,
 15 Chang, C., et al, *J. Mol. Biol.* (1993) **229**, 235-238,
 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,
 Brady, R.L., et al., *Acta Crystallogr. sect. B*, **47**, 527-535,
 20 Swift, H.J., et al., *Acta Crystallogr. sect. B*, **47**, 535-544
 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, No. 5-6, p. B. Diderichsen and L. Christiansen, Cloning of a maltogenic amylase from *Bacillus stearothermophilus*, *FEMS Microbiol. letters*: 56: pp. 53-60 (1988)
 25 Hudson et al., *Practical Immunology*, Third edition (1989), Blackwell Scientific Publications,
 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989
 S.L. Beaucage and M.H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* **22**, 1981, pp. 1859-1869
 Matthes et al., *The EMBO J.* **3**, 1984, pp. 801-805.
 R.K. Saiki et al., *Science* **239**, 1988, pp. 487-491.
 30 Morinaga et al., (1984, *Biotechnology* 2:646-639)
 Nelson and Long, *Analytical Biochemistry* **180**, 1989, pp. 147-151
 Hunkapiller et al., 1984, *Nature* **310**:105-111
 R. Higuchi, B. Krummel, and R.K. Saiki (1988). A general method of *in vitro* preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucl. Acids Res.* **16**:7351-7367.
 35 Dubnau et al., 1971, *J. Mol. Biol.* **56**, pp. 209-221.
 Gryczan et al., 1978, *J. Bacteriol.* **134**, pp. 318-329.
 S.D. Erlich, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**, pp. 1680-1682.
 Boel et al., 1990, *Biochemistry* **29**, pp. 6244-6249
 Sarkar and Sommer, 1990, *BioTechniques* **8**, pp. 404-407.

40 LISTADO DE SECUENCIAS

[0174]
 45 <110> Novo Nordisk A/S
 <120>

ES 2 496 568 T3

<130>
 <160> 40
 5 <170> Patent In Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 1443
 10 <212> ADN
 <213> Bacillus amyloliquefaciens
 <220>
 <221> CDS
 15 <222> (1)..(1443)

<400> 1
 gta aat ggc acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tat acg ccg aac gac 48
 Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
 1 5 10 15
 ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat gcg gaa cat tta tcg gat 96
 Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
 20 25 30
 atc ggt att act gcc gtc tgg att ccc ccg gca tat aag gga acc agc 144
 Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Thr Ser
 35 40 45
 caa gcg gat gtg ggc tac ggt gct tac gac ctt tat gat tta ggg gag 192
 Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
 50 55 60
 ttt cat caa aaa ggg acg gtt cgg aca aag tac ggc aca aaa gga gag 240
 Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gly Glu
 65 70 75 80
 ctg caa tct gcg atc aaa agt ctt cat tcc cgc gac att aac gtt tac 288
 Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn Val Tyr
 85 90 95
 ggg gat gtg gtc atc aac cac aaa ggc ggc gct gat gcg acc gaa gat 336
 Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp
 100 105 110
 gta acc gcg gtt gaa gtc gat ccc gct gac cgc aac cgc gta att tca 384
 Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val Ile Ser
 115 120 125
 gga gaa cac cta att aaa gcc tgg aca cat ttt cat ttt ccg ggg cgc 432
 Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro Gly Arg
 130 135 140
 ggc agt aca tac agc gat ttt aag tgg tat tgg tac cat ttt gac gga 480
 Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Tyr Trp Tyr His Phe Asp Gly
 145 150 155 160
 acc gat tgg gac gag tcc cga aag ctg aac cgc atc tat aag ttt caa 528
 Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys Phe Gln
 165 170 175

ES 2 496 568 T3

ggg aag act tgg gat tgg gaa gtt tcc aat gaa ttc ggc aac tat gat 576
 Gly Lys Thr Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Phe Gly Asn Tyr Asp
 180 185 190

tat ttg atg tat gcc gac ttt gat tat gac cat cct gat gtc gta gca 624
 Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Phe Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Val Ala
 195 200 205

gag att aag aga tgg ggc act tgg tat gcc aat gaa ctg caa ttg gac 672
 Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln Leu Asp
 210 215 220

ggt ttc cgt ctt gat gct gtc aaa cac att aaa ttt tct ttt ttg cgg 720
 Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg
 225 230 235 240

gat tgg gtt aat cat gtc agg gaa aaa acg ggg aag gaa atg ttt acg 768
 Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr
 245 250 255

gta gct gag tac tgg tcg aat gac ttg ggc gcg ctg gaa aac tat ttg 816
 Val Ala Glu Tyr Trp Ser Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu
 260 265 270

aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt cat tat 864
 Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr
 275 280 285

cag ttc cat gct gca tcg aca cag gga ggc ggc tat gat atg agg aaa 912
 Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys
 290 295 300

ttg ctg aac ggt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa tcg gtt aca 960
 Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser Val Thr
 305 310 315 320

ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tcg ctt gag tcg act 1008
 Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr
 325 330 335

gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct ttt att ctc aca agg 1056
 Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg
 340 345 350

gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg acg aaa 1104
 Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys
 355 360 365

gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att gaa ccg 1152
 Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro
 370 375 380

atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat gat tat 1200
 Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr
 385 390 395 400

ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac agc tcg 1248
 Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser
 405 410 415

gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc ggt ggg 1296
 Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly
 420 425 430

gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca tgg cat 1344
 Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His
 435 440 445

gac att acc gga aac cgt tcc gag ccg gtt gtc atc aat tcc gaa ggc 1392
 Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly
 450 455 460

tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcc gtt tca att tat gtt caa 1440
 Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln
 465 470 475 480

aga 1443
 Arg

<210> 2

<211> 481

<212> PRT

5 <213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 2

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 Thr Ser
 35 40 45

Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
 50 55 60

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

Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn Val Tyr
 85 90 95

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

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

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

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

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

Gly Lys Thr Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Phe Gly Asn Tyr Asp
 180 185 190

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

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

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

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

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

Arg

- <210> 3
- <211> 1920
- <212> ADN
- <213> Bacillus licheniformis

5

- <220>
- <221> CDS
- <222> (421)..(1872)

10

<400> 3
 cggaagattg gaagtacaaa aataagcaaa agattgtcaa tcatgtcatg agccatgcgg 60
 gagacggaaa aatcgtctta atgcacgata tttatgcaac gttcgcagat gctgctgaag 120
 agattattaa aaagctgaaa gcaaaaaggct atcaattggg aactgtatct cagcttgaag 180
 aagtgaagaa gcagagaggc tattgaataa atgagtagaa gcgccatctc ggcgcttttc 240
 ttttggaaag aatatagggg aaaatgggtac ttgttaaaaa ttcggaatat ttatacaaca 300

tcatatgttt cacattgaaa ggggaggaga atcatgaaac aacaaaaacg gctttacgcc 360
 cgatcgctga cggtgttatt tgcgctcacc ttcttgctgc ctcattctgc agcagcggcg 420
 gca aat ctt aat ggg acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tac atg ccc 468
 Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
 1 5 10 15
 aat gac ggc caa cat tgg agg cgt ttg caa aac gac tgg gca tat ttg 516
 Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu
 20 25 30
 gct gaa cac ggt att act gcc gtc tgg att ccc ccg gca tat aag gga 564
 Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
 35 40 45
 acg agc caa gcg gat gtg ggc tac ggt gct tac gac ctt tat gat tta 612
 Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
 50 55 60
 ggg gag ttt cat caa aaa ggg acg gtt cgg aca aag tac ggc aca aaa 660
 Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
 65 70 75 80
 gga gag ctg caa tct gcg atc aaa agt ctt cat tcc cgc gac att aac 708
 Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn
 85 90 95
 gtt tac ggg gat gtg gtc atc aac cac aaa ggc ggc gct gat gcg acc 756
 Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr
 100 105 110
 gaa gat gta acc gcg gtt gaa gtc gat ccc get gac cgc aac cgc gta 804
 Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val
 115 120 125
 att tca gga gaa cac cta att aaa gcc tgg aca cat ttt cat ttt ccg 852
 Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro
 130 135 140
 ggg cgc ggc agc aca tac agc gat ttt aaa tgg cat tgg tac cat ttt 900
 Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe
 145 150 155 160
 gac gga acc gat tgg gac gag tcc cga aag ctg aac cgc atc tat aag 948
 Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys
 165 170 175
 ttt caa gga aag gct tgg gat tgg gaa gtt tcc aat gaa aac ggc aac 996
 Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn
 180 185 190
 tat gat tat ttg atg tat gcc gac atc gat tat gac cat cct gat gtc 1044
 Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
 195 200 205
 gca gca gaa att aag aga tgg ggc act tgg tat gcc aat gaa ctg caa 1092
 Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln
 210 215 220
 ttg gac ggt ttc cgt ctt gat gct gtc aaa cac att aca ttt tct ttt 1140
 Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
 225 230 235 240
 ttg cgg gat tgg gtt aat cat gtc agg gaa aaa acg ggg aag gaa atg 1188
 Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met
 245 250 255

```

ttt acg gta gct gaa tat tgg cag aac gac ttg ggc gcg ctg gaa aac      1236
Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn
                260                265                270

tat ttg aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt      1284
Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
                275                280                285

cat tat cag ttc cat gct gca tcc aca cag gga ggc ggc tat gat atg      1332
His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
                290                295                300

agg aaa ttg ctg aac ggt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa tcg      1380
Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser
305                310                315                320

gtt aca ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tcg ctt gag      1428
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
                325                330                335

tcg act gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct ttt att ctc      1476
Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
                340                345                350

aca agg gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg      1524
Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
                355                360                365

acg aaa gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att      1572
Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile
                370                375                380

gaa ccg atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat      1620
Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His
385                390                395                400

gat tat ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac      1668
Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
                405                410                415

agc tcg gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc      1716
Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
                420                425                430

ggt ggg gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca      1764
Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr
                435                440                445

tgg cat gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc aat tcg      1812
Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser
                450                455                460

gaa ggc tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca att tat      1860
Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr
465                470                475                480

ggt caa aga tag aagagcagag aggacggatt tootgaagga aatccgtttt      1912
Val Gln Arg

tttatattt      1920

