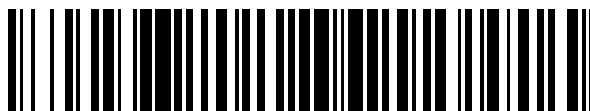


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 532 606**

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 08075617 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2011864**

54 Título: **Polipéptidos con actividad de alfa-amilasa alcalina y ácidos nucleicos que los codifican**

30 Prioridad:

31.03.1999 DK 43999

13.04.1999 DK 49099

13.04.1999 US 290734

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

30.03.2015

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)

Krogshøjvej 36

2880 Bagsværd, DK

72 Inventor/es:

OUTTRUP, HELLE;

HOECK, LISBETH HEDEGAARD;

NIELSEN, BJARNE RONFELDT;

BORCHERT, TORBEN VEDEL;

NIELSEN, VIBEKE SKOVGAARD;

BISGARD-FRANTZEN, HENRIK;

SVENDSEN, ALLAN y

ANDERSEN, CARSTEN

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 532 606 T3

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos con actividad de alfa-amilasa alcalina y ácidos nucleicos que los codifican.

5 **Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 [0001] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de alfa-amilasa y secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican los polipéptidos. Además, la invención se refiere a variantes de la alfa-amilasa de la invención. La invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores, y células huésped que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos así como métodos para producir y utilizar los polipéptidos. Además, la invención también se refiere a composiciones para lavandería, lavado de platos y/o limpieza de superficies duras.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

[0002] Durante varios años las enzimas alfa-amilasa han sido usadas para una variedad de propósitos diferentes, de los cuales los más importantes son la licuefacción de almidón, descolado textil, modificación de almidón en la industria del papel y la pulpa, y para elaboración de cerveza y repostería. Otro uso de las alfa-amilasas, que está creciendo en importancia, es la eliminación de manchas amiláceas durante el lavado con un detergente a pH alcalino.

25 [0003] Ejemplos de productos de alfa-amilasa comercial son Termamyl™, Duramyl™, Natalase™, BAN™ y Fungamyl™, todos disponibles en Novo Nordisk A/S, Dinamarca. Estos productos y similares de otras fuentes comerciales tienen un pH óptimo de ácido a neutro, típicamente en el rango de pH 5 a pH 7,5, y no muestran actividad óptima en soluciones detergentes a pH alcalino.

[0004] WO 95/26397 describe una alfa-amilasa de una cepa de Bacillus. WO 96/23873 describe variantes de amilasas de Bacillus con rendimiento mejorado bajo condiciones de lavado.

30 [0005] US 5,147,796 describe una pululanasa alcalina con actividad de alfa-amilasa. La fig. 2b del documento muestra una actividad de amilasa óptima a pH 8-8,5.

35 [0006] M. Takagi et al., J. Ferment. Bioeng., vol. 81, nº 6.557-559 (1996) describe una alfa-amilasa-pululanasa alcalifílica de Bacillus sp. La enzima tiene actividad de amilasa óptima a pH 9, pero la actividad cae rápidamente al aumentar el pH y la actividad a pH 10 es menor que a pH 7.

[0007] WO 97/00324 (KAO) describe un gen que codifica una alfa-amilasa licuefactante alcalina derivada de la cepa de Bacillus sp. KSM-AP1378 con el número de depósito FERM BP-3048, adecuada para detergentes.

40 [0008] Tsukamoto et. al., (1988), Biochem. Biophys. Res Commun. 151, p. 25-33) describen una alfa-amilasa alcalina de Bacillus sp. #707.

45 [0009] Es un objetivo de la presente invención el proporcionar alfa-amilasas nuevas con rendimiento alterado, en particular con rendimiento mejorado en soluciones alcalinas, especialmente en las soluciones de detergente alcalinas a pH alrededor de 9-11.

Resumen de la invención

50 [0010] La presente invención se refiere a un polipéptido aislado con actividad de alfa-amilasa que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 y variantes de la misma que tienen una secuencia de aminoácidos con al menos un 96% de identidad con los aminoácidos 1 a 485 de la SEC ID nº 2, donde la variante tiene un rendimiento de lavado mejorado en comparación con la alfa-amilasa progenitora, donde el rendimiento de lavado es determinado bajo las siguientes condiciones de lavado: muestras de prueba ensuciadas con almidón de arroz naranja se lavan durante 15 minutos a 25°C a un pH de 10,5, una dureza del agua de 6 °dH y una proporción Ca:Mg de 2:1 en una solución de 3g/l de detergente modelo A/P que consiste en: 20% de tripolifosfato de sodio, 25% de Na₂SO₄, 15% de Na₂CO₃, 20% de sulfonato de alquilbenceno lineal, 5% de alcohol C₁₂-C₁₅ etoxilado, 5% de Na₂Si₂O₅ y 0,3% de NaCl, que contiene 1 mg/l del polipéptido con actividad de alfa-amilasa; después del lavado las muestras se evalúan midiendo la remisión a 460 nm y el rendimiento de lavado se determina como la remisión de las muestras lavadas menos la remisión de una muestra lavada bajo las mismas condiciones pero sin un polipéptido con actividad de alfa-amilasa.

60 [0011] La presente invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican los polipéptidos y a constructos de ácidos nucleicos, vectores y células huésped que comprenden las secuencias de ácidos nucleicos, así como métodos para producir y utilizar los polipéptidos.

Breve descripción de las figuras

[0012]

- 5 La figura 1 muestra un alineamiento de varias alfa-amilasas de *Bacillus*.
 La figura 2 muestra el perfil de pH de la alfa-amilasa AA560 en comparación con las alfa-amilasas SP722 y SP690.
 El perfil de pH fue medido a 37°C. La actividad se muestra en valores absolutos como Abs650/mg de enzima.
 La figura 3 muestra el perfil de temperatura de la alfa-amilasa AA560 en comparación con las alfa-amilasas SP722 y SP690.
- 10 El perfil de temperatura se muestra como Abs650/mg de enzima.
 La figura 4 muestra el rendimiento de lavado de la alfa-amilasa AA560 en el detergente 97 modelo AP en comparación con SP722, SP690 y Termamyl®, respectivamente.
 La figura 5 muestra el rendimiento de lavado de AA560 en Omo Multi Acao en comparación con SP722, SP690 y Termamyl®, respectivamente.
- 15 La figura 6 muestra el rendimiento de lavado de AA560 en Omo concentrado en comparación con SP722, SP690 y Termamyl®, respectivamente.
 La figura 7 muestra el rendimiento de lavado de AA560 en Ariel Futur líquido en comparación con SP722, SP690 y Termamyl®, respectivamente.

Descripción detallada de la invención

20

Fuente microbiana

- [0013] La alfa-amilasa alcalina de la invención se puede obtener de una cepa de *Bacillus*. Cepas preferidas son *Bacillus sp.* DSM 12649 (alfa-amilasa AA560) o *Bacillus sp.* DSM 12648 (alfa-amilasa AA349). Estas cepas fueron depositadas el 25 de enero de 1999 por los inventores, según las condiciones del tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a los fines del procedimiento en materia de patentes en la Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig DE.
- [0014] Dos cepas de *Escherichia coli* denominadas NN049467 y NN049470 que contienen los genes de alfa-amilasa clonados en los plásmidos pLiH1274 y pTVB299, respectivamente, han sido también depositadas el 7 de abril de 1999 según las condiciones del tratado de Budapest con la Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig DE, y se les ha dado los números de acceso DSM12761 y DSM12764, respectivamente.

Polipéptidos con actividad de alfa-amilasa

- [0015] Las alfa-amilasas (alfa-1,4-glucan-4-glucanohidrolasas, EC 3.2.1.1) constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de almidón y otros oligo y polisacáridos 1,4-glucosídicos lineales y ramificados. A efectos de la presente invención, la actividad de alfa-amilasa se determina usando el ensayo de Phadebas o el ensayo pNPG7 descritos más adelante en la sección "Materiales y métodos".

Homología de enzima

- [0016] En una primera realización, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 (es decir, el polipéptido maduro) y variantes de los mismos con al menos aproximadamente un 96%, preferiblemente al menos aproximadamente un 97%, más preferiblemente al menos aproximadamente un 98%, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 99% de identidad con los aminoácidos 1 a 485 de la SEC ID nº 2, que tienen actividad de alfa-amilasa (de ahora en adelante "polipéptidos homólogos") y que tienen un rendimiento de lavado mejorado en comparación con la alfa-amilasa progenitora tal y como se ha definido anteriormente. En una realización preferida, las variantes tienen una secuencia de aminoácidos que difiere en cinco aminoácidos, preferiblemente en cuatro aminoácidos, más preferiblemente en tres aminoácidos, incluso más preferiblemente en dos aminoácidos y de la forma más preferible en un aminoácido de los aminoácidos 1 a 485 de la SEC ID nº 2 o la SEC ID nº 4. Debe notarse que la SEC ID nº 2 y la SEC ID nº 4 son idénticas. Sin embargo, las secuencias de ADN, es decir, la SEC ID nº 1 y la SEC ID nº 3, respectivamente, que codifican la alfa-amilasa de la invención mostrada en la SEC ID nº 2 y la SEC ID nº 4 no son idénticas.

- [0017] La homología de la secuencia de aminoácidos se puede determinar como el grado de homología entre las dos secuencias que indica una derivación de la primera secuencia respecto de la segunda. La homología puede ser

determinada adecuadamente mediante programas informáticos conocidos en la técnica. Así, se puede usar GAP proporcionado en el paquete GCG versión 8 (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453) para un alineamiento de parejas de las secuencias y el cálculo del grado de identidad o grado de homología usando los ajustes por defecto. Los ajustes de gap pueden ser los siguientes parámetros: penalización de creación de gap de 5,0 y penalización de extensión de gap de 0,3.

Homología con alfa-amilasas de *Bacillus sp.* conocidas

[0018] Una búsqueda de homología de secuencias conocidas mostró homologías para las secuencias de la invención con varias amilasas de *Bacillus* en el rango del 65-95 % basándose en los aminoácidos, determinadas tal y como se ha descrito anteriormente.

[0019] Específicamente, las alfa-amilasas más homólogas encontradas son SP690 (SEC ID nº 1 de la patente estadounidense nº 5,856,164 que es homóloga aproximadamente en un 87%), SP722 (SEC ID nº 2 de la patente estadounidense nº 5, 856,164 que es homóloga aproximadamente en un 87%), la parte madura (es decir, los aminoácidos nº 31-516) de la alfa-amilasa obtenida de *Bacillus sp.* KSM-AP1378 descrita como la SEC ID nº 2 de WO 97/00324 que es homóloga aproximadamente en un 86%, y la alfa-amilasa descrita en Tsukamoto et al., (1988), Biochem. Biophys. Res Commun. 151, p. 25-33 (mostrada como la secuencia "707 amy" en el alineamiento de la fig. 1) que es homóloga aproximadamente en un 95% a la SEC ID nº 2 y la SEC ID nº 4, determinadas como se describe anteriormente.

[0020] También se describen en este documento polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 o la SEC ID nº 4 o variantes alélicas de las mismas; o fragmentos de los mismos que tienen actividad de alfa-amilasa.
La SEC ID nº 2 y la SEC ID nº 4 muestran la parte madura de las alfa-amilasas alcalinas de la invención.

[0021] Un fragmento de la SEC ID nº 2 o la SEC ID nº 4 son polipéptidos que tienen uno o más aminoácidos eliminados del término amino y/o carboxilo de esta secuencia de aminoácidos.

[0022] Una variante alélica denota dos o más formas alternativas cualesquiera de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de mutación, y puede resultar en el polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0023] Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos homólogos pueden diferir de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 o la SEC ID nº 4 en una inserción o delección de uno o varios residuos de aminoácidos y/o la sustitución de uno o varios residuos de aminoácidos por residuos de aminoácidos diferentes. Preferiblemente, los cambios en aminoácidos son de naturaleza menor, es decir, sustituciones conservadoras de aminoácidos que no afectan significativamente al plegado y/o la actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones del término amino o carboxilo, tales como un residuo de metionina amino-terminal; un péptido enlazante pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0024] Hay ejemplos de sustituciones conservadoras en el grupo de los aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Sustituciones de aminoácidos, que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y son descritas, p. ej., por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, Nueva York. Los cambios de ocurrencia más frecuente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly así como sus inversos.

[0025] También se describen polipéptidos aislados con actividad de alfa-amilasa que son codificados por secuencias de ácidos nucleicos que se hibridan bajo condiciones de astringencia media, preferiblemente condiciones de astringencia media-alta, más preferiblemente condiciones de astringencia alta y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy alta con una sonda de ácido nucleico que se hibrida bajo las mismas condiciones con (i) la secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID nº 1 o la SEC ID nº 3, (ii) la secuencia de ADNc de la SEC ID nº 1 o la SEC ID nº 3, (iii) una subsecuencia de (i) o (ii), o (iv) una cadena complementaria de (i), (ii) o (iii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York). La subsecuencia de la SEC ID nº 1 puede ser de al menos 100 nucleótidos o preferiblemente de al menos 200 nucleótidos. Además, la subsecuencia puede codificar un fragmento de polipéptido, que tiene actividad de alfa-amilasa. Los polipéptidos también pueden ser variantes alélicas o fragmentos de los polipéptidos que tienen actividad de alfa-amilasa.

[0026] La secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID nº 1 o la SEC ID nº 3 o una subsecuencia de las mismas, así

como la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 o la SEC ID nº 4 o un fragmento de las mismas, se puede usar para diseñar una sonda de ácidos nucleicos para identificar y clonar ADN que codifica polipéptidos con actividad de alfa-amilasa de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para hibridación con el ADN genómico o el ADNc del género o especie de interés, siguiendo procedimientos estándar de Southern blot, para identificar y aislar el gen correspondiente en ellos. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deberían ser al menos de 15, preferiblemente al menos de 25 y más preferiblemente al menos de 35 nucleótidos de longitud. Sondas más largas también pueden ser usadas. Pueden usarse sondas tanto de ADN como de ARN. Las sondas se marcan típicamente para la detección del gen correspondiente (por ejemplo, con ³²P, ³H, ³⁵S, biotina o avidina). Tales sondas están incluidas en la presente invención.

[0027] Así, una biblioteca de ADN genómico o de ADNc preparado a partir de tales otros organismos se puede seleccionar para el ADN, que se hibrida con las sondas anteriormente descritas y que codifica un polipéptido con actividad de alfa-amilasa. El ADN genómico u otro tipo de ADN de tales otros organismos se pueden separar por electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado pueden ser transferidos e inmovilizados en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que es homólogo a la SEC ID nº 1 o la SEC ID nº 3 o subsecuencias de las mismas, el material portador se usa en un Southern blot.

[0028] Para los fines que se describen en este documento, la hibridación indica que la secuencia de ácidos nucleicos se hibrida con una sonda de ácidos nucleicos que corresponde a la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en la SEC ID nº 1 o la SEC ID nº 3, su cadena complementaria o subsecuencias de la misma, bajo condiciones de astringencia de media a muy alta. Las moléculas con las que la sonda de ácidos nucleicos se hibrida bajo estas condiciones son detectadas usando una película radiográfica.

[0029] En otro aspecto descrito, la sonda de ácidos nucleicos es la secuencia de ácidos nucleicos contenida en los plásmidos pLiH1274 (AA349) o pTVB299 (AA560) que están contenidos en la *Escherichia coli* DSM12761 o la *Escherichia coli* DSM12764, respectivamente, o donde la secuencia de ácidos nucleicos codifica un polipéptido con actividad de alfa-amilasa ácida de la invención y mostrada en la SEC ID nº 2 y la SEC ID nº 4, respectivamente.

[0030] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, se definen condiciones de astringencia de media a muy alta como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3% de SDS, 200 micro g/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, 35% de formamida para astringencias medias y medias-altas o 50% de formamida para astringencias altas y muy altas, siguiendo procedimientos estándar de Southern blot.

[0031] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador es finalmente lavado tres veces durante 15 minutos cada una usando 2 x SSC, 0,2% de SDS preferiblemente al menos a 55°C (astringencia media), preferiblemente al menos a 60°C (astringencia media-alta), más preferiblemente al menos a 65°C (astringencia alta) y de la forma más preferible al menos a 70°C (astringencia muy alta).

[0032] Para sondas cortas que son de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia se definen como prehibridación, hibridación y post-hibridación de lavado a 5-10°C por debajo de la T_f calculada usando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390) 0,9 M de NaCl, 0,09 M de Tris-HCl pH 7,6, 6 mM de EDTA, 0,5% de NP-40, solución de Denhardt 1X, 1 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de fosfato monobásico de sodio, 0,1 mM de ATP y 0,2 mg de ARN de levadura por ml siguiendo procedimientos estándar de Southern blot.

[0033] Para sondas cortas que son de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, el material portador se lava una vez en 6X SSC más 0,1% SDS durante 15 minutos y dos veces durante 15 minutos cada una usando 6X SSC a 5-10°C por debajo de la T_f calculada.

[0034] En una tercera realización, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados, es decir, los polipéptidos mostrados en la SEC ID nº 2 o la SEC ID nº 4, con las siguientes propiedades fisicoquímicas:

[0035] Un pH óptimo (ver fig. 2), determinado usando el método de Phadebas (37°C), se encontró en el rango entre pH 8 y 9, más precisamente alrededor de 8,5.

[0036] Una temperatura óptima (ver fig. 3), determinada utilizando el método Phadebas (pH 9,0), se encontró en el rango entre 55 y 65°C, más precisamente alrededor de 60°C.

[0037] Un pI entre 7 y 8 (ver tabla 1 en el ejemplo 6) se determinó mediante isoelectroenfoque (Pharmacia, Ampholine, pH 3,5-9,3).

[0038] Se determinó una actividad específica (ver tabla 1 del ejemplo 6) de 35.000 NU/mg usando el método de Phadebas y de 6.000 NU/mg usando el método pNPG7.

[0039] Los polipéptidos descritos en este documento tienen al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos un %, incluso más preferiblemente al menos 80%, incluso más preferiblemente al menos 90% y de la forma más preferible al menos 100% de la actividad de alfa-amilasa del polipéptido maduro mostrado en la SEC ID nº 2 y la SEC ID nº 4.

[0040] Un polipéptido de la presente invención puede ser obtenido de microorganismos de cualquier género. A efectos de la presente invención, el término "obtenido de" según se utiliza en este documento en relación con una fuente dada, significará que el polipéptido codificado por la secuencia de ácidos nucleicos es producido por la fuente o por una célula en la que la secuencia de ácidos nucleicos de la fuente ha sido insertada.

[0041] Un polipéptido de la presente invención es un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano gram positivo tal como un polipéptido de *Bacillus*, p. ej., un polipéptido de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis*; o un polipéptido de *Streptomyces*, p. ej., un polipéptido de *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; o un polipéptido bacteriano gram negativo, p. ej., un polipéptido de *E. coli* o *Pseudomonas sp.*

[0042] En otra realización preferida, el polipéptido es un polipéptido de *Bacillus sp.*, en una realización más preferida, el polipéptido es un polipéptido de *Bacillus sp.* DSM 12648 o *Bacillus sp.* DSM 12649, p. ej., los polipéptidos con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 y la SEC ID nº 4, respectivamente.

[0043] Se debe entender que para las especies antes mencionadas, la invención abarca los estados perfectos e imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, p. ej., anamorfos, independientemente del nombre de especie por el que son conocidos. Expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de equivalentes apropiados.

[0044] Cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en varias colecciones de cultivo, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), la Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0045] Además, tales polipéptidos pueden ser identificados y obtenidos de otras fuentes que incluyen microorganismos aislados de la naturaleza (p. ej., suelos, abonos, agua, etc.) usando las sondas mencionadas anteriormente. Los métodos para aislar microorganismos de hábitats naturales son conocidos en la técnica. La secuencia de ácidos nucleicos puede ser luego obtenida de una manera similar seleccionando una biblioteca genómica o de ADNc de otro microorganismo.

Una vez que una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido ha sido detectada con la(s) sonda(s), la secuencia puede ser aislada o clonada utilizando técnicas conocidas por los expertos en la técnica (ver, p. ej., Sambrook et al., 1989, supra).

[0046] Tal y como se define en este documento, un polipéptido "aislado" es un polipéptido que está esencialmente libre de otros polipéptidos que no tienen alfa-amilasa, p. ej., al menos aproximadamente un 20% puro, preferiblemente al menos aproximadamente un 40% puro, más preferiblemente aproximadamente un 60% puro, incluso más preferiblemente aproximadamente un 80% puro, de la forma más preferible aproximadamente un 90% puro e incluso más preferiblemente aproximadamente un 95% puro, tal y como se determina mediante SDS-PAGE.

[0047] Los polipéptidos codificados por secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos divisibles de fusión donde otro polipéptido se fusiona al término N o al término C del polipéptido o fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado se produce fusionando una secuencia de ácidos nucleicos (o una parte de la misma) que codifica otro polipéptido, a una secuencia de ácidos nucleicos (o una parte de la misma) de la presente invención. Los métodos para producir polipéptidos de fusión son conocidos en la técnica e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estas estén en el marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo el control de los mismos promotor(es) y terminador.

[0048] El término "rendimiento mejorado de lavado" significa en el contexto del polipéptido con el aminoácido de la SEC ID nº 2 un rendimiento determinado bajo las condiciones de lavado descritas en el ejemplo 8, que es superior al de otras alfa-amilasas usadas para lavar, p. ej., SP690, SP722 y Termamyl®, o en el caso de una mutante/variante de la invención en comparación con la alfa-amilasa progenitora, es decir, la no mutada, tal como el esqueleto de alfa-amilasa sin sustituciones.

60 Alfa-amilasas mutantes

Propiedades alteradas de variantes de AA560

[0049] A continuación se discute la relación entre mutaciones, especialmente sustituciones y deleciones, que pueden ser introducidas en las alfa-amilasas AA560 o A349 de la invención, y alteraciones deseables en las propiedades con respecto a las de una alfa-amilasa progenitora.

5 [0050] La invención también se refiere a una mutante de las alfa-amilasas (es decir, variantes de alfa-amilasa) mostrada en la SEC ID nº 2. La alfa-amilasa mutante de la invención se caracteriza por el hecho de que uno o varios de los residuos del aminoácido metionina se intercambia(n) con cualquier residuo de aminoácido salvo Cys y Met. Así, según la invención, los residuos de aminoácidos para reemplazar el residuo del aminoácido metionina son los siguientes: Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val.

10 [0051] Una realización preferida de la alfa-amilasa mutante de la invención se caracteriza por el hecho de que uno o varios de los residuos del aminoácido metionina se intercambia(n) con un residuo de los aminoácidos Leu, Thr, Ala, Gly, Ser, Ile o Val, preferiblemente un residuo de los aminoácidos Leu, Thr, Ala o Gly. En esta realización se obtiene un nivel de actividad y una estabilidad muy satisfactorios en presencia de agentes oxidantes. Específicamente esto significa que una o varias de las metioninas en la siguiente posición pueden ser sustituidas o eliminadas usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo especialmente mutagénesis dirigida y barajado de genes. Las posiciones contempladas, usando la numeración de la SEC ID nº 2, son: 9, 10, 105, 116, 202, 208, 261, 309, 323, 382, 430 y 440.

15 [0052] En una realización preferida, la alfa-amilasa mutante de la invención se caracteriza por el hecho de que el residuo del aminoácido metionina en la posición 202 se intercambia con cualquier residuo de aminoácido esperado para Cys y Met, preferiblemente con Leu, Thr, Ala, Gly, Ser, Ile o Asp.

20 [0053] Otras mutaciones preferidas contempladas incluyen delección de uno, dos o más de los residuos de aminoácido R181, G182, D183 o G184, K185, G186 o sustituciones de uno o más de estos residuos. Una mutación preferida es la delección de D183-G184. Mutaciones particularmente relevantes son las sustituciones de G186 por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val. Una sustitución particularmente preferida es G186R.

25 [0054] También se contempla la sustitución de N195 por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val. Una sustitución particularmente interesante es N195F.

30 [0055] Las siguientes combinaciones de las mutaciones anteriormente mencionadas incluyen: delección de (D183-G184)+N195F, delección de (D183-G184)+G186R, delección de (D183-G184)+G186R+N195F y G186R+N195F.

Termoestabilidad aumentada

35 [0056] Las mutaciones que dan como resultado variantes de la invención, p. ej., que tienen termoestabilidad aumentada, en particular a pH ácido y/o a baja concentración de Ca^{2+} , incluyen mutaciones en las siguientes posiciones (usando la numeración de la alfa-amilasa AA560, es decir, SEC ID nº 2): R158, N174, G186, N195, N197, H210, E212, V214, V215, E216, K269 y N270.

40 [0057] En el contexto de la invención el término "pH ácido" significa un pH por debajo de 7,0, especialmente por debajo del rango de pH en el que se realizan normalmente los procesos de licuefacción de almidón industrial, que está entre pH 5,5 y 6,2.

45 [0058] En el contexto de la presente invención el término "concentraciones bajas de calcio" significa concentraciones por debajo del nivel normal usado en la licuefacción de almidón industrial. Las concentraciones normales varían dependiendo de la concentración de Ca^{2+} libre en el maíz. Normalmente se añade una dosificación que corresponde a 1 mM (40ppm) que junto con el nivel en el maíz da entre 40 y 60ppm de Ca^{2+} libre.

50 [0059] En el contexto de la invención el término "temperaturas altas" significa temperaturas entre 95°C y 160°C, especialmente en el rango de temperaturas en el que se realizan normalmente los procesos de licuefacción de almidón industrial, que está entre 95°C y 105°C.

55 [0060] Los inventores han encontrado ahora que la termoestabilidad, en particular a pH ácido y/o a baja concentración de Ca^{2+} , puede ser incrementada aún más combinando entre sí otras mutaciones que incluyen las mutaciones mencionadas anteriormente y/o I206.

[0061] Dichas "otras" mutaciones son las siguientes (con respecto a la alfa-amilasa AA560, SEC ID nº 2): N195, E212, E216, K269 e I206.

60 [0062] Dicha mutación puede ser además combinada con delecciones en una, preferiblemente en dos o incluso en tres posiciones, según se describe en WO 96/23873 (es decir, en las posiciones R181, G182, D183 y G184 en la SEC ID nº 2 en este documento).

[0063] Según la presente invención, se contemplan variantes de una alfa-amilasa AA560 progenitora con actividad de alfa-amilasa que comprenden mutaciones en dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete de las posiciones anteriores.

65 [0064] Debe enfatizarse que no solo se contemplan las alfa-amilasas AA560 mencionadas.

También las alfa-amilasas que tienen un grado de homólogos (idénticos) según se define más adelante están contempladas dentro del alcance de la presente invención.

[0065] Se puede mencionar aquí que los residuos de aminoácidos en las posiciones que corresponden a N195, I206, E212 y E216, respectivamente, en la SEC ID nº 2, constituyen residuos de aminoácidos que se conservan en numerosas alfa-amilasas tipo Termamyl, es decir, Termamyl® (alfa-amilasa de *B. licheniformis*). Así, p. ej., las posiciones correspondientes de los residuos en AA560 y Termamyl se pueden ver en el alineamiento en la Fig. 1 y en las tablas 1 y 2 a continuación.

Tabla 1

Alfa-amilasa tipo Termamyl					
<i>B. licheniformis</i> (Termamyl)	N190	I201	H205	E211	N265
AA560 (SEC ID nº5)	N195	I206	H210	E211	N270

Tabla 2

Alfa-amilasa tipo Termamyl						
SP690	R181,	G182,	T183,	G184,	K185,	A186
SP722	R181,	G182,	D183,	G184,	K185,	A186
AA560 (SEC ID nº 2)	R181,	G182,	D183,	G184,	K185,	G186

[0066] Las mutaciones de estos residuos de aminoácidos conservados son muy importantes en lo relativo a alterar las propiedades.

[0067] Cuando se usa la SEC ID nº 2 para numerar, se pueden hacer, según la invención, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete mutaciones en las siguientes posiciones para alterar las propiedades, en particular para aumentar la termoestabilidad a pH ácido y/o a bajas concentraciones de Ca²⁺ (con respecto a la SEC ID nº 2 en este documento):

- 1: R181*, G182*, D183*, G184*;
- 2: N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- 3: I206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- 4: E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- 5: E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- 6: K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- 7: R181A,N,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V.

[0068] Está contemplado según la presente invención combinar tres, cuatro, cinco, seis o siete mutaciones.

[0069] Mutaciones específicas dobles según la invención son (usando la SEC ID nº 2 para la numeración):

- R181*/G182*/N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- G182*/T183*/N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- T183*/G184*/N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- T183*/G184*/R181A,N,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- R181*/G182*/I206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- G182*/T183*/I206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- T183*/G184*/I206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- R181*/G182*/E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- G182*/T183*/E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- T183*/G184*/E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- R181*/G182*/E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- G182*/T183*/E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- T183*/G184*/E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- R181*/G182*/K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- G182*/T183*/K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- T183*/G184*/K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V / I206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V / E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V / E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V / K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- I206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V / E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- I206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V / E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- I206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V / K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 - E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 - E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V.

5 [0070] En una realización preferida la variante comprende las siguientes mutaciones: N195F/K264S en la SEC ID nº 2 o en posiciones correspondientes en alfa-amilasas homólogas en un 96% tal y como se define en este documento. En otra realización la variante de la invención comprende las siguientes mutaciones: R181*/G182*/N195F en la SEC ID nº 2 o en posiciones correspondientes en otra alfa-amilasa homóloga. Dicha variante puede comprender además una sustitución en la posición E216Q.

10 Estabilidad mejorada de Ca²⁺ de la variante AA560 a pH 8-10,5

[0071] Estabilidad mejorada de Ca²⁺ significa que la estabilidad de la enzima ante el agotamiento de Ca²⁺ ha sido mejorada.

15 En el contexto de la presente invención; las mutaciones (incluyendo sustituciones y deleciones de aminoácidos) importantes, con respecto al logro de estabilidad de Ca²⁺ mejorada a alto pH, incluyen mutaciones y/o deleciones descritas anteriormente en la sección "termoestabilidad mejorada".

20 Mutaciones generales de la invención

[0072] Se puede preferir que una variante de la invención comprenda una o varias modificaciones además de aquellas descritas anteriormente. Así, puede ser beneficioso que uno o varios residuos de prolina presentes en la parte de la variante de alfa-amilasa que es modificada sea(n) sustituido(s) con un residuo diferente de la prolina, que puede ser cualquiera de los residuos posibles de origen natural diferentes de la prolina y que es preferiblemente una alanina, glicina, serina, treonina, valina o leucina.

[0073] Análogamente, se puede preferir que uno o varios residuos de cisteína presentes entre los residuos de aminoácidos con los cuales la alfa-amilasa progenitora es modificada sean sustituidos con un residuo que no sea cisteína tal como serina, alanina, treonina, glicina, valina o leucina.

[0074] Además, una variante de la invención puede – o bien como la única modificación, o bien en combinación con cualquiera de las anteriores modificaciones descritas – ser modificada para que una o varias Asp y/o Glu presentes en un fragmento de aminoácido, correspondiente al fragmento de aminoácido 190-214 de la SEC ID nº 2, sea sustituida por una Asn y/o Gln, respectivamente. También es de interés la sustitución, en la alfa-amilasa, de uno o varios de los residuos de Lys, presentes en un fragmento de aminoácido que corresponde al fragmento de aminoácido 190-214 de la SEC ID nº 2, por una Arg.

[0075] Se debe entender que la presente invención abarca variantes que incorporan dos o más de las modificaciones anteriormente descritas.

[0076] Además, puede ser beneficioso introducir mutaciones puntuales en cualquiera de las variantes descritas en este documento.

[0077] Las mutaciones pueden adecuadamente incluir mutaciones en las siguientes posiciones: Y133, L17, M202 y V214.

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

[0078] La secuencia de ADN que codifica una alfa-amilasa progenitora tal como se ha definido anteriormente puede ser aislada de cualquier célula o microorganismo que produce la alfa-amilasa en cuestión, usando varios métodos bien conocidos en la técnica. Primero, se debería construir una biblioteca de ADN genómico y/o de ADNc usando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la alfa-amilasa que va a ser estudiada. Luego, si la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa es conocida, se pueden sintetizar y usar sondas de oligonucleótidos homólogas marcadas para identificar clones que codifican alfa-amilasa de una librería genómica preparada a partir del organismo en cuestión. Alternativamente, una sonda de oligonucleótidos marcada que contiene secuencias homólogas a un gen de alfa-amilasa conocido podría usarse como sonda para identificar clones que codifican alfa-amilasa, usando condiciones de hibridación y lavado de astringencia más baja.

[0079] Otro método para identificar clones que codifican alfa-amilasa incluiría insertar fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformar bacterias que dan negativo de alfa-amilasa con la biblioteca de ADN genómico resultante, y luego depositar las bacterias transformadas sobre placas con agar que contengan un sustrato para alfa-amilasa, permitiendo de este modo a los clones expresar la alfa-amilasa que va a ser identificada.

[0080] Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la enzima se puede preparar sintéticamente por métodos estándar establecidos, p. ej., el método de la fosforamidita descrito por S.L. Beaucage y M.H. Caruthers (1981) o el método descrito por Matthes 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 vectores apropiados.

[0081] Finalmente, la secuencia de ADN puede mezclar origen genómico y sintético, mezclar origen sintético y de ADNc o mezclar origen genómico y de ADNc, preparada ligando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según sea apropiado, los fragmentos correspondientes a varias partes de la secuencia de ADN completa), conforme a técnicas estándar. La secuencia de ADN también se puede preparar mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4,683,202 o R.K. Saiki et al. (1988).

Mutagénesis dirigida

[0082] Una vez que una secuencia de ADN que codifica alfa-amilasa ha sido aislada y se han identificado sitios deseables para una mutación, se pueden introducir mutaciones utilizando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados; los nucleótidos mutantes se insertan durante la síntesis de oligonucleótidos. En un método específico, un gap monocatenario de ADN, que une la secuencia que codifica la alfa-amilasa, se crea en un vector que porta el gen de alfa-amilasa. Luego el nucleótido sintético, que lleva la mutación deseada, se anilla a una parte homóloga del ADN monocatenario. El gap restante es luego rellenado con ADN polimerasa I (fragmento de Klenow) y el constructo es ligado usando ligasa T4. Un ejemplo específico de este método se describe en Morinaga et al. (1984). US 4,760,025 describe la introducción de oligonucleótidos que codifican mutaciones múltiples realizando alteraciones menores en el casete. No obstante, se puede introducir una variedad incluso mayor de mutaciones en cualquier momento mediante el método Morinaga, ya que se pueden introducir una multitud de oligonucleótidos de varias longitudes.

[0083] Otro método para introducir mutaciones en secuencias de ADN que codifican alfa-amilasa se describe en Nelson y Long (1989). Este implica la generación en 3 pasos de un fragmento de PCR que contiene la mutación deseada, introducida usando una cadena de ADN sintetizada químicamente como uno de los cebadores en las reacciones PCR. Del fragmento generado por reacción en cadena de polimerasa, un fragmento de ADN que lleve la mutación puede ser aislado mediante escisión con endonucleasas de restricción y reinsertado en un plásmido de expresión.

Mutagénesis aleatoria

[0084] La mutagénesis aleatoria se realiza adecuadamente, o bien como mutagénesis aleatoria localizada o específica de la región en al menos tres partes del gen que traduce a la secuencia de aminoácidos en cuestión mostrada, o bien en el gen entero.

[0085] 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.

[0086] 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 termoestabilidad alterada o aumentada respecto a la progenitora, que comprende:

- (a) someter a una secuencia de ADN que codifica la alfa-amilasa progenitora a mutagénesis aleatoria,
- (b) expresar la secuencia de ADN mutada obtenida en el paso (a) en una célula huésped y
- (c) seleccionar células huésped que expresen una variante de alfa-amilasa que tenga una propiedad alterada (por ejemplo, termoestabilidad) con respecto a la alfa-amilasa progenitora.

[0087] El paso (a) del método anterior de la invención es preferiblemente llevado a cabo usando cebadores dopados.

[0088] Por ejemplo, la mutagénesis aleatoria se puede realizar usando un agente mutagenizante químico o físico adecuado, usando un oligonucleótido adecuado o sometiendo la secuencia de ADN a mutagénesis generada por PCR. Además, la mutagénesis aleatoria se puede realizar usando cualquier combinación de estos agentes mutagenizantes. El agente mutagenizante puede, p. ej., ser uno que induzca transiciones, transversiones, inversiones, mezclado, deleciones y/o inserciones.

[0089] Ejemplos de un agente físico o químico mutagenizante adecuado para el presente fin incluyen irradiación ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), O-metil hidroxilamina, ácido nitroso, etil metano sulfonato (EMS), bisulfito de sodio, ácido fórmico y análogos de nucleótidos. Cuando se usan tales agentes, la mutagénesis típicamente se realiza incubando la secuencia de ADN que codifica la enzima progenitora que va a ser mutagenizada, en presencia del agente mutagenizante escogido bajo condiciones adecuadas para que la mutagénesis tenga lugar, y seleccionando ADN mutado con las propiedades deseadas.