```

- <210> 4
- <211> 483
- <212> PRT
- <213> Bacillus licheniformis
- <400> 4

5

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
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
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> 2604

<212> ADN

5 <213> Bacillus amyloliquefaciens

<220>

<221> -10 señal

<222> (707)..(712)

10

<220>

<221> -35 señal

<222> (729)..(734)

15

<220>

<221> RBS

<222> (759)..(762)

20

<220>

<221> sig_péptido

<222> (770)..(862)

25

<220>

<221> mat_péptido

<222> (863)..(2314)

30

<220>

<221> terminador

<222> (2321)..(2376)

35

<220>

<221> CDS

<222> (863)..(2314)

<400> 5

aagcttcaag cggcgaatcg gaatgtgcat ctcgcttcat acttagggtt tcaccocgat 60

attaagcagg cgtttttgaa ccgtgtgaca gaagctgttc gaaacccocgg cgggcgggtt 120

```

gattttaagg ggggacagta tgetgctctt toacattaat ctacagcggaa aaagaatcat 180
cattgctggc gggggcaatg ttgcattaag aaggctgaaa cggtgcttcc ggaagggcgt 240
gatattaccg tgatcagttt gagcctgctt gaaattaaaa agctggcggg tgaaggacgc 300
atccgctgga tcccccgag aattgaaatg aaagatctca agcccccttt ttccattart 360
gcgcgcgaca atgaccgagg cgtgaatcag gagatagccg caaacgcttc tgaanagcag 420
ctggctcaact gtgtaagcaa ggctgaacaa ggcagcgtat atatgcogaa gatcatccgc 480
aaagggcgca ttcaagtatc agtatcaaca agcgggggcaa gccccgcaca tacgaaaaga 540
ctggctgaaa acattgagcc ttgatgact gatgatttgg ctgaagaagt ggatcgattg 600
tttgagaaa gaagaagacc ataaaaaac cttgtctgtc atcagacagg gtatttttta 660
tgetgtccag actgtccgct gtgtaaaaaa taggaataaa ggggggttgt tattathtta 720
ctgatatgta aaatataatt tgtataagaa aatgagaggg agaggaaaca tgattcaaaa 780
acgaaagcgg acagtttctg tcagacttgt gcttatgtgc acgctgttat ttgtcagttt 840
gcgattaca aaaacatcag cc gta aat ggc acg ctg atg cag tat ttt gaa 892
                               Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu
                               1                               5                               10

tgg tat acg ccg aac gac ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat 940
Trp Tyr Thr Pro Asn Asp Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp
                               15                               20                               25

gcg gaa cat tta tog gat atc gga atc act gcc gtc tgg att cct ccc 988
Ala Glu His Leu Ser Asp Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro
                               30                               35                               40

gca tac aaa gga ttg agc caa tcc gat aac gga tac gga cct tat gat 1036
Ala Tyr Lys Gly Leu Ser Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp
                               45                               50                               55

ttg tat gat tta gga gaa ttc cag caa aaa ggg acg gtc aga acg aaa 1084
Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys
                               60                               65                               70

tac ggc aca aaa tca gag ctt caa gat gcg atc ggc tca ctg cat tcc 1132
Tyr Gly Thr Lys Ser Glu Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser
                               75                               80                               85                               90

cgg aac gtc caa gta tac gga gat gtg gtt ttg aat cat aag gct ggt 1180
Arg Asn Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly
                               95                               100                               105

gct gat gca aca gaa gat gta act gcc gtc gaa gtc aat ccg gcc aat 1228
Ala Asp Ala Thr Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn
                               110                               115                               120

aga aat cag gaa act tog gag gaa tat caa atc aaa gcg tgg acg gat 1276
Arg Asn Gln Glu Thr Ser Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp
                               125                               130                               135

ttt cgt ttt ccg ggc cgt gga aac acg tac agt gat ttt aaa tgg cat 1324
Phe Arg Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His
                               140                               145                               150

tgg tat cat ttc gac gga gcg gac tgg gat gaa tcc cgg aag atc agc 1372
Trp Tyr His Phe Asp Gly Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser
                               155                               160                               165                               170