[0090] Cuando la mutagénesis se realiza usando un oligonucleótido, el oligonucleótido puede ser dopado o enriquecido con los tres nucleótidos no progenitores durante la síntesis del oligonucleótido, en las posiciones que van a ser cambiadas. El dopaje o enriquecimiento puede realizarse de modo que se eviten los codones para aminoácidos no deseados. El oligonucleótido dopado o enriquecido 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 ADN ligasa como se considere apropiado.

[0091] Preferiblemente, el dopaje se lleva a cabo usando "dopaje aleatorio constante", donde el porcentaje de tipo salvaje y mutación en cada posición está predefinido. Además, el dopaje se puede orientar hacia una preferencia por introducir ciertos nucleótidos y, de este modo, una preferencia por introducir uno o varios residuos específicos de aminoácidos. El dopaje se puede hacer, p. ej., para permitir la introducción de un 90% de tipo salvaje y un 10% de mutaciones en cada posición.

Una consideración adicional en la elección de un esquema de dopaje se basa en la genética así como en restricciones estructurales proteínicas. El esquema de dopaje se puede hacer usando el programa DOPE (ver sección "Materiales y métodos"), que, inter alia, asegura que se evite la introducción de codones de parada.

[0092] Cuando se usa la mutagénesis generada mediante PCR, un gen tratado, o bien químicamente, o bien no tratado, que codifica una alfa-amilasa progenitora está sujeto a PCR bajo condiciones que aumentan los errores de incorporación de nucleótidos (Deshler 1992; Leung et al., *Technique*, Vol.1, 1989, págs. 11-15).

[0093] Se puede usar una cepa mutágena de *E. coli* (Fowler et al., *Molec. Gen. Genet.*, 133, 1974, págs. 179-191), *S. cerevisiae* o cualquier otro organismo microbiano para la mutagénesis aleatoria del ADN que codifica la alfa-amilasa, p. ej., transformando un plásmido que contiene 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 a continuación transformado en el organismo de expresión.

[0094] La secuencia de ADN que se va a mutagenizar puede estar convenientemente presente en una biblioteca genómica o de ADNc preparada a partir de un organismo que expresa la alfa-amilasa progenitora. Alternativamente, la secuencia de ADN puede estar presente en un vector adecuado tal como un plásmido o un bacteriófago, que como tal puede ser incubado con el agente mutagenizante o de otro modo expuesto a él. El ADN que va a ser mutagenizado también puede estar presente en una célula huésped, o bien siendo integrado en el genoma de dicha célula, o bien estando presente en un vector albergado en la célula. Finalmente, el ADN que va a ser mutagenizado puede estar en forma aislada. Se debe entender que la secuencia de ADN que va a ser sometida a mutagénesis aleatoria es preferiblemente una secuencia de ADNc o de ADN genómico.

[0095] En algunos casos puede ser conveniente amplificar la secuencia de ADN mutada antes de realizar el paso de expresión b) o el paso de selección c). Tal amplificación se puede realizar conforme a métodos conocidos en la técnica, siendo el método preferido actualmente la amplificación generada por PCR usando oligonucleótidos cebadores preparados basándose en la secuencia de ADN o de aminoácidos de la enzima progenitora.

[0096] Posteriormente a la incubación con el agente mutagenizante o su exposición a él, el ADN mutado se expresa cultivando una célula huésped adecuada que porte la secuencia de ADN bajo condiciones que permitan 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 porte la secuencia de ADN que codifica la enzima progenitora durante el tratamiento de mutagénesis. Los siguientes son ejemplos de células huésped adecuadas: 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*.

[0097] La secuencia de ADN mutada puede comprender además una secuencia de ADN que codifica funciones que permiten la expresión de la secuencia de ADN mutada.

Mutagénesis aleatoria localizada

[0098] La mutagénesis aleatoria puede estar provechosamente localizada en una parte de la alfa-amilasa progenitora en cuestión. Esto puede, p. ej., ser beneficioso cuando se ha identificado que ciertas regiones de la enzima son de particular importancia para una propiedad dada de la enzima, y que al ser modificadas se prevé que den lugar a una variante que tiene propiedades mejoradas. Tales regiones pueden normalmente ser identificadas cuando la estructura terciaria de la enzima progenitora ha sido esclarecida y relacionada con la función de la enzima.

[0099] La mutagénesis aleatoria localizada o específica de región es convenientemente realizada usando técnicas de mutagénesis generada por PCR como se ha descrito anteriormente o cualquier otro método adecuado conocido en la técnica. Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la parte de la secuencia de ADN que va a ser modificada puede ser aislada, p. ej., mediante inserción en un vector adecuado, y dicha parte puede ser posteriormente sometida a mutagénesis usando cualquiera de los métodos de mutagénesis tratados anteriormente.

Métodos alternativos para proporcionar variantes de alfa-amilasa

[0100] Los métodos alternativos para proporcionar variantes de la invención incluyen el método de barajado de genes conocido en la técnica que incluye los métodos, p. ej., descritos en WO 95/22625 (de Affymax Technologies N.V.) y WO 96/00343 (de Novo Nordisk A/S).

Expresión de variantes de alfa-amilasa

5 [0101] Según la invención, una secuencia de ADN que codifica la variante producida por métodos descritos anteriormente, o por cualquier método alternativo conocido en la técnica, puede ser expresada, en la forma enzimática, usando un vector de expresión que incluye típicamente secuencias de control que codifican un promotor, un operador, un sitio de unión al ribosoma, una señal de inicio de traducción y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores.

10 [0102] El vector de expresión recombinante que porta la secuencia de ADN que codifica una variante de alfa-amilasa de la invención puede ser cualquier vector que pueda ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que va a ser introducida. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido, un bacteriófago o un elemento extracromosómico, minicromosoma o un cromosoma artificial. Alternativamente, el vector puede ser aquel que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se ha integrado.

20 [0103] En el vector, la secuencia de ADN debería estar operativamente conectada a una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped elegida y que puede ser obtenida de genes que codifican proteínas tanto homólogas como heterólogas a la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN que codifica 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 *dagA* de agarasa de *Streptomyces coelicolor*, los promotores del gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), los promotores del gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), los promotores de la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), 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 obtenidos del gen que codifica la TAKA amilasa de *A. oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *A. niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *A. niger*, glucoamilasa de *A. niger*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *A. oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae* o acetamidasa de *A. nidulans*.

30 [0104] El vector de expresión de la invención también puede comprender un terminador de transcripción adecuado y, en eucariotas, secuencias de poliadenilación conectadas operativamente a la secuencia de ADN que codifica la variante de alfa-amilasa de la invención. Las secuencias de terminación y poliadenilación pueden ser adecuadamente obtenidas de las mismas fuentes que el promotor.

35 [0105] El vector puede comprender además una secuencia de ADN que habilite al vector para replicarse en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de tales secuencias son los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

40 [0106] El vector también puede comprender un marcador seleccionable, p. ej., un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped, tal como los genes *dal* de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, o que confiere resistencia antibiótica tal como resistencia a la ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Además, el vector puede comprender marcadores de selección de *Aspergillus* tales como *amdS*, *argB*, *niaD* y *sC*, un marcador que produce resistencia a la higromicina, o la selección se puede lograr mediante cotransformación, p. ej., como se describe en WO 91/17243.

50 [0107] Aunque la expresión intracelular puede ser beneficiosa en algunos aspectos, p. ej., cuando se usan ciertas bacterias como células huésped, se prefiere generalmente 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 se desea, esta prerregión se puede sustituir por una prerregión o secuencia de señal diferente, convenientemente logrado sustituyendo las secuencias de ADN que codifican las respectivas prerregiones.

55 [0108] 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 vectores adecuados con la información necesaria para la replicación, son conocidos por expertos en la técnica (cf., por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor, 1989).

60 [0109] La célula de la invención, que comprende, o bien un constructo de ADN, o bien un vector de expresión de la invención tal y como se ha definido anteriormente, se usa provechosamente como célula huésped en 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, de manera conveniente integrando el constructo de ADN (en una o más copias) en el cromosoma huésped. Esta integración es generalmente considerada como una ventaja ya que es más probable que la secuencia de ADN se mantenga de forma estable en la célula. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped se puede realizar según los métodos convencionales, p. ej., por recombinación homóloga o heteróloga. Alternativamente, la célula puede ser transformada con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en conexión con los diferentes tipos de células huésped.

[0110] La célula de la invención puede ser una célula de un organismo superior tal como un mamífero o un insecto, pero es preferiblemente una célula microbiana, p. ej., una célula bacteriana o fúngica (incluyendo levadura).

5 [0111] 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, ser efectuada mediante transformación de protoplastos o usando células competentes de una manera conocida per se.

10 [0112] El organismo de levadura puede ser favorablemente seleccionado de una especie de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*. El hongo filamentoso puede pertenecer, de forma ventajosa, a una especie de *Aspergillus*, p. ej., *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*. Las células fúngicas se pueden transformar mediante un proceso que implica formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguida de regeneración de la pared celular de una manera conocida per se. Un procedimiento adecuado para la transformación de células huésped de *Aspergillus* se describe en EP 238 023.

15 [0113] Aún en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para producir una variante de alfa-amilasa de la invención, el cual comprende cultivar una célula huésped como se ha descrito anteriormente bajo condiciones propicias para la producción de la variante y recuperar la variante desde las células y/o medio de cultivo.

20 [0114] El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para crecer la célula huésped en cuestión y obtener la expresión de la variante de alfa-amilasa de la invención. Los medios adecuados están disponibles en proveedores comerciales o se pueden preparar según recetas publicadas (p. ej. como se describe en los catálogos de la American Type Culture Collection).

25 [0115] La variante de alfa-amilasa segregada desde las células huésped puede ser convenientemente recuperada del medio de cultivo mediante procedimientos bien conocidos, que incluyen 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, seguida del uso de procedimientos cromatográficos tales como cromatografía de intercambio de iones, cromatografía de afinidad o similares.

35 Secuencias de ácidos nucleicos

[0116] La presente invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos aisladas, que codifican un polipéptido de la presente invención. En una realización preferida, la secuencia de ácidos nucleicos se establece en la SEC ID nº 1. En otra realización más preferida, la secuencia de ácidos nucleicos es la secuencia contenida en el plásmido pLiH1274 o el plásmido pTVB299 que están contenidos en la *Escherichia coli* DSM12761 y *Escherichia coli* DSM12764, respectivamente.

40 En otra realización preferida, la secuencia de ácidos nucleicos es la región codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1. La presente invención también abarca secuencias de ácidos nucleicos que codifican un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 que difieren de la SEC ID nº 1 o la SEC ID nº 3 en virtud de la degeneración del código genético. También se describen las subsecuencias de la SEC ID nº 1 o la SEC ID nº 3 que codifican fragmentos de la SEC ID nº 2 o la SEC ID nº 4, respectivamente, que tienen actividad de alfa-amilasa.

[0117] Las subsecuencias de la SEC ID nº 1 o la SEC ID nº 3 son secuencias de ácidos nucleicos incluidas en la SEC ID nº 1 o la SEC ID nº 3 excepto que uno o varios nucleótidos de los extremos 5' y/o 3' han sido eliminados.

50 [0118] La presente invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos mutantes que comprenden al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1, en la que la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 485 de la SEC ID nº 2.

55 [0119] Las técnicas usadas para aislar o clonar una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen el aislamiento de ADN genómico, preparación de ADNc o una combinación de los mismos. La clonación de las secuencias de ácidos nucleicos de la presente invención de tal ADN genómico puede ser efectuada, p. ej., usando la bien conocida reacción en cadena de polimerasa (PCR) o la selección de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonado con características estructurales compartidas. Ver, p. ej., Innis et al., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Se pueden usar otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tales como la reacción en cadena de ligasa (LCR), la transcripción activada ligada (LAT) y la amplificación de ácidos nucleicos basada en secuencias (NASBA). La secuencia de ácidos nucleicos puede ser clonada de una cepa de *Bacillus* u otro organismo relacionado y así, p. ej., puede ser una variante alélica o de especie de la región codificante de polipéptidos de la secuencia de ácidos nucleicos.

65 [0120] El término "secuencia de ácidos nucleicos aislada" tal y como se utiliza en este documento se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que está esencialmente libre de otras secuencias de ácidos nucleicos, p. ej., al menos

aproximadamente un 20% puro, preferiblemente al menos aproximadamente un 40% puro, más preferiblemente al menos aproximadamente un 60%, puro incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 80% puro y de la forma más preferible al menos aproximadamente un 90% puro tal y como se determina mediante electroforesis de agarosa. Por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos aislada se puede obtener por procedimientos de clonación estándar usados en ingeniería genética para recolocar la secuencia de ácidos nucleicos desde su ubicación natural a un sitio diferente dónde será reproducida. Los procedimientos de clonación pueden implicar escisión y aislamiento de un fragmento de ácido nucleico deseado que comprende la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido, inserción del fragmento en una molécula de vector e incorporación del vector recombinante en una célula huésped donde copias múltiples o clones de la secuencia de ácidos nucleicos serán replicadas. La secuencia de ácidos nucleicos puede ser de origen genómico, de ADNc, de ARN, semisintético, sintético o cualquier combinación de los mismos.

Homología de la secuencia de ADN que codifica la enzima

[0121] También se describen en este documento secuencias de ácidos nucleicos que tienen un grado de homología con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1 (es decir, nucleótidos 1 a 1458) o la SEC ID nº 3 (es decir, nucleótidos 1 a 1458) de al menos aproximadamente un 96% de homología a nivel del ADN, preferiblemente al menos aproximadamente un 97%, preferiblemente al menos aproximadamente un 98%, más preferiblemente al menos aproximadamente un 99% de homología, que codifican un polipéptido activo.

[0122] La homología de la secuencia de ADN se puede determinar como el grado de identidad entre las dos secuencias que indica una derivación de la primera secuencia respecto de la segunda. La homología puede ser adecuadamente determinada mediante programas informáticos conocidos en la técnica tales como GAP proporcionado en el paquete de programas GCG (descrito anteriormente). Así, GAP GCGv8 se puede utilizar con los siguientes parámetros por defecto: penalización de creación de GAP de 5,0 y penalización de extensión de GAP de 0,3, matriz de puntuación por defecto. GAP usa el método de Needleman/Wunsch/Sellers para hacer alineamientos.

[0123] La modificación de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido. El término "sustancialmente similares" al polipéptido se refiere a formas no naturales del polipéptido. Estos polipéptidos pueden diferir de alguna manera diseñada del polipéptido que ha sido aislado de su fuente nativa, p. ej., variantes que difieren en la actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo o similares. La secuencia variante se puede construir basándose en la secuencia de ácidos nucleicos presentada como el polipéptido que codifica parte de la SEC ID nº 1 o la SEC ID nº 3, p. ej., una subsecuencia de la misma, y/o introduciendo sustituciones de nucleótidos que no producen otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de ácidos nucleicos, pero que corresponden al uso de codones del organismo huésped destinado a la producción de la enzima, o introduciendo sustituciones de nucleótidos que pueden producir una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de la sustitución de nucleótidos, ver, p. ej., Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

[0124] Será aparente a los expertos en la técnica que tales sustituciones pueden hacerse fuera de las regiones críticas para la función de la molécula y aun así producir un polipéptido activo. Residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificado por la secuencia de ácidos nucleicos aislada de la invención, y por lo tanto preferiblemente no sujetos a sustitución, pueden ser identificados según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis por barrido de alanina (ver, p. ej., Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En esta última técnica, las mutaciones se introducen en cada residuo positivamente cargado en la molécula, y a las moléculas mutantes resultantes se les realiza un ensayo de actividad [enzimática] para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Se pueden determinar también sitios de interacción enzima-sustrato mediante análisis de la estructura tridimensional tal y como se determinan mediante técnicas tales como análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcaje por fotoafinidad (ver, p. ej., de Vos et al., 1992, Science 255: 306-312; Smith et al., 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Letters 309: 59-64).

[0125] También se describen en este documento secuencias de ácidos nucleicos aisladas que codifican un polipéptido de la presente invención, que se hibridan bajo condiciones de astringencia media, condiciones de astringencia preferiblemente media-alta, condiciones de astringencia más preferiblemente alta y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy alta con una sonda de ácidos nucleicos que se hibrida bajo las mismas condiciones con la secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID nº 1 o la SEC ID nº 3 o su cadena complementaria; o variantes alélicas y subsecuencias de la misma (Sambrook et al., 1989, supra), tal y como se define en este documento.

[0126] También se describen en este documento secuencias de ácidos nucleicos aisladas identificadas mediante (a) hibridación de un ADN bajo condiciones de astringencia media, media-alta, alta o muy alta con la secuencia de la SEC ID nº 1 o la SEC ID nº 3, o sus cadenas complementarias, o una subsecuencia de las mismas; y (b) aislamiento de la secuencia de ácidos nucleicos. La subsecuencia es preferiblemente una secuencia de al menos 100 nucleótidos tal como una secuencia que codifica un fragmento de polipéptido que tiene actividad de alfa-amilasa.

Métodos para producir secuencias de ácidos nucleicos mutantes

[0127] La presente invención se refiere además a métodos para producir una secuencia de ácidos nucleicos mutante, que comprende introducir al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID n° 1 o una subsecuencia de la misma, donde la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica un polipéptido que consta del 1 al 485 de la SEC ID n° 2.

[0128] La introducción de una mutación en la secuencia de ácidos nucleicos para intercambiar un nucleótido por otro nucleótido se puede realizar por mutagénesis dirigida usando cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Particularmente útil es el procedimiento que utiliza un vector de ADN bicatenario superenrollado con un inserto de interés y dos cebadores sintéticos que contienen la mutación deseada. Los oligonucleótidos cebadores, cada uno complementario a cadenas opuestas del vector, se extienden durante la variación cíclica de la temperatura mediante Pfu ADN polimerasa. En la incorporación de los cebadores, se genera un plásmido mutado que contiene unos cortes en bisel. Después del ciclo de temperatura, el producto es tratado con *DpnI*, que es específico para ADN metilado y hemimetilado para asimilar el molde de ADN parental y para seleccionar el ADN sintetizado que contiene mutaciones.

[0129] Se pueden usar también otros procedimientos conocidos en la técnica. Estos otros procedimientos incluyen transposición de genes, p. ej., como se describe en WO 95/22625 (de Affymax Technologies N.V.) y WO 96/00343 (de Novo Nordisk A/S).

Constructos de ácidos nucleicos

[0130] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención operativamente enlazada a una o varias secuencias de control, que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control. Se debe entender que la expresión incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitándose a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0131] "Constructo de ácidos nucleicos" se define en este documento como una molécula de ácido nucleico, o bien unicatenaria, o bien bicatenaria, que es aislada de un gen de origen natural o que ha sido modificada para contener segmentos de ácidos nucleicos que se combinan yuxtaponen de una manera que de otra forma no existiría en la naturaleza. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término casete de expresión cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene todas las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención. El término "secuencia codificante" es definido aquí como una parte de una secuencia de ácidos nucleicos que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los límites de la secuencia codificante están generalmente determinados por un sitio de unión del ribosoma (procariotas) o por el codón de inicio ATG (eucariotas) localizado justo corriente arriba del marco de lectura abierto en el extremo 5' del ARNm y una secuencia terminadora de transcripción localizada justo corriente abajo del marco de lectura abierto en el extremo 3' del ARNm. Una secuencia codificante puede incluir, pero no está limitada a, ADN, ADNc y secuencias de ácidos nucleicos recombinantes.

[0132] Una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica un polipéptido de la presente invención se puede manipular en una variedad de maneras para garantizar la expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia de ácidos nucleicos antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias de ácidos nucleicos usando métodos de ADN recombinante se conocen bien en la técnica.

[0133] El término "secuencias de control" es definido en este documento para incluir todos los componentes que son necesarios o beneficiosos para la expresión de un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o extranjera a la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido. Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Se pueden proporcionar enlazadores a las secuencias de control con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la unión de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido. El término "operativamente enlazado" se define en este documento como una configuración donde una secuencia de control es apropiadamente colocada en una posición relativa a la secuencia codificante de la secuencia de ADN de manera que la secuencia de control dirige la expresión de un polipéptido.

Secuencia promotora

[0134] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, una secuencia de ácidos nucleicos que es reconocida por una célula huésped para la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcionales, que median en la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de ácidos nucleicos que muestre actividad transcripcional en la célula huésped elegida incluyendo

promotores mutantes, truncados e híbridos, y se puede obtener de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares tanto homólogos como heterólogos a la célula huésped.

5 [0135] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención, especialmente en una célula huésped bacteriana, son los promotores obtenidos del operón lac de *E. coli*, el gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*), el gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (*sacB*), el gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), el gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*), el gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*), el gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (*penP*), los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus* y el gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731), así como el promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21-25). Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Scientific American, 1980, 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, supra.

15 Secuencia terminadora

[0136] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora adecuada de transcripción, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está operativamente enlazada al terminal 3' de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped elegida se puede utilizar en la presente invención.

20 Péptido señal

[0137] La secuencia de control también puede ser una región codificante de péptido señal que codifica una secuencia de aminoácidos enlazada al término amino de un polipéptido y dirige el polipéptido codificado hacia la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de ácidos nucleicos puede contener intrínsecamente una región codificante de péptido señal naturalmente enlazada dentro del marco de lectura de traducción con el segmento de la región codificante, que codifica el polipéptido segregado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región codificante de péptido señal que sea extranjera a la secuencia codificante. La región codificante de péptido señal extranjera puede ser requerida donde la secuencia codificante no contenga de manera natural una región codificante de péptido señal. Alternativamente, la región codificante extranjera de péptido señal puede simplemente reemplazar a la región codificante natural de péptido señal para potenciar la secreción del polipéptido.

[0138] No obstante, cualquier región codificante de péptido señal que dirija el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula huésped elegida, se puede utilizar en la presente invención.

[0139] Regiones codificantes del péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las regiones codificantes de péptido señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (*nprT*, *nprS*, *nprM*) y *Bacillus subtilis* *prsA*. Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.

45 Sistema regulador

[0140] Puede también ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido en relación con el crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son los que causan que la expresión del gen se active o desactive, en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, con la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas operadores lac, tac y trp. En levadura se puede usar el sistema ADH2 o sistema GAL1. En hongos filamentosos se puede usar el promotor de TAKA alfa-amilasa, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estos incluyen el gen de dehidrofolato reductasa, que es amplificado en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que son amplificados con metales pesados. En estos casos, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido estaría operativamente enlazada con la secuencia reguladora.

55 Vectores de expresión

[0141] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención, un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Las diferentes secuencias de ácidos nucleicos y de control anteriormente descritas se pueden juntar para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido en tales sitios. Alternativamente, la secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención se puede expresar insertando la secuencia de ácidos nucleicos o un constructo de ácidos nucleicos que comprenda la secuencia en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector, de modo que la secuencia codificante esté operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

5 [0142] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que pueda ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y pueda provocar la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector debe ser introducido. Los vectores pueden ser plásmidos lineales o circulares cerrados.

10 [0143] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser aquel que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en el(los) que ha sido integrado. Además, se puede usar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos, que juntos contienen el ADN total que va a ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

15 [0144] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o más marcadores seleccionables, que permiten la fácil selección de células transformadas. Una etiqueta seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares. Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tal como resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Marcadores adecuados para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Un marcador seleccionable para usar en una célula huésped fúngica filamentosa puede ser seleccionado del grupo que incluye, pero no se limita a, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hygB* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa), *trpC* (antranilato sintasa), así como equivalentes de los mismos. Se prefieren para usar en una célula de *Aspergillus* los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

20 [0145] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o varios elementos que permiten la integración estable del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independientemente del genoma de la célula.

30 [0146] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede apoyarse en la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración estable del vector en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias adicionales de ácidos nucleicos para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped. Las secuencias adicionales de ácidos nucleicos permiten que el vector se integre en el genoma de la célula huésped en una o varias ubicaciones precisas en el(los) cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener preferiblemente un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 1.500 pares de bases, preferiblemente de 400 a 1.500 pares de bases y de la forma más preferible de 800 a 1.500 pares de bases, que son altamente homólogos a la secuencia diana correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias no codificantes o codificantes de ácidos nucleicos. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

45 [0147] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permite al vector replicarse de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAM β 1 que permiten la replicación en *Bacillus*. Ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6. El origen de replicación puede ser aquel que tenga una mutación que haga su funcionamiento termosensible en la célula huésped (ver, p. ej., Ehrlich, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1433).

50 [0148] Se puede insertar más de una copia de una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención en la célula huésped para aumentar la producción del producto génico. Se puede obtener un aumento en el número de copias de la secuencia de ácidos nucleicos integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable en la secuencia de ácidos nucleicos, donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y de este modo copias adicionales de la secuencia de ácidos nucleicos, pueden ser seleccionadas para cultivar las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

60 [0149] Los procedimientos usados para unir los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son conocidos por los expertos en la materia (ver, p. ej., Sambrook et al., 1989, supra).

Células huésped

[0150] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos de la invención, las cuales son usadas provechosamente en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector que comprende una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención se introduce en una célula huésped para que el vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector autorreplicante extracromosómico tal y como se ha descrito anteriormente.

[0151] El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

[0152] La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, p. ej., un procariota, o un microorganismo no unicelular, p. ej., un eucariota.

[0153] Células unicelulares útiles son las células bacterianas tales como bacterias gram positivas que incluyen, pero no se limitan a, una célula de *Bacillus*, p. ej., *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*; o una célula de *Streptomyces*, p. ej., *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas sp.* En una realización preferida, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. En otra realización preferida, la célula de *Bacillus* es un *Bacillus* alcalófilo.

[0154] La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana puede, por ejemplo, ser efectuada mediante transformación de protoplastos (ver, p. ej., Chang y Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), usando células competentes (ver, p. ej., Young and Spizizin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829, o Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), electroporación (ver, p. ej., Shigekawa and Dower, 1988 *Biotechniques* 6: 742-751) o conjugación (ver, p. ej., Koehler and Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

Métodos de producción

[0155] También se describen en este documento métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprenden (a) cultivar una cepa, que en su forma de tipo salvaje es capaz de producir el polipéptido, para producir un sobrenadante que comprenda el polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido. Preferiblemente, la cepa es del género *Bacillus sp.*

[0156] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprenden (a) cultivar una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

[0157] También se describen en este documento métodos para producir un polipéptido de la presente invención que comprenden (a) cultivar una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido, donde la célula huésped comprende una secuencia de ácidos nucleicos mutante con al menos una mutación en la región codificante del polipéptido maduro de la SEC ID n° 1 o la SEC ID n° 3, donde la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 485 de la SEC ID n° 2 o la SEC ID n° 4, y (b) recuperar el polipéptido.

Composiciones

[0158] En aun otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a composiciones que incluyen una alfa-amilasa o una variante de la misma de la presente invención. Preferiblemente, las composiciones están enriquecidas con una alfa-amilasa o variante de la misma de la presente invención. En el presente contexto, el término "enriquecido" indica que la actividad de alfa-amilasa de la composición ha sido aumentada, p. ej., con un factor de enriquecimiento de 1,1.

[0159] La composición puede comprender un polipéptido de la invención como componente enzimático principal, p. ej., una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender múltiples actividades enzimáticas, tales como aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glucosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasas. La(s) enzima(s) adicional(es) puede(n) ser producible(s) mediante un microorganismo del género *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*; o *Trichoderma humicola*, preferiblemente *Humicola insolens*; o *Fusarium*, preferiblemente *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium*

sambucinum, Fusarium sarcochroum, Fusarium sulphureum, Fusarium toruloseum, Fusarium trichothecioides o Fusarium venenatum.

5 [0160] Las composiciones de polipéptido pueden ser preparadas conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de líquido o de composición seca. Por ejemplo, la composición de polipéptido puede estar en forma de granulado o microgranulado. El polipéptido que va a ser incluido en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

10 [0161] Más adelante se dan ejemplos de usos preferidos de las composiciones del polipéptido de la invención. La dosificación de la composición del polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las que la composición es usada se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

Aplicaciones Industriales

15 [0162] Debido a su actividad a valores alcalinos de pH, las alfa-amilasas de la invención son muy adecuadas para usarse en una variedad de procesos industriales, en particular la enzima encuentra aplicaciones potenciales como componente en detergentes, p. ej., lavandería, lavavajillas y composiciones detergentes de limpieza de superficies duras, pero también puede ser útil para descolado de tejidos, telas y prendas, fabricación de cerveza o destilería, en la producción de pulpa y de papel, y adicionalmente en la producción de edulcorantes y etanol, tales como combustible, 20 bebidas y etanol industrial, a partir de almidón o de granos enteros.

Conversión de almidón

25 [0163] Procesos convencionales de conversión de almidón, tales como procesos de licuefacción y de sacarificación, se describen, p. ej., en la patente estadounidense nº 3,912,590 y Publicaciones de Patentes Europeas Nos. 252,730 y 63,909, incorporados por referencia en este documento.

Producción de pulpa y papel

30 [0164] La alfa-amilasa alcalina de la invención también se puede usar en la producción de materiales lignocelulósicos, tales como pulpa, papel y cartón, a partir de papel y cartón de desecho reforzado con almidón, especialmente donde el repulpado ocurre a pH por encima de 7 y donde las amilasas facilitan la desintegración del material de desecho a través de la degradación del almidón de refuerzo. La alfa-amilasa de la invención es especialmente útil en un proceso para producir pasta de papel a partir de papel impreso recubierto de almidón. El proceso se puede realizar como se describe 35 en WO 95/14807, que comprende los pasos siguientes:

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

40 [0165] Las alfa-amilasas de la invención también pueden ser muy útiles en la modificación de almidón allí donde se use almidón enzimáticamente modificado en la fabricación de papel junto con productos de relleno alcalinos tales como carbonato cálcico, caolín y arcillas. Con las alfa-amilasas alcalinas de la invención se hace posible modificar el almidón en presencia del producto de relleno permitiendo así un proceso integrado más simple.

Descolado de tejidos, telas y prendas

[0166] Una alfa-amilasa de la invención también puede ser muy útil en el descolado textil, de tejidos o de prendas. En la industria del tratamiento textil, las alfa-amilasas se usan generalmente como productos auxiliares en el proceso de descolado para facilitar la eliminación de la cola con contenido de almidón, que ha servido como recubrimiento de 50 protección en los hilos de trama durante la confección. La eliminación completa del recubrimiento de almidón después de la confección es importante para asegurar resultados óptimos en los procesos posteriores, donde el tejido es descrudado, blanqueado y teñido. Se prefiere la descomposición enzimática del almidón porque no conlleva ningún efecto nocivo en la materia fibrosa. Para reducir costes de procesado e incrementar la producción de molienda, el tratamiento de descolado se combina a veces con los pasos de descrudado y blanqueo. En esos casos, productos auxiliares no enzimáticos tales como bases o agentes oxidantes se usan típicamente para descomponer el almidón, 55 debido a que las alfa-amilasas tradicionales no son muy compatibles con niveles altos de pH y agentes blanqueadores. La descomposición no enzimática de la cola de almidón produce algún daño en las fibras debido a los agresivos productos químicos usados. Por consiguiente, sería deseable usar las alfa-amilasas de la invención ya que estas tienen un rendimiento mejorado en soluciones alcalinas. Las alfa-amilasas pueden ser utilizadas solas o en combinación con una celulasas cuando se descola tejido o tela que contiene celulosa. 60

[0167] Los procesos de descolado y blanqueo son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, tales procesos son descritos en WO 95/21247, Patente estadounidense 4,643,736 y EP 119,920, incorporados mediante referencia en este documento.

65 [0168] Productos disponibles comercialmente para descolado incluyen Aquazyme® y Aquazyme® Ultra de Novo

Nordisk A/S.

Fabricación de cerveza

- 5 [0169] Las alfa-amilasas de la invención también pueden ser muy útiles en un proceso de fabricación de cerveza; típicamente, las alfa-amilasas serán añadidas durante el proceso de maceración.

Composiciones detergentes

- 10 [0170] La enzima de la invención puede ser añadida y así convertirse en un componente de una composición detergente.

- 15 [0171] La composición detergente de la invención puede por ejemplo ser formulada como una composición detergente a mano o a máquina que incluye una composición de aditivos de lavandería adecuada para el pretratamiento de tejidos manchados y una composición suavizante de tejidos con enjuague añadido, o ser formulada como una composición detergente para usar en operaciones generales de limpieza doméstica de superficies duras, o ser formulada para operaciones de lavado de vajillas a mano o a máquina.

- 20 [0172] En un aspecto específico, la invención proporciona un aditivo de detergente que comprende la enzima de la invención. El aditivo de detergente, así como la composición detergente, puede comprender una o varias enzimas adicionales tales como una proteasa, una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasa, una oxidasa, p. ej., una lacasa, y/o una peroxidasa.

- 25 [0173] En general las propiedades de la(s) enzima(s) elegida(s) deberían ser compatibles con el detergente seleccionado (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.) y la(s) enzima(s) debería(n) estar presente(s) en cantidades eficaces.

- 30 [0174] Proteasas: las proteasas adecuadas incluyen aquellas de origen animal, vegetal o microbiano. Se prefiere el origen microbiano. Se incluyen mutantes químicamente modificadas o creadas genéticamente a partir de proteínas. La proteasa puede ser una serina proteasa o una metaloproteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa tipo tripsina. Ejemplos de proteasas alcalinas son las subtilisin, especialmente aquellas derivadas de *Bacillus*, p. ej., subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (descritas en WO 89/06279). Ejemplos de proteasas tipo tripsina son la tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino) y la proteasa de *Fusarium* descritas en WO 89/06270 y WO 94/25583.

- 35 [0175] Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116 y WO 98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o varias de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 y 274.

- 40 [0176] Las enzimas proteásicas preferidas disponibles comercialmente incluyen Alcalase®, Savinase®, Primase®, Duralase®, Esperase® y Kannase® (Novo Nordisk A/S), Maxatase®, Maxacal®, Maxapem®, Properase®, Purafect®, Purafect OxP®, FN2® y FN3® (Genencor International Inc.).

- 45 [0177] Lipasas: las lipasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes químicamente modificadas o creadas genéticamente a partir de proteínas. Ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo *Thermomyces*), p. ej., de *H. lanuginosa* (*T. Lanuginosus*) tal y como se describe en EP 258 068 y EP 305 216 o de *H. insolens* tal y como se describe en WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, p. ej., de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP 218 272), *P. cepacia* (EP 331 376), *P. stutzeri* (GB 1,372,034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. cepa SD 705 (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, p. ej., de *B. subtilis* (Dartois et al. (1993), *Biochemica et Biophysica Acta*, 1131,253-360), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422).

- 50 [0178] Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como los descritos en WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202.

- 55 [0179] Las enzimas de lipasa preferidas disponibles comercialmente incluyen Lipolase™ y Lipolase Ultra™ (Novo Nordisk A/S).

- 60 [0180] Amilasas: las amilasas adecuadas (alfa y/o beta) incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes químicamente modificadas o creadas genéticamente a partir de proteínas. Las amilasas incluyen, p. ej., alfa-amilasas obtenidas de *Bacillus*, p. ej., una cepa especial de *B. licheniformis*, descrita con más detalle en GB 1,296,839. Ejemplos de alfa-amilasas útiles son las variantes descritas en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873 y WO 97/43424, especialmente las variantes con sustituciones en una o varias de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444.

[0181] Las amilasas disponibles comercialmente son Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ y BAN™ (Novo Nordisk A/S), Rapidase™ y Purastar™ (de Genencor International Inc.).

5 [0182] Celulasas: las celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes químicamente modificadas o creadas genéticamente a partir de proteínas. Celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, p. ej., las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 y WO 89/09259.

10 [0183] Celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios para el cuidado del color. Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397 y WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa tales como los descritos en WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

15 [0184] Las celulasas disponibles comercialmente incluyen Celluzyme® y Carezyme® (Novo Nordisk A/S), Clazinase® y Puradax HA® (Genencor International Inc.) y KAC-500(B)® (Kao Corporation).

20 [0185] Peroxidasas/oxidasas: las peroxidasas/oxidasas adecuadas incluyen aquellas de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes químicamente modificadas o creadas genéticamente a partir de proteínas. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, p. ej., de *C. cinereus*, y variantes de las mismas, como aquellas descritas en WO 93/24618, WO 95/10602 y WO 98/15257.

25 [0186] Las peroxidasas disponibles comercialmente incluyen Guardzyme® (Novo Nordisk A/S).

[0187] La(s) enzima(s) de detergente se puede(n) incluir en una composición detergente añadiendo aditivos separados que contengan una o varias enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprenda todas las enzimas. Un aditivo de detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, puede ser formulado, p. ej., granulado, un líquido, una pasta, etc. Las formulaciones preferidas de aditivo de detergente son granulados, en particular granulados no pulverulentos, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o pasta.

30 [0188] Se pueden producir granulados no pulverulentos, p. ej., como se describe en US 4,106,991 y 4,661,452 y pueden ser recubiertos opcionalmente por métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales cerosos de recubrimiento son los productos de óxido de (poli)etileno (polietilenglicol; PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados con 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados donde el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en el cual hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. Ejemplos de materiales de recubrimiento que forman películas, adecuados para la aplicación mediante técnicas de lecho fluido, se dan en GB 1483591. Se pueden estabilizar preparados enzimáticos líquidos, por ejemplo, añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Se pueden preparar enzimas protegidas según el método descrito en EP 238,216.