```

cgc atc ttt aag ttt cgt ggg gaa gga aaa gcg tgg gat tgg gaa gta 1420
 Arg Ile Phe Lys Phe Arg Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val
 175 180 185
 tca agt gaa aac ggc aac tat gac tac tra atg tat gct gat gtt gac 1468
 Ser Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp
 190 195 200
 tac gac cac cct gat gtc gtg gca gag aca aaa aaa tgg ggt atc tgg 1516
 Tyr Asp His Pro Asp Val Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp
 205 210 215
 tat gcg aat gaa ctg tca tta gac ggc ttc cgt att gat gcc gcc aaa 1564
 Tyr Ala Asn Glu Leu Ser Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys
 220 225 230
 cat att aaa ttt tca ttt ctg cgt gat tgg gtt cag gcg gtc aga cag 1612
 His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln
 235 240 245 250
 gcg acg gga aaa gaa atg ttt acg gtt gcg gag tat tgg cag aat aat 1660
 Ala Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn
 255 260 265
 gcc ggg aaa ctg gaa aac tac ttg aat aaa aca agc ttt aat caa tcc 1708
 Ala Gly Lys Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser
 270 275 280
 gtg ttt gat gtt ccg ctt cat ttc aat tta cag gcg gct tcc tca caa 1756
 Val Phe Asp Val Pro Leu His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln
 285 290 295
 gga gcg gga tat gat atg agg cgt ttg ctg gac ggt acc gtt gtg tcc 1804
 Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser
 300 305 310
 agg cat ccg gaa aag gcg gtt aca ttc gtt gaa aat cat gac aca cag 1852
 Arg His Pro Glu Lys Ala Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln
 315 320 325 330
 ccg gga cag tca ttg gaa tcg aca gtc caa act tgg ttt aaa ccg ctt 1900
 Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu
 335 340 345
 gca tac gcc ttt att ttg aca aga gaa tcc ggt tat cct cag gtg ttc 1948
 Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe
 350 355 360
 tat ggg gat atg tac ggg aca aaa ggg aca tcg cca aag gaa att ccc 1996
 Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro
 365 370 375
 tca ctg aaa gat aat ata gag ccg att tta aaa gcg cgt aag gag tac 2044
 Ser Leu Lys Asp Asn Ile Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr
 380 385 390
 gca tac ggg ccc cag cac gat tat att gac cac ccg gat gtg atc gga 2092
 Ala Tyr Gly Pro Gln His Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly
 395 400 405 410
 tgg acg agg gaa ggt gac agc tcc gcc gcc aaa tca ggt ttg gcc gct 2140
 Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala
 415 420 425
 tta atc acg gac gga ccc gcc gga tca aag cgg atg tat gcc gcc ctg 2188
 Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu

```

          430                435                440
aaa aat gcc ggc gag aca tgg tat gac ata acg ggc aac cgt tca gat 2236
Lys Asn Ala Gly Glu Thr Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp
          445                450                455

act gta aaa atc gga tct gac ggc tgg gga gag ttt cat gta aac gat 2284
Thr Val Lys Ile Gly Ser Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp
          460                465                470

ggg tcc gtc tcc att tat gtt cag aaa taa ggtaataaaa aaacacctcc 2334
Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln Lys
          475                480

aagctgagtg cgggtatcag cttggaggtg cgtttatittt ttcagccgta tgacaaggtc 2394
ggcatcaggt gtgacaaata cggtatgctg gctgtcatag gtgacaaatc cgggttttgc 2454
gcggttggc tttttcacat gtctgatttt tgtataatca acaggcacgg agccggaatc 2514
tttcgccttg gaaaaataag cggcgatcgt agctgcttcc aatatggatt gttcatcggg 2574
atcgtgctt ttaatcacia cgtgggatcc 2604