35 [0189] La composición detergente de la invención puede estar en cualquier forma conveniente, p. ej., un barra, una tableta, un polvo, un gránulo, una pasta o un líquido. Un detergente líquido puede ser acuoso, conteniendo típicamente hasta un 70 % de agua y un 0-30 % de disolvente orgánico, o no acuoso.

40 [0190] La composición detergente comprende uno o varios surfactantes, que pueden ser no iónicos incluyendo semipolares y/o aniónicos y/o catiónicos y/o zwitteriónicos. Los surfactantes están típicamente presentes en un nivel del 0,1% al 60% en peso.

45 [0191] Si lo lleva incluido, el detergente contiene normalmente desde aproximadamente un 1% hasta aproximadamente un 40% de un surfactante aniónico tal como alquilbencenosulfonato lineal, alfa-olefinsulfonato, sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso), alcohol etoxisulfato, alcanosulfonato secundario, alfa-sulfo metil éster de ácido graso, ácido alquil- o alquenilsuccínico o jabón.

50 [0192] Si lo lleva incluido, el detergente contiene normalmente desde aproximadamente un 0,2% hasta aproximadamente un 40% de un surfactante no iónico tal como alcohol etoxilado, etoxilato de nonilfenol, alquilpoliglucósido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, polihidroxi alquil amida de ácido graso o los derivados n-acil n-alquil de glucosamina ("glucamidas").

55 [0193] El detergente puede contener un 0-65 % de un constructor de detergente o agente complejante tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilendiaminotetraacético, ácido dietilenti-aminopentaacético, ácido alquil- o alquenilsuccínico, silicatos solubles o silicatos estratificados (p. ej., SKS-6 de Hoechst).

60 [0194] El detergente puede comprender uno o varios polímeros. Ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinilpirrolidona),

poli(etilenglicol), poli(vinil alcohol), poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos tales como poliacrilatos, copolímeros de ácido maléico/acrílico y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.

- 5 [0195] El detergente puede contener un sistema blanqueador, que puede comprender una fuente de H₂O₂ tal como perborato o percarbonato que se puede combinar con un activador de blanqueo que forma perácido tal como tetraacetiltilendiamina o nonanoiloxibencenosulfonato. Alternativamente, el sistema blanqueador puede comprender peroxiácidos, p. ej., del tipo amida, imida o sulfona.
- 10 [0196] La(s) enzima(s) de la composición detergente de la invención puede(n) ser estabilizada(s) usando agentes estabilizantes convencionales, p. ej., un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico o un derivado de ácido bórico, p. ej., un éster de borato aromático, o un derivado del ácido fenil borónico tal como ácido 4-formilfenil borónico, y la composición se puede formular como se describe en, p. ej., WO 92/19709 y WO 92/19708.
- 15 [0197] El detergente también puede contener otros ingredientes de detergentes convencionales tales como, p. ej., acondicionadores de tejidos que incluyen arcillas, reforzadores de espuma, supresores de espuma, agentes anticorrosión, agentes de suspensión de suciedad, agentes anti-redeposición de suciedad, tintes, bactericidas, abrillantadores ópticos, hidrótopos, inhibidores de decoloración o perfumes.
- 20 [0198] Se contempla actualmente que en las composiciones detergentes cualquier enzima, en particular la enzima de la invención, puede ser agregada en una cantidad que corresponde a 0,01-100 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, preferiblemente 0,05-5 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, en particular 0,1-1 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado.
- 25 [0199] La enzima de la invención puede, adicionalmente, ser incorporada en las formulaciones detergentes descritas en WO 97/07202, que se incluye mediante referencia en este documento.

Composiciones detergentes para lavavajillas

- 30 [0200] La enzima de la invención puede también ser usada en las composiciones detergentes para lavado de vajillas, incluyendo las siguientes:

1) COMPOSICIÓN EN POLVO PARA LAVADO AUTOMÁTICO DE VAJILLAS

- 35 [0201]

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

2) COMPOSICIÓN EN POLVO PARA LAVADO AUTOMÁTICO DE VAJILLAS

- 40 [0202]

Surfactante no iónico (p. ej. alcohol etoxilado)	1	- 2%
Disilicato de sodio	2	- 30%
Carbonato de sodio	10	- 50%
Fosfonato de sodio	0	- 5%
Dihidrato de citrato trisódico	9	- 30%
Acetato de nitrilotrisodio (NTA)	0	- 20%
Monohidrato de perborato de sodio	5	- 10%
Tetraacetiltilendiamina (TAED)	1	- 2%
Polímero poliacrilato (p. ej. copolímero de ácido maleico/acrílico)	6	- 25%
Enzimas	0,0001	- 0,1%
Perfume	0,1	- 0,5%
Agua	5	- 10

3) COMPOSICIÓN EN POLVO PARA LAVADO AUTOMÁTICO DE VAJILLAS

[0203]

Surfactante no iónico	0,5	- 2,0%
Disilicato de sodio	25	- 40%
Citrato de sodio	30	- 55%
Carbonato de sodio	0	- 29%
Bicarbonato de sodio	0	- 20%
Monohidrato de perborato de sodio	0	- 15%
Tetraacetiletilendiamina (TAED)	0	- 6%
Copolímero de ácido maleico/acrílico	0	- 5%
Arcilla	1	- 3%
Poli aminoácidos	0	- 20%
Poliacrilato de sodio	0	- 8%
Enzimas	0,0001	- 0,1%

5

4) COMPOSICIÓN EN POLVO PARA LAVADO AUTOMÁTICO DE VAJILLAS

[0204]

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

10

5) COMPOSICIÓN EN POLVO PARA LAVADO AUTOMÁTICO DE VAJILLAS

[0205]

Surfactante no iónico	1	- 7%
Disilicato de sodio	18	- 30%
Citrato trisódico	10	- 24%
Carbonato de sodio	12	- 20%
Monopersulfato (2 KHSO ₅ .KHSO ₄ .K ₂ SO ₄)	15	- 21%
Estabilizador de blanqueo	0,1	- 2%
Copolímero de ácido maleico/acrílico	0	- 6%
Pentaacetato de dietilendiamina, sal de pentasodio	0	- 2,5%
Enzimas	0,0001	- 0,1%
Sulfato de sodio, agua	Equilibrio	

15

6) COMPOSICIÓN EN POLVO Y LÍQUIDA PARA LAVADO DE VAJILLAS CON SISTEMA SURFACTANTE DE LIMPIEZA

[0206]

5

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

7) COMPOSICIÓN LÍQUIDA NO ACUOSA PARA LAVADO AUTOMÁTICO DE VAJILLAS

[0207]

10

Surfactante no iónico líquido (p. ej. alcohol etoxilado)	2,0	- 10,0%
Silicato de metal alcalino	3,0	- 15,0%
Fosfato de metal alcalino	20,0	- 40,0%
-Portador líquido seleccionado de glicoles, poliglicoles, polióxidos y glicoéteres superiores	25,0	- 45,0%
Estabilizado (p. ej. un éster parcial de ácido fosfórico y un alcohol C ₁₆ - C ₁₈)	0,5	- 7,0%
Supresor de espuma (p. ej. silicona)	0	- 1,5%
Enzimas	0,0001	- 0,1%

8) COMPOSICIÓN LÍQUIDA NO ACUOSA PARA LAVADO DE VAJILLAS

[0208]

15

Surfactante no iónico líquido (p. ej. alcohol etoxilado)	2.0	- 10.0%
Silicato de sodio	3.0	- 15.0%
Carbonato de metal alcalino	7.0	- 20.0%
Citrato de sodio	0.0	- 1.5%
Sistema estabilizador (p. ej. mezclas de silicona cuidadosamente dividida y dialquil poliglicol éteres de bajo peso molecular)	0.5	- 7.0%
Polímero poliacrilato de bajo peso molecular	5.0	- 15.0%
Espesante de geles arcilloso (p. ej. bentonita)	0.0	- 10.0%
Polímero de hidroxipropilcelulosa	0.0	- 0.6%
Enzimas	0,0001	- 0,1%
Portador líquido seleccionado de glicoles, poliglicoles, polióxidos y glicoéteres superiores	Equilibrio	

9) COMPOSICIÓN LÍQUIDA TIXOTRÓPICA PARA LAVADO AUTOMÁTICO DE VAJILLAS

[0209]

Ácido graso C ₁₂ -C ₁₄	0	- 0,5%
Surfactante copolímero de bloque	1,5	- 15,0%
Citrato de sodio	0	- 12%
Tripolifosfato de sodio	0	- 15%
Carbonato de sodio	0	- 8%
Triestearato de aluminio	0	- 0,1%
Cumeno sulfonato de sodio	0	- 1,7%
Espesante poliacrilato	1,32	- 2,5%
Poliacrilato de sodio	2,4	- 6,0%
Ácido bórico	0	- 4,0%
Formiato de sodio	0	- 0,45%
Formiato de calcio	0	- 0,2%
N-decidifenil óxido disulfonato de sodio	0	- 4,0%
Monoetanolamina (MEA)	0	- 1,86%
Hidróxido de sodio (50%)	1,9	- 9,3%
1,2-Propanodiol	0	- 9,4%
Enzimas	0,0001	- 0,1%
Supresor de espuma, tinte, perfumes, agua	Equilibrio	

5 10) COMPOSICIÓN LÍQUIDA PARA LAVADO AUTOMÁTICO DE VAJILLAS

[0210]

Alcohol etoxilado	0	- 20%
Éster sulfonato de ácido graso	0	- 30%
Dodecilsulfato de sodio	0	- 20%
Alquilpoliglucósido	0	- 21%
Ácido oleico	0	- 10%
Monohidrato de disilicato de sodio	18	- 33%
Dihidrato de citrato de sodio	18	- 33%
Estearato de sodio	0	- 2,5%
Monohidrato de perborato de sodio	0	- 13%
Tetraacetiletilendiamina (TAED)	0	- 8%
Copolímero de ácido maleico/acrílico	4	- 8%
Enzimas	0,0001	- 0,1%

10 11) COMPOSICIÓN LÍQUIDA PARA LAVADO AUTOMÁTICO DE VAJILLAS QUE CONTIENE PARTÍCULAS DE BLANQUEADOR PROTEGIDAS

[0211]

Silicato de sodio	5	- 10%
Pirofosfato de tetrapotasio	15	- 25%
Trifosfato de sodio	0	- 2%
Carbonato de sodio	4	- 8%
Partículas blanqueadoras protegidas, p. ej. cloro	5	- 10%
Espesante polimérico	0,7	- 1,5%
Hidróxido de potasio	0	- 2%
Enzimas	0,0001	- 0,1%
Agua	Equilibrio	

15

11) Composiciones para lavado automático de vajillas como las descritas en 1), 2), 3), 4), 6) y 10), donde el perborato se sustituye por percarbonato.

12) Composiciones para lavado automático de vajillas como las descritas en 1) - 6) que adicionalmente contienen un catalizador de manganeso. El catalizador de manganeso puede, p. ej., ser uno de los compuestos descritos en, "Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching" Nature 369, 1994, págs. 637- 639.

20

Usos

5 [0212] La presente invención está también dirigida a métodos para usar los polipéptidos con actividad de alfa-amilasa de la invención en detergentes, en particular composiciones detergentes para ropa y composiciones detergentes para lavavajillas, composiciones de limpieza de superficies duras y en composiciones para desencolado de tejidos, telas o prendas, para la producción de pulpa y papel, fabricación de cerveza y procesos de conversión de almidón tal y como se ha descrito anteriormente.

10 [0213] La presente invención es descrita adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no deberían ser interpretados como limitantes del ámbito de la invención.

Materiales y métodos

15 [0214] Los productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales al menos de calidad reactiva.

Materiales:Enzimas:

20 [0215] SP690: alfa-amilasa descrita en la SEC ID nº 1 de US Patent nº 5,856,164.

[0216] SP722: alfa-amilasa descrita en la SEC ID nº 2 de US Patent nº 5,856,164.

25 [0217] Termamyl®: alfa-amilasa de Bacillus licheniformis descrita en la SEC ID nº 1 de US Patent nº 5,830,837.

[0218] AA560: alfa-amilasa de la invención mostrada en la SEC ID nº 2.

30 [0219] BAN: alfa-amilasa obtenida de Bacillus amyloliquefaciens y disponible en Novo Nordisk A/S

[0220] BSG: alfa-amilasa obtenida de Bacillus stearothermophilus y disponible en Novo Nordisk A/S

Detergente modelo:

35 [0221] El detergente modelo A/P (Asia/Pacífico) tiene la siguiente composición: 20% de STPP (tripolifosfato de sodio), 25% de Na₂SO₄, 15% de Na₂CO₃, 20% de LAS (alquilbenzeno sulfonato lineal, Nansa 80S), 5% de alcohol etoxilado C₁₂-C₁₅ (Dobanol 25-7), 5% de Na₂Si₂O₅, 0,3% de NaCl.

Omo Multi Acao (Brasil),

Omo concentrado en polvo (EU) (Unilever)

40 Ariel Futur líquido (EU) (Procter and Gambler)

Depósito de material biológico

45 [0222] El siguiente material biológico ha sido depositado por Novo Nordisk A/S, Novo Allé, DK-2880, Baysgraerol Dinamarca según las condiciones del tratado de Budapest con la Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig DE, y se le ha dado los siguientes números de acceso:

Fecha	Número de acceso	Fecha de depósito
50 NN017557	DSM 12648	25 de enero de 1999
NN017560	DSM 12649	25 de enero de 1999
NN049467	DSM12761	7 de abril de 1999
NN049470	DSM12764	7 de abril de 1999

55 [0223] Las cepas han sido depositadas bajo condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la pendencia de esta solicitud de patente para aquel que el comisario de patentes y marcas registradas determine que está autorizado a ello bajo 37 C.F.R. §1.14 y 35 U.S.C. §122.

El depósito representa un cultivo sustancialmente puro de la cepa depositada.

60 El depósito está disponible según los requisitos de las leyes de patente extranjera en países donde duplicados de la solicitud o su descendencia sean solicitados.

No obstante, se debe entender que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la presente invención en derogación de los derechos de patentes concedidos por acción gubernamental.

Organismo huésped

65 [0224] Cepa de Bacillus subtilis SHa273 descrita en WO 95/10603. Cepa SJ2 de E. coli (Diderichsen et al. (1990)), J.

Bacteriol., vol. 172, págs. 4315-4321.

Plásmidos:

5 [0225] El vector de genoteca pSJ1678 se describe además en WO 94/19454, que se incorpora mediante referencia en este documento.

10 [0226] pTVB110 es un plásmido que se replica en *Bacillus subtilis* usando el origen de replicación de pUB110 (Gryczan, T.J. (1978) *J. Bact.* 134:318-329). El plásmido además codifica el gen de gato, que confiere resistencia contra el cloranfenicol, obtenido del plásmido pC194 (Horinouchi, S. and Weisblum, B. (1982), *J. Bact.* 150: 815-825). El plásmido alberga una versión truncada del gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*, amyL, de manera que el promotor, la secuencia de señal y el terminador de transcripción amyL están presentes, pero el plásmido no proporciona un fenotipo amy-plus (formación del halo en almidón que contiene agar). PTVB299: ver la construcción en el ejemplo 10.

15 Métodos

Métodos generales de la Biología molecular:

20 [0227] A menos que se diga lo contrario las manipulaciones y transformaciones de ADN fueron realizadas utilizando métodos estándar de la Biología molecular (Sambrook et al. (1989); Ausubel et al. (1995); Harwood and Cutting (1990).

Fermentación de alfa-amilasas y variantes

25 [0228] La fermentación se puede realizar por métodos bien conocidos en la técnica o de la siguiente manera.

[0229] Una cepa de *B. subtilis* que contiene el plásmido de expresión pertinente se deposita en rayas en una placa de LB-agar con 10 micro g/ml de kanamicina de solución madre a -80°C, y crecido durante toda la noche a 37°C.

30 [0230] Las colonias son transferidas a 100 ml de medio BPX suplementado con 10 micro g/ml kanamicina en un matraz de agitación de 500 ml.

Composición del medio BPX:

Almidón de patata	100 g/l
Harina de cebada	50 g/l
BAN 5000 SKB	0,1 g/l
Caseinato de sodio	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

40 [0231] El cultivo se agita a 37°C a 270 r.p.m. durante 5 días.

45 [0232] Las células y restos celulares son retirados del caldo de fermentación mediante centrifugado a 4500 r.p.m. durante 20-25 minutos. Después se filtra el sobrenadante para obtener una solución completamente clara. El filtrado es concentrado y lavado en un filtro UF (membrana con límite de 10000) y el tampón se cambia a 20mM de acetato pH 5,5. El filtrado UF se aplica a una S-sefarosa de flujo rápido y la elución se lleva a cabo mediante elución por pasos con 0,2M de NaCl en el mismo tampón. El eluato es dializado contra 10mM de Tris, pH 9,0 y aplicado a una Q-sefarosa de flujo rápido y eluido con un gradiente lineal de 0-0,3M de NaCl sobre 6 volúmenes de columna. Las fracciones que contienen la actividad (medida mediante el ensayo de Phadebas) son agrupadas, el pH fue ajustado a pH 7,5 y el color restante fue retirado mediante un tratamiento con un 0,5% en p/vol. de carbón activado durante 5 minutos.

Ensayos de actividad de alfa-amilasa

1. Ensayo de Phadebas

55 [0233] La actividad de alfa-amilasa se determina mediante un método que emplea pastillas de Phadebas® como sustrato. Las pastillas de Phadebas (Phadebas® Amylase Test, suministradas por Pharmacia Diagnostic) contienen un polímero de almidón de color azul insoluble reticulado, que ha sido mezclado con albúmina de suero bovino y una sustancia tampón, y puesto en pastillas.

60 [0234] Para cada medición se suspende una tableta en un tubo que contiene 5 ml de 50 mM de tampón Britton-Robinson (50 mM de ácido acético, 50 mM de ácido fosfórico, 50 mM de ácido bórico, 0,1 mM de CaCl₂ y pH ajustado al valor de interés con NaOH). La prueba se realiza al baño maría a la temperatura de interés. La alfa-amilasa que va a ser ensayada se diluye en x ml de 50 mM de tampón Britton-Robinson. 1 ml de esta solución de alfa-amilasa se añade a 5 ml de 50 mM de tampón Britton-Robinson. El almidón es hidrolizado por la alfa-amilasa dando fragmentos azules solubles. La absorbancia de la solución azul resultante, medida espectrofotométricamente a 620 nm, es una función de

la actividad de alfa-amilasa.

[0235] Es importante que la absorbancia medida a 620 nm después de 10 o 15 minutos de incubación (tiempo de ensayo) esté en el rango de 0,2 a 2,0 unidades de absorbancia a 620 nm. En este rango de absorbancia hay linealidad entre actividad y absorbancia (ley de Lambert-Beer). La dilución de la enzima debe, por lo tanto, estar ajustada para cumplir este criterio. Bajo un conjunto especificado de condiciones (temp., pH, tiempo de reacción, condiciones de tampón) 1 mg de una alfa-amilasa dada hidrolizará una cantidad determinada de sustrato y se producirá un color azul. La intensidad de color se mide a 620 nm. La absorbancia medida es directamente proporcional a la actividad específica (actividad/mg de proteína alfa-amilasa pura) de la alfa-amilasa en cuestión bajo el conjunto dado de condiciones.

2. Método alternativo (ensayo PNP-G7)

[0236] La actividad de alfa-amilasa se determina mediante un método que utiliza el sustrato PNP-G7. PNP-G7, que es una abreviatura de p-nitrofenil-alfa,D-maltoheptaósido, es un oligosacárido bloqueado que puede ser dividido por una endoamilasa. Después de la escisión, la alfa-glucosidasa incluida en el kit asimila el sustrato para liberar una molécula de PNP libre que tiene color amarillo y así puede ser medida mediante espectrofotetría visible a $\lambda=405\text{nm}$. (400-420 nm.). Los kits que contienen sustrato PNP-G7 y alfa-glucosidasa son fabricados por Boehringer-Mannheim (nº de catálogo 1054635).

[0237] Para preparar el sustrato se añade una botella de sustrato (BM 1442309) a 5 ml de tampón (BM1442309). Para preparar la α -glucosidasa se añade una botella de alfa-glucosidasa (BM 1462309) a 45 ml de tampón (BM1442309). La solución de trabajo está hecha mezclando 5 ml de solución de alfa-glucosidasa con 0,5 ml de sustrato.

[0238] El ensayo se realiza transformando 20 micro l de solución enzimática en una placa de microtitulación de 96 pocillos e incubando a 25°C. Se añaden 200 micro l de solución de trabajo, 25°C. La solución se mezcla y preincuba durante 1 minuto y se mide la absorción cada 15 s durante 3 minutos a DO 405 nm.

[0239] La pendiente de la curva de absorción en función del tiempo es directamente proporcional a la actividad específica (actividad por mg de enzima) de la alfa-amilasa en cuestión bajo el conjunto dado de condiciones.

Medición de la estabilidad dependiente del calcio y el pH

[0240] Normalmente los procesos industriales de licuefacción se realizan usando pH 6,0-6,2 como pH de licuefacción y añadiendo 40 ppm de calcio libre para mejorar la estabilidad a 95°C-105°C. Algunas de las sustituciones propuestas en este documento se han hecho para mejorar la estabilidad a

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

[0241] Dos métodos diferentes pueden utilizarse para medir las alteraciones en la estabilidad obtenidas por las diferentes sustituciones en la alfa-amilasa AA560:

[0242] Método 1. Un ensayo que mide la estabilidad a pH reducido, pH 5,0, en presencia de 5 ppm de calcio libre. 10 micro g de la variante son incubados bajo las siguientes condiciones: una solución 0,1 M de acetato, pH ajustado a pH 5,0, que contiene 5ppm de calcio y un 5% p/p de almidón de maíz común (libre de calcio).

La incubación se hace en un baño maría a 95°C durante 30 minutos.

[0243] Método 2. Un ensayo, que mide la estabilidad en ausencia de calcio libre y donde el pH se mantiene a pH 6,0. Este ensayo mide la reducción en la sensibilidad al calcio: 10 micro g de la variante fueron incubados bajo las siguientes condiciones: una solución 0,1 M de acetato, pH ajustado a pH 6,0 que contiene un 5% p/p de almidón de maíz común (libre de calcio). La incubación se hizo al baño maría a 95°C durante 30 minutos.

Determinación de la estabilidad

[0244] Todos los ensayos de estabilidad se han hecho usando el mismo sistema. El método es:

[0245] La enzima es incubada bajo las condiciones pertinentes (1-4). Se toman muestras a los 0, 5, 10, 15 y 30 minutos y se diluyen 25 veces (la misma dilución para todas las muestras tomadas) en el tampón de ensayo (0,1M 50mM tampón Britton pH 7,3), y la actividad se mide usando el ensayo de Phadebas (Pharmacia) bajo condiciones estándar a pH 7,3 y 37°C.

[0246] La actividad medida antes de la incubación (0 minutos) se usa como referencia (100%). El descenso en el porcentaje se calcula como función del tiempo de incubación.

Determinación de la actividad específica.

[0247] La actividad específica se determina utilizando el ensayo de Phadebas (Pharmacia) como actividad/mg de

enzima.

Cocción de chorro y licuefacción con AA560 y variantes

5 [0248] Los experimentos de licuefacción se realizan con el sistema de mini-chorro que utiliza una dosificación de 50 NU/g de DS a pH 5,5 con 5 ppm añadidas de Ca⁺⁺, para comparar el rendimiento de la variante de alfa-amilasa formulada con la de la alfa-amilasa progenitora. La reacción es monitorizada midiendo el aumento de DE (método de la Neocuproine) como función de tiempo.

10 [0249] Las pastas de almidón de maíz se preparan suspendiendo aproximadamente 11,8 kg de Cerestar C*Pharm GL 03406 (89 % de almidón) en agua desionizada y completando hasta 30 kg. El pH se ajusta a 5,5 a temperatura ambiente, después de añadir 0,55 g de CaCl₂. 2H₂O.

15 [0250] Se añade una cantidad de enzima que corresponde a 50 NU/g de DS y la conductividad se ajusta a 300mS usando NaCl. Las condiciones estándar son las siguientes:

Concentración de sustrato 35 % p/p (inicial)

31,6-31,9 % p/p (final)

Temperatura 105°C, 5 minutos (licuefacción principal)

95°C, 90 minutos (licuefacción secundaria)

20 pH (inicial) 5,5

[0251] Después del eyectado, el almidón licuado es recogido y transportado en termos sellados desde la instalación de ensayo hasta el laboratorio, donde continua la licuefacción secundaria a 95°C.

25 [0252] Se toman muestras de 10 ml a intervalos de 15 minutos durante 15-90 minutos. Se añaden 2 gotas de 1 N HCl para inactivar la enzima. De estas muestras, se pesan 0,3-0,1 g (según el DE esperado) y se diluyen hasta los 100 ml. Los azúcares reductores se determinan luego según el método de la Neocuproine (Determination of reducing sugar with improved precision. Dygert, Li, Florida and Thomas (1965). Anal. Biochem 13,368) y los valores de DE determinados. Se compara el desarrollo de DE como función del tiempo.

30

Materiales de desencolado:

[0253]

35 Tejidos estándar: TS526, sarga, 100% algodón.

Impregnación: 55°C, 60 ppm de CaCl₂, pH 6,5

Soluciones enzimáticas: AA560 progenitora (1 g/l)

Dosificaciones: 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 y 2,0 g/l de las soluciones enzimáticas en el licor de impregnación.

Incubación: 2 horas a 55 o 65°C,

40 22 horas a 30°C

Lavado: 10 minutos en agua

Secado: temperatura ambiente

Procedimientos: evaluación de resultados de desencolado - escala violeta (TEGEWA).

45 **Método general para mutagénesis aleatoria usando el programa DOPE**

[0254] La mutagénesis aleatoria puede ser llevada a cabo mediante los siguientes pasos:

1. Seleccionar regiones de interés para modificar en la enzima progenitora,

2. Decidir los sitios de mutación y los sitios no mutados en la región seleccionada,

50 3. Decidir qué tipo de mutaciones deberían ser llevadas a cabo, p. ej., con respecto a la estabilidad deseada y/o el rendimiento de la variante que va a ser construida,

4. Seleccionar mutaciones estructuralmente razonables,

5. Ajustar los residuos seleccionados en el paso 3 con respecto al paso 4.

6. Analizar la distribución de nucleótidos usando un algoritmo de dopado adecuado.

55 7. Si es necesario, ajustar los residuos deseados para un código genético realista, p. ej., teniendo en cuenta restricciones que resultan del código genético, p. ej., para evitar la introducción de codones de parada; un experto será consciente de que algunas combinaciones de codón no se pueden usar en la práctica y necesitarán ser adaptadas

8. Hacer cebadores

9. Realizar la mutagénesis aleatoria usando los cebadores

60 10. Seleccionar variantes de glucoamilasa resultantes discriminando por las propiedades mejoradas deseadas.

Algoritmo de dopado

65 [0255] Algoritmos de dopado adecuados para usar en el paso 6 son conocidos en la técnica. Un algoritmo tal es descrito por Tomandl, D. et al., 1997, Journal of Computer-Aided Molecular Design 11:29-38. Otro algoritmo es DOPE (Jensen, LJ, Andersen, KV, Svendsen, A, and Kretzschmar, T (1998) Nucleic Acids Research 26:697-702).

Ensayos de selección de filtro

5 [0256] El ensayo puede utilizarse para seleccionar variantes de AA560 con una estabilidad mejorada a pH alto en comparación con la enzima progenitora y variantes de alfa-amilasa AA560 con una estabilidad mejorada a pH alto y temperaturas medias en comparación con la enzima progenitora dependiendo del ajuste de la temperatura de selección.

Ensayo de filtro a pH alto

10 [0257] Se colocan bibliotecas de *Bacillus* en placas en un sándwich de acetato de celulosa (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) y filtros de nitrocelulosa (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) en placas de agar TY con 10 micro g/ml de kanamicina a 37°C durante al menos 21 horas. La capa de acetato de celulosa se sitúa en la placa de agar TY.

15 [0258] Cada filtro en sándwich es marcado específicamente con una aguja después de ser puesto en las placas, pero antes de la incubación, para poder localizar las variantes positivas en el filtro, y el filtro de nitrocelulosa con variantes unidas se transfiere a un contenedor con tampón de glicina-NaOH, pH 8,6-10,6 y se incuba a temperatura ambiente (puede ser alterada de 10° a 60°C) durante 15 minutos. Los filtros de acetato de celulosa con colonias se almacenan en las placas TY a temperatura ambiente hasta que son usados. Tras la incubación, se detecta actividad residual en placas
20 que contienen 1% de agarosa y 0,2% de almidón en el tampón de glicina-NaOH, pH 8,6-10,6. Las placas de ensayo con filtros de nitrocelulosa son marcadas de la misma manera que el filtro en sándwich e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la retirada de los filtros, las placas de ensayo se tiñen con una solución de Lugol del 10%. Las variantes que degradan almidón son detectadas como puntos blancos sobre el fondo azul oscuro y luego identificadas en las placas de almacenamiento. Las variantes positivas se vuelven a seleccionar dos veces bajo las
25 mismas condiciones que la primera selección.

Ensayo de filtro de calcio bajo

30 [0259] Las bibliotecas de *Bacillus* se colocan en placas en un sándwich de acetato de celulosa (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) y filtros de nitrocelulosa (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) en placas de agar TY con un antibiótico pertinente, p. ej., kanamicina o cloranfenicol a 37°C durante al menos 21 horas. La capa de acetato de celulosa se sitúa en la placa de agar TY.

35 [0260] Cada filtro en sándwich es marcado específicamente con una aguja después de ser puesto en las placas, pero antes de la incubación para poder localizar las variantes positivas en el filtro, y el filtro de nitrocelulosa con variantes unidas se transfiere a un contenedor con tampón de carbonato/bicarbonato de pH 8,5-10 y con diferentes concentraciones de EDTA (0,001 mM - 100 mM). Los filtros se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. Los filtros de acetato de celulosa con colonias se almacenan en las placas TY a temperatura ambiente hasta que son usados. Tras la incubación, la actividad residual es detectada en placas que contienen 1% de agarosa y 0,2% de
40 almidón en tampón de carbonato/bicarbonato, pH 8,5-10. Las placas de ensayo con filtros de nitrocelulosa son marcadas de la misma manera que el filtro en sándwich e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente. Después de la retirada de los filtros, las placas de ensayo se tiñen con una solución de Lugol del 10%. Las variantes que degradan almidón son detectadas como puntos blancos sobre el fondo azul oscuro y luego identificadas en las placas de almacenamiento. Las variantes positivas se vuelven a seleccionar dos veces bajo las mismas condiciones que la
45 primera selección

EJEMPLOS**Ejemplo 1**

50 Aislamiento de ADN genómico de DSM 12648 y DSM 12649

[0261] Las cepas *Bacillus sp.* DSM 12649 (alfa-amilasa AA560) y *Bacillus sp.* DSM 12648 (alfa-amilasa AA349) fueron propagadas en el medio TY líquido (como se describe en Ausubel et al.(1995)). Después de 16 horas de incubación a
55 37°C y 300 r.p.m., las células fueron cosechadas y el ADN genómico aislado por el método descrito por Pitcher et al. (1989).

Construcción de librerías genómicas

60 [0262] El ADN genómico de la cepa DSM 12649 fue parcialmente digerido con la enzima de restricción Sau3A y dividido por tamaños mediante electroforesis en gel de agarosa del 0,7 %. Los fragmentos entre 2 y 10 kb de tamaño fueron aislados mediante electroforesis sobre papel de DEAE-celulosa (Dretzen et al. (1981).

65 [0263] Los fragmentos de ADN aislados fueron ligados a ADN del plásmido pSJ1678 digerido con BamHI y la mezcla de ligadura fue usada para transformar SJ2 de *E. coli*.

Transformación

[0264] Las células huésped de *E. coli* SJ2 fueron preparadas y transformadas por electroporación usando un electroporador Gene PULSER™ de BIO-RAD tal y como describe el proveedor.

Identificación de transformantes positivos:

[0265] Una biblioteca de ADN en *E. coli* SJ2, construida como se ha descrito anteriormente, fue seleccionada en placas de LB agar (descrito en Ausbel et al.(1995)) que contenían un 0,5 % de AZCL-amilosa (Megazyme) y 10 micro g/ml de cloranfenicol, e incubada durante la noche a 37 ° C. Los clones que expresaban actividad de amilasa aparecían con halos de difusión azules. Un clon tal fue denominado LiH1274. El ADN fue además caracterizado mediante la secuenciación del ADN de parte del fragmento de ADN de la Sau3A clonada.

Ejemplo 2**Determinación de la secuencia de ADN del gen que codifica la alfa-amilasa de la cepa DSM 12648 (AA349)**

[0266] El clon que constituye un gran fragmento cromosómico que contiene el gen que codifica la actividad amilolítica insertado en los plásmidos pSJ1678 y pLiH1274, fue usado como plantilla para amplificar por PCR específicamente fragmentos internos de ADN del gen codificante de alfa-amilasa usando cebadores degenerados dirigidos hacia las regiones conservadas en las alfa-amilasas de *Bacillus* conocidas.

[0267] Los cebadores degenerados fueron dirigidos hacia las siguientes regiones/secuencias de aminoácidos:

For36: GITA(L/V/I)W(I/L) (SEC ID nº: 5)
 For97: VY(G/A)D(V/F/L)V(M/L/I/F)NH (SEC ID nº: 6)
 For227: DG(F/I)R(F/L/I/V)DA(A/V)KH (SEC ID nº: 7)
 Rev235: DG(F/I)R(F/L/I/V)DA(A/V)KH (SEC ID nº: 8)
 Rev328: VTFV(D/E)NHD (SEC ID nº: 9)
 Rev410: GWTREG (SEC ID nº 10)

[0268] Las diferentes combinaciones de cebadores directos (For) e inversos (Rev) fueron usadas en PCR y los fragmentos de ADN internos pudieron ser amplificados.

[0269] Los fragmentos de ADN fueron purificados mediante columnas de giro QIAquick (QUIGEN) y secuenciados utilizando los mismos cebadores degenerados.

[0270] La secuencia de ADN (SEC ID nº 1) de la región codificante completa que codifica la alfa-amilasa AA349 madura (SEC ID nº 2) fue determinada mediante una estrategia estándar de paseo de cebadores.

Ejemplo 3**Determinación de la secuencia de ADN del gen que codifica la alfa-amilasa de la cepa DSM 12649 (AA560):**

[0271] Un preparado de ADN cromosómico de la cepa DSM 12649 (ejemplo 1) fue utilizado como plantilla en un experimento similar al descrito anteriormente en el ejemplo 2 para determinar la secuencia de ADN de la alfa-amilasa AA560 (SEC ID nº 4).

Ejemplo 4**Subclonación de la alfa-amilasa AA349 en pTVB110.**

[0272] pTVB110 es un plásmido que se replica en *Bacillus subtilis* usando el origen de replicación de pU3110 (Gryczan, T.J. (1978) J. Bact. 134:318-329). El plásmido además codifica el gen de gato, que confiere resistencia contra el cloranfenicol, obtenido del plásmido pC194 (Horinouchi, S. y Weisblum, B. (1982), J. Bact. 150: 815-825). El plásmido alberga una versión truncada del gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*, *amyL*, de manera que el promotor, la secuencia de señal y el terminador de transcripción *amyL* están presentes, pero el plásmido no proporciona un fenotipo amy-plus (formación de halo en almidón que contiene agar).

[0273] Para expresar la elevada cantidad de alfa-amilasa AA349, el gen maduro fue fusionado precisamente a la secuencia de señal *amyL* de modo que la transcripción fuera iniciada por el promotor *amyL* y la translocación fuera dirigida por la secuencia de señal *amyL*.

[0274] Un sitio PstI es descubierto en la alfa-amilasa AA349 madura. Ya que la clonación del gen en pTVB110 utilizaría el sitio PstI en pTVB110, el sitio PstI ubicado en el gen de la alfa-amilasa AA349 fue destruido durante la clonación (introduciendo una mutación silenciosa en el aminoácido alanina 88 (GCA a GCG)).

[0275] Los cebadores 188cloningN y 188(Pst-) se usaron para amplificar un fragmento de aproximadamente 280 pares de bases mediante PCR en el plásmido pLiH1274, utilizando la polimerasa Pwo bajo condiciones recomendadas por el fabricante (Boehringer Mannheim). Este fragmento fue purificado en gel de agarosa y usado como un megacebador (G. Sarkar and S.S. Sommer (1990) *Biotechniques* 8: 404-407) junto con el cebador 188cloningC para amplificar el gen completo que codifica la amilasa madura en una segunda PCR.

[0276] El fragmento resultante de aproximadamente 1480 pares de bases fue digerido con endonucleasas de restricción PstI y SfiI y ligado con el plásmido pTVB110 digerido con las mismas enzimas.