```

<210> 6

<211> 483

<212> PRT

5 <213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 6

```

Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
 1          5          10
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
          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          115
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
 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
 Val Gln Lys

<210> 7
 <211> 1548
 <212> ADN
 <213> Bacillus stearothermophilus

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1598)

10

<400> 7

ES 2 496 568 T3

gcc gca ccg ttt aac ggc acc atg atg cag tat ttt gaa tgg tac ttg	48
Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu	
1 5 10 15	
ccg gat gat ggc acg tta tgg acc aaa gtg gcc aat gaa gcc aac aac	96
Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn	
20 25 30	
tta tcc agc ctt ggc atc acc gct ctt tgg ctg ccg ccc gct tac aaa	144
Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys	
35 40 45	
gga aca agc cgc agc gac gta ggg tac gga gta tac gac ttg tat gac	192
Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp	
50 55 60	
ctc ggc gaa ttc aat caa aaa ggg acc gtc cgc aca aaa tac gga acc	240
Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr	
65 70 75 80	
aaa gct caa tat ctt caa gcc att caa gcc cac gcc gct gga atg	288
Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met	
85 90 95	
caa gtg tac gcc gat gtc gtg ttc gac cat aaa ggc ggc gct gac ggc	336
Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly	
100 105 110	
acg gaa tgg gtg gac gcc gtc gaa gtc aat ccg tcc gac cgc aac caa	384
Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln	
115 120 125	
gaa atc tcc ggc acc tat caa atc caa gca tgg acg aaa ttt gat ttt	432
Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe	
130 135 140	
ccc ggg cgg ggc aac acc tac tcc agc ttt aag tgg cgc tgg tac cat	480
Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His	
145 150 155 160	
ttt gac ggc gtt gat tgg gac gaa agc cga aaa ttg agc cgc att tac	528
Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr	
165 170 175	
aaa ttc cgc ggc atc ggc aaa gcg tgg gat tgg gaa gta gac acg gaa	576
Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu	
180 185 190	
aac gga aac tat gac tac tta atg tat gcc gac ctt gat atg gat cat	624
Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His	
195 200 205	
ccc gaa gtc gtg acc gag ctg aaa aac tgg ggg aaa tgg tat gtc aac	672
Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn	
210 215 220	
aca acg aac att gat ggg ttc cgg ctt gat gcc gtc aag cat att aag	720
Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys	
225 230 235 240	
tcc agt ttt ttt cct gat tgg ttg tcg tat gtg cgt tct cag act ggc	768
Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly	
245 250 255	
aag ccg cta ttt acc gtc ggg gaa tat tgg agc tat gac atc aac aag	816
Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys	

ES 2 496 568 T3

260				265				270				
ttg cac aat tac att acg asa aca gac gga acg atg tct ttg ttt gat	864											
Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp												
275	280	285										
gcc ccg tta cac aac aaa ttt tat acc get tcc aaa tca ggg ggc gca	912											
Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala												
290	295	300										
ttt gat atg cgc acg tta atg acc aat act ctc atg aaa gat caa ccg	960											
Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro												
305	310	315	320									
aca ttg gcc gtc acc ttc gtt gat aat cat gac acc gaa ccc ggc caa	1008											
Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln												
325	330	335										
gcg ctg cag tca tgg gtc gac cca tgg ttc aaa ccg ttg get tac gcc	1056											
Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala												
340	345	350										
ttt att cta act cgg cag gaa gga tac ccg tgc gtc ttt tat ggt gac	1104											
Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp												
355	360	365										
tat tat gcc att cca caa tat aac att cct tgg ctg aaa agc aaa atc	1152											
Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile												
370	375	380										
gat ccg ctc ctc atc gog cgc agg gat tat gct tac gga acg caa cat	1200											
Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His												
385	390	395	400									
gat tat ctt gat cac tcc gac atc atc ggg tgg aca agg gaa ggg ggc	1248											
Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Gly												
405	410	415										
act gaa aaa cca gga tcc gga ctg gcc gca ctg atc acc gat ggg ccg	1296											
Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro												
420	425	430										
gga gga agc aaa tgg atg tac gtt ggc aaa cca cac get gga aaa gtg	1344											
Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val												
435	440	445										