[0277] La cepa de *Bacillus subtilis* SHa273 con proteasa y amilasa eliminadas (mencionada en WO 95/10603) fue transformada con la mezcla de ligadura, y se verificó la secuencia de ADN de un transformante amy-plus. Este plásmido es denominado pTVB231.

15 **Oligonucleótidos:**

[0278]

188 (Pst-): 5' GGC GTT AAC CGC AGC TTG TAA C (SEC ID nº 11)

188cloningC: 5' CCG AGC TCG GCC GGC TGG GCC GTC GAC TTA TTT GTT TAC CCA AAT AGA AAC (SEC ID nº 12)

188cloningN: 5' CAT TCT GCA GCA GCG GCG CAC CAT AAT GGT ACG AAC G (SEC ID nº 13)

25 **Ejemplo 5**

Subclonación de la alfa-amilasa AA560 en pTVB110.

[0279] La secuenciación de ADN reveló una alta identidad de ADN entre las alfa-amilasas de las cepas DSM12648 (AA349) y DSM 12649 (AA560). En consecuencia, los mismos oligonucleótidos y la misma estrategia fueron utilizados para la clonación de la alfa-amilasa AA560 en el vector de expresión pTVB110 dando como resultado el plásmido pTVB232, que fue luego fermentado utilizando técnicas estándar.

35 **Ejemplo 6**

Purificación de la alfa-amilasa AA560 progenitora

[0280] El caldo de cultivo fue floculado añadiendo 0,01 ml 50%(p/p) CaCl₂.2H₂O, 0,0125 ml 12% (p/p) de aluminato de sodio, 0,025 ml 10% C521 y 0,075 ml 0,1% A130 por ml de caldo de cultivo. Se obtuvo una solución clara después de centrifugar. Se añadió sulfato de amonio a la solución enzimática hasta una concentración final de 1,2 M y se aplicó en una columna Butyl Toyo Pearl (100 ml) previamente equilibrada en 1,2 M de sulfato de amonio y 10 mM de Tris-HCl, pH 7,0. La amilasa fue eluida usando 5 mM de Tris-HCl, pH 7,0 y el conjunto eluido fue dializado contra 5 mM de Tris-HCl durante la noche. La fracción fue luego sometida a cromatografía de intercambio de iones usando una columna de Q-Sefarosa (200 ml) previamente equilibrada en 20 mM de Tris-HCl, pH 9,0. Se lavó material no ligado con el tampón de equilibrado, y la amilasa fue eluida utilizando un gradiente lineal de 0 - 1 M de NaCl, 20 mM de Tris-HCl y pH 9,0. La pureza del preparado de amilasa estaba por encima del 95% determinada mediante SDS-PAGE.

50 **Ejemplo 7**

Caracterización de la alfa-amilasa AA560 progenitora

[0281] La actividad de alfa-amilasa fue medida usando tanto el ensayo de Phadebas (37°C, pH 7,3) como el ensayo alternativo pNPG7 (25°C, pH 7,1) anteriormente descrito. Los perfiles de pH y de temperatura se hicieron a valores seleccionados de pH y temperatura. El perfil de pH fue medido a 37°C y el perfil de temperatura fue medido a pH 9,0

[0282] El punto isoeléctrico fue determinado usando isoelectroenfoque (Pharmacia, Ampholine, pH 3,5-9,3).

Tabla 1. Actividad específica y pI.

Enzima	Actividad Específica		
	NU/mg Phadebas	NU(T)/mg pNPG7	pI
AA560 (SEC ID nº 4)	35.000	9.000	7-8
SP722 (SEC ID nº 2 de US patent no. 5,856,164)	35.000	6.000	7-9
SP690 (SEC ID nº 1 de US patent no. 5,856,164)	35.000	7.000	5-6

$E = 3,0 \text{ cm}^{-1} * (\text{g/l})^{-2}$ para AA560, SP722 y SP690

[0283] El resultado de la determinación del pH y la temperatura óptimos se muestra en la figura 2 y figura 3,

respectivamente.

Ejemplo 8

5 Test de lavado con alfa-amilasa AA560 progenitora

[0284] El rendimiento de lavado fue evaluado lavando muestras sucias de prueba durante 15 y 30 minutos a 25°C y 40°C, respectivamente, en soluciones detergentes con la alfa-amilasa AA560 de la invención.

10 [0285] Los detergentes usados se describen en la tabla 2 más adelante. El detergente modelo A/P se ha descrito anteriormente en la sección de materiales. Los otros detergentes son detergentes disponibles comercialmente. Los detergentes comerciales que contienen alfa-amilasa fueron inactivados por microondas antes del lavado.

15 [0286] La alfa-amilasa AA560 recombinante purificada del ejemplo 6 se añadió a las soluciones detergentes en la concentración indicada más adelante. Las muestras de prueba fueron ensuciadas con almidón de arroz naranja (muestras CS-28 disponibles en el CFT, Center for Test Material, Holanda).

20 [0287] Después del lavado, las muestras fueron evaluadas midiendo la remisión a 460 nm usando un espectrofotómetro de remisión Elrepho. Los resultados son expresados como ΔR = remisión de la muestra lavada con la alfa-amilasa menos la remisión de una muestra lavada en las mismas condiciones sin la alfa-amilasa.

Tabla 2. Detergentes y condiciones de lavado.

Área	Detergente	Dosis Det. g/l	Inactivación	Dosis Enzima mg/l	Temp. °C	Tiempo Min	pH	Dureza agua °dH	Ca: Mg
A/P	Detergentemod elo 97	3	-	1	25	15	10,5	6	2:1
América Latina	Omo Multi Acao	3	-	1	25	15	10,6	6	2:1
Europa	Omo polvo	conc.4	+	0,2	40	30	10,2	15	4:1
Europa	Ariel líquido	Futur5	+	0,2	40	30	9,0	15	4:1

25 [0288] Los resultados se muestran en las figuras 4-7. Los resultados demuestran que la alfa-amilasa de la invención es eficaz en todos los detergentes a pH altamente alcalino y muestran que la alfa-amilasa AA560 ha mejorado el rendimiento de lavado en comparación con SP690 y SP722, respectivamente.

30 **Ejemplo 9**

Prueba de descolado con la alfa-amilasa AA560

35 [0289] La alfa-amilasa AA560 progenitora fue usada para el descolado de tejidos utilizando el método de TEGEWA (el método y escalas estándar se pueden obtener de Verband TEGEWA, Karlstrasse 21, Frankfurt a.M., Alemania). Las condiciones son descritas en la sección "Materiales y métodos".

40 [0290] La alfa-amilasa AA560 fue usada en pruebas de descolado realizadas a 30 y 55°C. La enzima fue dosificada desde 0,05 hasta 2 g/l en la solución de impregnación. El procedimiento de después del lavado se llevó a cabo lavando los tejidos en agua en vez del lavado habitual en soda caliente.

[0291] El efecto de fue medido usando la escala violeta (TEGEWA) escala de TEGEWA: 1-9. Grado 1 = no descolado, grado 9 = totalmente descolado.

AA560: 30°C, 22 horas y 55°C, 2 horas				
G/l	30°C, pH 6,5	30°C, pH 8,5	55°C, pH 6,5	55°C, pH 8,5
0,05	2	2	1	1
0,1	2	2	2	2
0,2	2	2	2	2
0,5	3	3	3	3
2	5	4	5	4

45

Ejemplo 10Construcción del material depositado pTVB299

5 [0292] El gen maduro ha sido subclonado en el plásmido pzero-2 (Invitrogen, Groningen, Países Bajos). Un fragmento de PstI-SacI de aproximadamente 1,5 kb que contiene la región madura completa de AA560 (obtenido de pTVB232) fue ligado con el vector pZero-2 y digerido con las mismas endonucleasas de restricción. La mezcla de ligadura fue transformada en células competentes de *E. coli*. Los transformantes fueron analizados por PCR para verificar la presencia del fragmento insertado y la parte de este fragmento que codifica la alfa-amilasa madura fue secuenciada. El plásmido resultante, denominado pTVB299, se depositó en DSMZ como DSM12764.

Ejemplo 11Construcción de variantes de la alfa-amilasa AA560

15 [0293] El gen que codifica la alfa-amilasa AA560 mostrado en la SEC ID nº 2 está ubicado en un plásmido pTVB223. La amilasa es expresada a partir del promotor *amyL* en este constructo en *Bacillus subtilis*.

20 [0294] Una variante de la invención con mutaciones delta (D183-G184) fue construida por el método del megacebador tal y como es descrito por Sarkar y Sommer, (1990), BioTechniques 8: 404-407.

[0295] El cebador B1 específico de gen y el cebador mutagénico 101458 se usaron para amplificar por PCR un fragmento de ADN de aproximadamente 645 pares de bases de un plásmido pTVB223 que codifica AA560 mostrado en la SEC ID nº 12).

25 [0296] El fragmento de 645 pares de bases fue purificado en un gel de agarosa y usado como un megacebador junto con el cebador Y2 en una segunda PCR llevada a cabo con la misma plantilla.

[0297] El fragmento resultante de aproximadamente 1080 pares de bases fue digerido con las enzimas de restricción BstEII y AflIII y el fragmento de ADN resultante de aproximadamente 510 pares de bases fue purificado y ligado con el plásmido pTVB223 digerido con las mismas enzimas. Se transformaron células competentes de *Bacillus subtilis* SHA273 (bajas en amilasa y proteasa) con los transformantes resistentes al cloranfenicol y a la ligadura, y fueron comprobadas mediante secuenciación de ADN para verificar la presencia de las mutaciones correctas en el plásmido.

30 Cebador B1: 5' CGA TTG CTG ACG CTG TTA TTT GCG 3' (SEC ID nº 14)

35 Cebador Y2: 5' CTT GTT CCC TTG TCA GAA CCA ATG 3' (SEC ID nº 15)

Cebador 101458: 5' GT CAT AGT TGC CGA AAT CTG TAT CGA CTT C 3' (SEC ID nº 16)

[0298] El plásmido resultante que codifica la alfa-amilasa AA560 con delta(D183-G184) +N195F fue denominado pTVB232.

40 [0299] La construcción de otras variantes de la invención se puede llevar a cabo de una manera similar.

Ejemplo 12Prueba del rendimiento de lavado de las variantes de AA560

[0300] El rendimiento de lavado de las variantes de AA560 de la invención se comprueba como se describe en el ejemplo 8.

Ejemplo 13Prueba de actividad específica de las variantes de AA560

55 [0301] La actividad específica de las variantes de AA560 se determina como se describe en el ejemplo 7.

Ejemplo 14Prueba de la estabilidad de calcio de las variantes de AA560

60 [0302] La estabilidad de calcio de las variantes de AA560 es examinada utilizando los ensayos descritos en la sección "Materiales y métodos".

[0303] La invención descrita y reivindicada en este documento no va a ser limitada en su alcance por las realizaciones específicas aquí descritas, ya que se pretende que estas realizaciones sean ilustraciones de diferentes aspectos de la invención. Se pretende que cualquier realización equivalente esté dentro del alcance de esta invención. De hecho, varias modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas en este documento se harán aparentes

a los expertos en la técnica por la descripción precedente.

Referencias

- 5 [0304]
- Sambrook et al.; Molecular Cloning: A Laboratory Manual; 1989; Cold Spring Harbor Lab.; Cold Spring Harbor; NY.
 Ausubel, F. M. et al. (eds.); Current protocols in Molecular Biology; 1995; John Wiley and Sons.
 Harwood C. R., y Cutting S. M. (eds.); Molecular Biological Methods for Bacillus; 1990; John Wiley and Sons.
- 10 Diderichsen B., Wedsted U., Hedegaard L., Jensen B. R., Sjøholm C.; Cloning of aldB, which encodes alpha-acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from Bacillus brevis; J. Bacteriol., 1990, vol. 172, págs. 4315-4321.
 Pitcher D. G., Saunders N. A., Owen R. J.; Rapid extraction of bacterial genomic ADN with guanidium thiocyanate; Lett. Appl. Microbiol.; 1989; vol. 8; págs. 151-156.
- 15 Dretzen G., Bellard M., Sassone-Corsi P., Chambon P.; A reliable method for the recovery of ADN fragments from agarose and acrylamide gels; Anal. Biochem.; 1981; vol. 112; págs. 295-298.
- [0305] La solicitud también describe un polipéptido aislado con actividad de alfa-amilasa y una o más características o propiedades seleccionadas del grupo que consiste en
- 20 (a) un polipéptido con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 96% de identidad con los aminoácidos 1 a 485 de la SEC ID nº 2 o la SEC ID nº 4;
 (b) un polipéptido que es codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia media con (i) la secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID nº 1 o la SEC ID nº 3, (ii) la secuencia de ADNc de la SEC ID nº 1 o la SEC ID nº 3, (iii) una subsecuencia de (i) o (ii) de al menos 100 nucleótidos o (iv) una cadena complementaria de (i), (ii) o (iii);
 25 (c) una variante alélica de (a) o (b);
 (d) un fragmento de (a), (b) o (c) que tiene actividad de alfa-amilasa;
 (e) un polipéptido con pH óptimo determinado usando el método de Phadebas (37°C) en el rango entre pH 8 y 9;
 (f) un polipéptido a una temperatura óptima determinada usando el método de Phadebas (pH 9,0) en el rango entre 55 y 65°C;
 30 (g) un polipéptido con un pl entre 7-8 determinado mediante isoelectroenfoque (Farmacia, Ampholine, pH 3,5-9,3); y
 (i) un polipéptido con rendimiento mejorado de lavado y/o de lavavajillas entre pH 9-11.
- [0306] El polipéptido puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 o 4. El polipéptido puede consistir en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 o la SEC ID nº 4 o un fragmento de la misma. El polipéptido puede consistir en los aminoácidos 1 a 485 de la SEC ID nº 2 o la SEC ID nº 4. El polipéptido puede ser codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida bajo condiciones de astringencia media con (i) la secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID nº 1 o la SEC ID nº 3, (ii) la secuencia de ADNc de la SEC ID nº 1 o la SEC ID nº 3, (iii) una subsecuencia de (i) o (ii) de al menos 100 nucleótidos o (iv) una cadena complementaria de (i), (ii) o (iii). El polipéptido puede ser codificado por la secuencia de ácidos nucleicos contenida en los plásmidos pLiH1274 o pTRBb299 contenidos en E. coli DSM12761 o E. coli DSM12764, respectivamente. También se describe un polipéptido con la misma actividad de alfa-amilasa que el polipéptido, tal y como se ha descrito anteriormente.
- 35 [0307] También se describe un método para producir el polipéptido anterior que comprende (a) cultivar una cepa para producir un sobrenadante que comprende el polipéptido y (b) recuperar el polipéptido. Otro método para la producción del polipéptido anterior comprende (a) cultivar una célula huésped que comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido bajo condiciones adecuadas para la producción del polipéptido y (b) recuperar el polipéptido.
- 45 [0308] También se describe una secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido tal y como se ha descrito anteriormente.
- 50 [0309] También se describe una secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos con al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1 o la SEC ID Nº 3, donde la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 485 de la SEC ID nº 2 o la SEC ID Nº 4.
- 55 [0310] Cualquiera de las dos secuencias anteriores de ácidos nucleicos aisladas se puede identificar (a) hibridando un ADN bajo condiciones de astringencia media con (i) la secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID nº 1, (ii) la secuencia de ADNc de la SEC ID nº 1, o (iii) una subsecuencia de (i) o (ii) por encima de al menos 100 nucleótidos, o (iv) una cadena complementaria de (i), (ii) o (iii); y (b) aislando la secuencia de ácidos nucleicos.
- 60 [0311] También se describe un vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos anterior, y una célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos anterior.
- 65 [0312] La solicitud además describe un método para producir una secuencia de ácidos nucleicos mutante, que comprende (a) introducir al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1 o

la SEC ID nº 3, donde la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 485 de la SEC ID nº 2 o la SEC ID Nº 4; y (b) recuperar la secuencia de ácidos nucleicos mutante; y una secuencia de ácidos nucleicos mutante producida por el método anterior.

5 [0313] La solicitud describe un mutante del polipéptido anterior con actividad de alfa-amilasa, donde dicha alfa-amilasa tiene una o varias mutaciones, en particular sustituciones o deleciones, en las siguientes posiciones (con respecto a la SEC ID nº 2):

1: R181*, G182*, D183*, G184*;

2: N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

10 3: I206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

4: E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

5: E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

6: K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;

7: R181A,N,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

15 preferiblemente seleccionadas del grupo de mutantes con las siguientes mutaciones:

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

- G182*/T183*/N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- T183*/G184*/R181A,N,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- T183*/G184*/N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

20 - R181*/G182*/N206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- G182*/T183*/V206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- T183*/G184*/V206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- R181*/G182*/E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- G182*/T183*/E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

25 - T183*/G184*/E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- R181*/G182*/E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- G182*/T183*/E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- T183*/G184*/E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- R181*/G182*/K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;

30 - G182*/T183*/K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- T183*/G184*/K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /V206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

35 - N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- V206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- V206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- V206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

40 - E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;

-E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V/K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;

más preferiblemente que comprende además una sustitución en la posición E216Q.

45 [0314] La solicitud también describe un uso del polipéptido anterior o una variante (mutante) en una composición detergente, en particular una composición detergente para ropa y una composición detergente de lavavajillas; el uso del polipéptido anterior o una variante (mutante) en una composición de descolado; el uso del polipéptido anterior o una variante (mutante) para licuefacción de almidón; y el uso del polipéptido anterior o una variante (mutante) para producción de etanol.

50 [0315] También se describe un método para producir un polipéptido, que comprende (a) cultivar una cepa que comprende la secuencia de ácidos nucleicos mutante anterior que codifica el polipéptido para producir un sobrenadante que comprende el polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido. Se proporciona un método adicional para la producción de un polipéptido, que comprende (a) cultivar una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido, donde la célula huésped comprende una secuencia de ácidos nucleicos mutante con al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1 o la SEC ID Nº 3, donde la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 485 de la SEC ID nº 2 o la SEC ID Nº 4, y (b) recuperar el polipéptido.

LISTADO DE SECUENCIAS

60

[0316]

<110> Novozymes A/S

65

<120> Polipéptidos que tienen actividad de alfa-amilasa alcalina y ácidos nucleicos que codifican los mismos

ES 2 532 606 T3

<130> NOVBE/P35677EPdivl

<150> DK PA199900439

<151> 1999-03-31

5

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

10

<210> 1

<211> 1458

<212> ADN

<213> Bacillus sp.