ttc tat gac ctt acc ggc aac cgg agt gac acc gtc acc atc aac agt	1392											
Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser												
450	455	460										
gat gga tgg ggg gaa ttc aaa gtc aat ggc ggt tgg gtt tog gtt tgg	1440											
Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp												
465	470	475	480									
gtt cct aga aaa acg acc gtt tct acc atc get cgg ccg atc aca acc	1488											
Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr												
485	490	495										
cga ccg tgg act ggt gaa ttc gtc cgt tgg acc gaa cca ccg ttg gtg	1536											
Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val												
500	505	510										
gca tgg cct tga	1548											
Ala Trp Pro												
515												

<210> 8

<211> 515

<212> PRT

5 <213> Bacillus stearothermophilus

<400> 8

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 Thr 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 Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn
 210 215 220
 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 Tyr 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 Thr Lys Thr Asp 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 Ala
 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	Gly	
				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				
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	Arg	Pro	Ile	Thr	Thr	
				485					490					495		
Arg	Pro	Trp	Thr	Gly	Glu	Phe	Val	Arg	Trp	Thr	Glu	Pro	Arg	Leu	Val	
			500					505					510			
Ala	Trp	Pro														
		515														

- <210> 9
- <211> 31
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
- 10 <400> 9
- ggtcgtaggc accgtagccc caatccgctt g 31
- <210> 10
- <211> 36
- 15 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador
- 20 <400> 10
- ggtcgtaggc accgtagccc caatcccatt ggctcg 36
- <210> 11
- <211> 28
- 25 <212> ADN
- <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 11
 5 ctgtgactgg tgagtactca accaagtc 28

<210> 12
 <211> 31
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 12
 15 ggtcgtaggc accgtagccc tcatccgctt g 31

<210> 13
 <211> 31
 20 <212> ADN
 <213> secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 13
 25 ggtcgtaggc accgtagccc atatccgctt g 31

<210> 14
 <211> 31
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 14
 35 ggtcgtaggc accgtagcca atatccgctt g 31

<210> 15
 <211> 36
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 15
 50 gcagcatgga actgctiatg aagaggcacg tcaaac 36

<210> 16
 <211> 30
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 16
 60 catagttgcc gaattcattg gaaactccc 30

<210> 17
 <211> 34
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

5 <400> 17
 catagttgcc gaattcaggg gaaactccc aatc 34

<210> 18
 <211> 41
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

15 <400> 18
 ccgcgccccg ggaatcaaaa tttgtccag gcttaatta g 41

<210> 19
 <211> 32
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

25 <400> 19
 caaaatggta ccaataccac ttaaaatcgc Tg 32

<210> 20
 <211> 29
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

35 <400> 20
 cttccaatc ccaagtctc ccttgaaac 29

<210> 21
 <211> 36
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

45 <400> 21
 cttatttct gctacgacgt caggatggtc ataate 36

50 <210> 22
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

60 <400> 22
 cgccaagtc attcgaccag tactcagcta ccgtaaac 38

<210> 23
 <211> 29
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 23
 5 gccgttttca ttgtcgactt cccaatccc 29

<210> 24
 <211> 35
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 24
 15 ggaatttcgc gctgactagt cccgtacata tcccc 35

<210> 25
 <211> 36
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 25
 25 ggcaggaatt tcgcgacctt tcgtcccgta catatc 36

<210> 26
 <211> 36
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 26
 35 cctcattctg cagcagcagc cgtaaatggc acgctg 36

<210> 27
 <211> 38
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 27
 45 tatccgataa de la gtaataccga de la ccagacggca atgttccg 38

<210> 28
 <211> 30
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 28
 55 cggatatcgg tattactgcc gtctggattc 30

<210> 29
 <211> 21
 60 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 496 568 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

5 <400> 29
ctcgtcccaa tcggttccgt c 21

<210> 30
<211> 26
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

15 <400> 30
gatgtatgcc gacttcgatt atgacc 26

<210> 31
<211> 30
20 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

25 <400> 31
catagttgcc gaattcattg gaaactccc 30

<210> 32
<211> 24
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

35 <400> 32
ccgattgctg acgctgttat ttgc 24

<210> 33
<211> 25
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

45 <400> 33
gccaaagcga taacggctac ggtgc 25

<210> 34
<211> 28
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

55 <400> 34
gaacgagcca atcggacgtg ggctacgg 28

<210> 35
60 <211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
65 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 35
 ggaacgagcc aatcggataa cggctacggt gc 32

5 <210> 36
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 36
 gcatataagg gactgagcca agcgg 25

15 <210> 37
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 37
 caaccacaaa gccggcgctg atgcg 25

25 <210> 38
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 38
 gcatataagg gactgagcca atcggataac ggctacggtg c 41

35 <210> 39
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 39
 gaacgagccg atcggacgtg ggctacgg 28

45 <210> 40
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 40
 gaacgagcca aaacgacgtg ggctacgg 28

55

REIVINDICACIONES

1. Alfa-amilasa
 - i) con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4 o 8 en la presente, o
 - ii) con la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1 o figura 2, o
 - iii) con la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 3, o
 - iv) alfa-amilasa que muestra al menos el 90% de homología con las alfa-amilasas de i), ii) o iii), donde la alfa-amilasa comprende una de las siguientes alteraciones: T49L, F, V, Y o I y donde la posición 49 corresponde a la posición 49 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID NO: 4.
2. Alfa-amilasa según la reivindicación 1, que comprende una mutación en una posición correspondiente a una de las siguientes mutaciones en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4: A52S+V54N+T49L, y T49L+A52V+G107A+A111V.
3. Constructo de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una alfa-amilasa según la reivindicación 1 o 2.
4. Vector de expresión recombinante que transporta un constructo de ADN según la reivindicación 3.
5. Célula transformada con un constructo de ADN según la reivindicación 3 o un vector según la reivindicación 4.
6. Célula según la reivindicación 5, que es un microorganismo, en particular una bacteria o un hongo, tal como una bacteria Gram positiva tal como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus* o *Bacillus thuringiensis*.
7. Composición que comprende:
 - (i) una mezcla de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* teniendo la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 4 con una o más alfa-amilasas según la reivindicación 1 o 2 derivada de la alfa-amilasa de *B. stearothermophilus* teniendo la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 8; o
 - (ii) una mezcla de la alfa-amilasa de *B. stearothermophilus* teniendo la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 8 con una o más alfa-amilasas según la reivindicación 1 o reivindicación 2 derivada de una o más otras alfa-amilasas; o
 - (iii) una mezcla de una o más alfa-amilasas según la reivindicación 1 o 2 derivada de la alfa-amilasa de *B. stearothermophilus* teniendo la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 8 con una o más alfa-amilasas según la reivindicación 1 o 2 derivada de una o más otras alfa-amilasas progenitoras.
8. Composición según la reivindicación 7 que comprende: una mezcla de una o más alfa-amilasas de la reivindicación 1 o 2 derivada de la alfa-amilasa de *B. stearothermophilus* teniendo la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 8 y alfa-amilasa derivada de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* teniendo la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 4.
9. Uso de una alfa-amilasa según la reivindicación 1 o 2 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 o 8 para la licuefacción del almidón; en una composición de detergente, tal como composiciones para el lavado de la ropa, para lavavajillas y para la limpieza de superficies duras; para la producción de etanol, como la producción de etanol para combustible, para bebidas e industrial; para el desencolado de telas, tejidos o prendas.

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

Fig. 1

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
 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
 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

Fig. 1 (cont.)

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

Fig. 2

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 Gln 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 Gln 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

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

Fig. 2. (cont.)

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											

Fig. 2 (cont.)

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
 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

Fig. 3

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

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

Asn 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

Fig. 3 (cont.)