15

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1458)

20

<220>

<221> mat_peptide

<222> (1)..(1458)

<400>

```

cac cat aat ggt acg aac ggc aca atg atg cag tac ttt gaa tgg tat 48
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
 1                    5                    10                    15

cta cca aat gac gga aac cat tgg aat aga tta agg tct gat gca agt 96
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser
                20                    25                    30

aac cta aaa gat aaa ggg atc tca gcg gtt tgg att cct cct gca tgg 144
Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Ser Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
                35                    40                    45

aag ggt gcc tct caa aat gat gtg ggg tat ggt gct tat gat ctg tat 192
Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
                50                    55                    60

gat tta gga gaa ttc aat caa aaa gga acc att cgt aca aas tat gga 240
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly
                65                    70                    75                    80

acg cgc aat cag tta caa gct gca gtt aac gcc ttg aaa agt aat gga 288
Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Asn Ala Leu Lys Ser Asn Gly
                85                    90                    95

att caa gtg tat ggc gat gtt gta atg aat cat aaa ggg gga gca gac 336
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
                100                    105                    110

gct acc gaa atg gtt agg gca gtt gaa gta aac ccg aat aat aga aat 384

```

1

Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn 115 120 125	
caa gaa gtg tcc ggt gaa tat eca att gag gct tgg aca aag ttc gac Gln Glu Val Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp 130 135 140	432
ttt cca gga cga ggt aat act cat tca aac ttc aaa tgg aga tgg tat Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr 145 150 155 160	480
cac ttt gat gga gta gat tgg gat cag tca cgt aag ctg aac aat cga His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Lys Leu Asn Asn Arg 165 170 175	528
att tat aaa ttt aga ggt gat gga aaa ggg tgg gat tgg gaa gtc gat Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp 180 185 190	576
aca gaa aac ggt aac tat gat tac cta atg tat gca gat att gac atg Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met 195 200 205	624
gat cac cca gag gta gtg aat gag cta aga aat tgg ggt gtt tgg tat Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr 210 215 220	672
acg aat aca tta ggc ctt gat ggt ttt aga ata gat gca gta aaa cat Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His 225 230 235 240	720
ata aaa tac agc ttt act cgt gat tgg att aat cat gtt aga agt gca Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala 245 250 255	768
act ggc aaa aat atg ttt gog gtt gog gaa ttt tgg aaa aat gat tta Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu 260 265 270	816
ggt gct att gaa aac tat tta aac aea aca aac tgg aac cat tca gtc Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val 275 280 285	864
ttt gat gtt ccg ctg cac tat aac ctc tat aat gct tca aaa agc gga Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly 290 295 300	912
ggg aat tat gat atg agg caa ata ttt aat ggt aca gtc gtg caa aga Gly Asn Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg 305 310 315 320	960
cat cca atg cat gct gtt aca ttt gtt gat aat cat gat tcc caa cct His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro 325 330 335	1008
gaa gaa gct tta gag tct ttt gtt gaa gaa tgg ttc aaa cca tta gcg Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala 340 345 350	1056
tat gct ttg aca tta aca cgt gaa caa ggc tac cct tct gta ttt tat	1104

Tyr	Ala	Leu	Thr	Leu	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	Tyr	Pro	Ser	Val	Phe	Tyr		
		355					360					365					
gga	gat	tat	tat	ggc	att	cca	acg	cat	ggt	gta	cca	gcg	atg	aaa	tcg	1152	
Gly	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Pro	Thr	His	Gly	Val	Pro	Ala	Met	Lys	Ser		
		370				375					380						
aaa	att	gac	ccg	att	cta	gaa	gcg	cgt	caa	aag	tat	gca	tat	gga	aga	1200	
Lys	Ile	Asp	Pro	Ile	Leu	Glu	Ala	Arg	Gln	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Arg		
		385			390					395					400		
caa	aat	gac	tac	tta	gac	cat	cat	aat	atc	atc	ggt	tgg	aca	cgt	gaa	1248	
Gln	Asn	Asp	Tyr	Leu	Asp	His	His	Asn	Ile	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu		
				405					410						415		
ggg	aat	aca	gca	cac	ccc	aac	toc	ggt	tta	gct	act	atc	atg	toc	gat	1296	
Gly	Asn	Thr	Ala	His	Pro	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala	Thr	Ile	Met	Ser	Asp		
			420					425						430			
ggg	gca	gga	gga	aat	aag	tgg	atg	ttt	gtt	ggg	cgt	aat	aaa	gct	ggt	1344	
Gly	Ala	Gly	Gly	Asn	Lys	Trp	Met	Phe	Val	Gly	Arg	Asn	Lys	Ala	Gly		
		435				440						445					
caa	gtt	tgg	acc	gat	atc	act	gga	aat	cgt	gca	ggt	act	gtt	acg	att	1392	
Gln	Val	Trp	Thr	Asp	Ile	Thr	Gly	Asn	Arg	Ala	Gly	Thr	Val	Thr	Ile		
		450				455					460						
aat	gct	gat	gga	tgg	ggt	aat	ttt	tct	gta	aat	gga	gga	tca	gtt	tct	1440	
Asn	Ala	Asp	Gly	Trp	Gly	Asn	Phe	Ser	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser		
		465			470					475					480		
att	tgg	gta	sac	aaa	taa											1458	
Ile	Trp	Val	Asn	Lys													
				485													

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

5

<400> 2

ES 2 532 606 T3

His	His	Asn	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Met	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr
1				5					10					15	
Leu	Pro	Asn	Asp	Gly	Asn	His	Trp	Asn	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Ala	Ser
			20					25					30		
Asn	Leu	Lys	Asp	Lys	Gly	Ile	Ser	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	Ile	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly
65					70					75					80
Thr	Arg	Asn	Gln	Leu	Gln	Ala	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Lys	Ser	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 Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
130 135 140

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

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

Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Gly 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

Gly Ala Ile 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 Lys Ser Gly
290 295 300

Gly Asn Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg
305 310 315 320

His Pro Met 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 Lys Ser
370 375 380

Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Arg
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 Asn Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly
 435 440 445

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

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

Ile Trp Val Asn Lys
 485

<210> 3
 <211> 1458
 <212> ADN
 <213> Bacillus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1458)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(1458)

<400>

cac cat aat ggt acg aac ggc aca atg atg cag tac ttt gaa tgg tat	48
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr	
1 5 10 15	
cta cca aat gac gga aac cat tgg aat aga tta agg tct gat gca agt	96
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser	
20 25 30	
aac cta aaa gat aaa ggg atc tca gcg gtt tgg att cct cct gca tgg	144
Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Ser Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp	
35 40 45	
aag ggt gcc tct cca aat gat gtg ggg tat ggt gct tat gat ctg tat	192
Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr	
50 55 60	
gat tta gga gaa ttc aat caa aaa gga acc att cgt aca aaa tat gga	240
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly	
65 70 75 80	
acg cgc aat cag tta caa gct gca gtt aac gcc ttg aaa agt aat gga	288
Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Asn Ala Leu Lys Ser Asn Gly	
85 90 95	
att cca gtg tat ggc gat gtt gta atg aat cat aaa ggg gga gca gac	336
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp	
100 105 110	
gct acc gaa atg gtt agg gcg gtt gaa gta aac ccg aat aat aga aat	384

Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn 115 120 125	
caa gaa gtg tcc ggt gaa tat aca att gag gct tgg aca aag ttt gac Gln Glu Val Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp 130 135 140	432
ttt cct gga cga ggt aat acc cat tca aac ttc aaa tgg aga tgg tat Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr 145 150 155 160	480
cac ttt gat gga gta gat tgg gat cag tca cgt asg ctg aac aat cga His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Lys Leu Asn Asn Arg 165 170 175	528
att tat aaa ttt aga ggt gat gga aaa ggg tgg gat tgg gaa gtc gat Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp 180 185 190	576
aca gaa aac ggt aac tat gat tac cta atg tat gca gat att gac atg Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met 195 200 205	624
gat cac cca gag gta gtg aat gag cta aga aat tgg ggt gtt tgg tat Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr 210 215 220	672
acg aat aca tta ggc ctt gat ggt ttt aga ata gat gca gta aaa cat Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His 225 230 235 240	720
ata aaa tac agc ttt act cgt gat tgg atc aat cat gtt aga agt gca Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala 245 250 255	768
act ggc aaa aat atg ttt gcg gtt gcg gaa ttt tgg aaa aat gat tta Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu 260 265 270	816
ggt gct att gaa aac tat tta aac aaa aca aac tgg aac cat tca gtc Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val 275 280 285	864
ttt gat gtt ccg ctg cac tat aac ctc tat aat gct tca aaa agc gga Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly 290 295 300	912
ggg aat tat gat atg agg caa ata ttt aat ggt aca gtc gtg caa aga Gly Asn Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg 305 310 315 320	960
cat cca atg cat gct gtt aca ttt gtt gat aat cat gat teg caa cct His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro 325 330 335	1008
gaa gaa gct tta gag tot ttt gtt gaa gaa tgg ttc aaa cca tta gcg Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala 340 345 350	1056
tat gct ttg aca tta aca cgt gaa caa ggc tac cct tot gta ttt tat	1104

Tyr	Ala	Leu	Thr	Leu	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	Tyr	Pro	Ser	Val	Phe	Tyr		
		355					360					365					
gga	gat	tat	tat	ggc	att	cca	acg	cat	ggt	gta	cca	gcg	atg	aaa	tcg	1152	
Gly	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Pro	Thr	His	Gly	Val	Pro	Ala	Met	Lys	Ser		
		370				375					380						
aaa	att	gac	ccg	att	cta	gaa	gcg	cgt	caa	aag	tat	gca	tat	gga	aga	1200	
Lys	Ile	Asp	Pro	Ile	Leu	Glu	Ala	Arg	Gln	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Arg		
		385			390					395					400		
caa	aat	gac	tac	tta	gac	cat	cat	aat	atc	att	ggt	tgg	aca	cgt	gaa	1248	
Gln	Asn	Asp	Tyr	Leu	Asp	His	His	Asn	Ile	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu		
				405					410						415		
ggg	aat	aca	gca	cac	ccc	aac	tct	ggt	tta	gct	act	atc	atg	tcc	gat	1296	
Gly	Asn	Thr	Ala	His	Pro	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala	Thr	Ile	Met	Ser	Asp		
			420					425					430				
gga	gca	gga	gga	aat	aag	tgg	atg	ttt	gtt	ggg	cgt	aat	aaa	gct	ggt	1344	
Gly	Ala	Gly	Gly	Asn	Lys	Trp	Met	Phe	Val	Gly	Arg	Asn	Lys	Ala	Gly		
			435				440					445					
caa	ggt	tgg	acc	gat	atc	act	gga	aat	cgt	gca	ggt	act	gtt	acg	att	1392	
Gln	Val	Trp	Thr	Asp	Ile	Thr	Gly	Asn	Arg	Ala	Gly	Thr	Val	Thr	Ile		
		450				455					460						
aat	gct	gat	gga	tgg	ggt	aat	ttt	tct	gta	aat	gga	gga	tca	gtt	tct	1440	
Asn	Ala	Asp	Gly	Trp	Gly	Asn	Phe	Ser	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser		
					470					475					480		
att	tgg	gta	aac	aaa	taa											1458	
Ile	Trp	Val	Asn	Lys													
				485													

<210> 4
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> Bacillus sp.

5

<400> 4

ES 2 532 606 T3

His	His	Asn	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Met	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr
1				5					10					15	
Leu	Pro	Asn	Asp	Gly	Asn	His	Trp	Asn	Arg	Leu	Arg	Ser	Asp	Ala	Ser
		20						25					30		
Asn	Leu	Lys	Asp	Lys	Gly	Ile	Ser	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	Ile	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly
65					70					75					80
Thr	Arg	Asn	Gln	Leu	Gln	Ala	Ala	Val	Asn	Ala	Leu	Lys	Ser	Asn	Gly
				85					90						95

ES 2 532 606 T3

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

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

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

Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Gly 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

Gly Ala Ile 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 Lys Ser Gly
290 295 300

Gly Asn Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg
305 310 315 320

His Pro Met 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 Lys Ser
370 375 380

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

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

ES 2 532 606 T3

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

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

Gln Val Trp Thr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ala 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

- 5 <210> 5
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <221> PÉPTIDO
- <222> (1)..(9)
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: región del cebador degenerado
- 15 <400> 5
- Gly Ile Thr Ala Xaa Trp Xaa
- 1 5
- 20 <210> 6
- <211> 9
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 25 <220>
- <221> PÉPTIDO
- <222> (1)..(9)
- <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: región del cebador degenerado
- 30 <400> 6
- Val Tyr Xaa Asp Xaa Val Xaa Asn His
- 1 5
- 35 <210> 7
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> Descripción de la secuencia artificial: región del cebador degenerado
- <220>
- <221> PÉPTIDO
- <222> (1)..(10)
- 45 <400> 7
- Asp Gly Xaa Arg Xaa Asp Ala Xaa Lys His
- 1 5 10
- <210> 8

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: región del cebador degenerado

<220>
 <221> PÉPTIDO
 10 <222> (1)..(10)

<400> 8
Asp Gly Xaa Arg Xaa Asp Ala Xaa Lys His
 1 5 10

15 <210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

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

<220>
 <221> PÉPTIDO
 25 <222> (1)..(8)

<400> 9
Val Thr Phe Val Xaa Asn His Asp
 1 5

30 <210> 10
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: región del cebador degenerado

<220>
 <221> PÉPTIDO
 40 <222> (1)..(6)

<400> 10
Gly Trp Thr Arg Glu Gly
 1 5

45 <210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador 188(Pst-)

<400> 11
 ggcgtaacc gcagctgta ac 22

55 <210> 12
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador 188cloningC

<400> 12
 ccgagctcgg ccggctgggc cgctgactta ttgtttacc caaatagaaa c 51

5 <210> 13
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador 188cloningN

<400> 13
 cattctgcag cagcggcgca ccataatggt acgaacg 37

15 <210> 14
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador B1

<400> 14
 25 cgattgctga cgctgttatt tgcg 24

<210> 15
 <211> 24
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador Y2

<400> 15
 35 ctgttcctt tgtcagaacc aatg 24

<210> 16
 <211> 30
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: cebador 101458

<400> 16
 45 gtcatagttg ccgaaatcg tatcgacttc 30

50

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado con actividad de alfa-amilasa que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID nº 2 y variantes de la misma que tienen una secuencia de aminoácidos con al menos un 96% de identidad con los aminoácidos 1 a 485 de la SEC ID nº 2, donde la variante tiene un rendimiento de lavado mejorado en comparación con la alfa-amilasa progenitora, donde el rendimiento de lavado es determinado bajo las siguientes condiciones de lavado: muestras de prueba ensuciadas con almidón de arroz naranja se lavan durante 15 minutos a 25°C a un pH de 10,5, una dureza del agua de 6 °dH y una proporción Ca:Mg de 2:1 en una solución de 3g/l de detergente modelo A/P que consiste en: 20% de tripolifosfato de sodio, 25% de Na₂SO₄, 15% de Na₂CO₃, 20% de sulfonato de alquilbenceno lineal, 5% de alcohol etoxilado C₁₂-C₁₅, 5% de Na₂Si₂O₅ y 0,3% de NaCl, que contiene 1 mg/l del polipéptido con actividad de alfa-amilasa; después del lavado las muestras se evalúan midiendo la remisión a 460 nm y el rendimiento de lavado se determina como la remisión de las muestras lavadas menos la remisión de una muestra lavada bajo las mismas condiciones pero sin un polipéptido con actividad de alfa-amilasa.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, que consiste en los aminoácidos 1 a 485 de la SEC ID nº 2.
3. Secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
4. Secuencia de ácidos nucleicos aislada según la reivindicación 3 que comprende una secuencia de ácidos nucleicos con al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1, en la que la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 485 de la SEC ID nº 2.
5. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según las reivindicaciones 3-4.
6. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 5.
7. Método para producir una secuencia de ácidos nucleicos mutante según las reivindicaciones 3 o 4, que comprende (a) introducir al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1, donde la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 485 de la SEC ID nº 2; y (b) recuperar la secuencia de ácidos nucleicos mutante.
8. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 que comprende (a) cultivar una célula huésped según la reivindicación 6 bajo condiciones adecuadas para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.
9. Método según la reivindicación 8 para producir un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 que comprende (a) cultivar una célula huésped según la reivindicación 6 bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido, donde la célula huésped comprende una secuencia de ácidos nucleicos mutante con al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID nº 1, donde la secuencia de ácidos nucleicos mutante codifica un polipéptido que consiste en los aminoácidos 1 a 485 de la SEC ID nº 2, y (b) recuperar el polipéptido.
10. Polipéptido según la reivindicación 1, donde dicho polipéptido tiene una o varias mutaciones, en particular sustituciones o deleciones, en las siguientes posiciones (con respecto a la SEC ID nº 2):
 1: R181*, G182*, D183*, G184*;
 2: N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 3: 1206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 4: E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 5: E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 6: K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 7: R181A,N,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 donde el polipéptido es preferiblemente seleccionado del grupo de mutantes con las siguientes mutaciones:
 - R181*/G182*/N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 - G182*/D183*/N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 - D183*/G184*/R181A,N,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 - D183*/G184*/N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 - R181*/G182*/1206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 - G182*/D183*/1206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 - D183*/G184*/1206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 - R181*/G182*/E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 - G182*/D183*/E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 - D183*/G184*/E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 - R181*/G182*/E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 - G182*/D183*/E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
 - D183*/G184*/E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;

- R181*/G182*/K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- G182*/D183*/K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- D183*/G184*/K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- 5 - N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /I206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y
- N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y, V;
- N195A,R,D,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y, V;
- I206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y /E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- I206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y /E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y, V;
- 10 - I206A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y /K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y,V;
- E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y, V;
- E212A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y, V;
- E216A,R,D,N,C,Q,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V /K269A,R,D,N,C,E,Q,G,H,I,L,M,F,P,S,T,W,Y, V;
- 15 y donde el polipéptido preferiblemente comprende además una sustitución en la posición E216Q, y donde * denota una
delección.

11. Uso del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 o variante según la reivindicación 10 en:
- (a) una composición detergente, en particular una composición detergente para ropa y una composición detergente de lavavajillas; o
 - 20 (b) una composición de desengrasado; o
 - (c) para licuefacción de almidón; o
 - (d) para producción de etanol.

30

707amr KMNITKGTTPQYFZAYLDMKXGNNWYKLNDA SPULXSKGJTPVM IEPKXKARNGPVC YGA YDLXD LGGEPKQKTVRTRKYG
 AA347 FZKQIMGTAKQYFEMYTPEKQKMMRLRSUAASLLELGGIEMW IPEAMKGAHQPCVSYGAYDADIAKFPKNGKTIRTKYK
 AA350 JLAQGTGTVEQYFEMYLNDGKQKMMRLRSUASLLELGGIEMW IEPKXKARNGPVC YGA YDLXD LGGEPKQKTVRTRKYG
 BNN . . . VHGTLNDYFEMYTPEKQKMMRLRSUASLLELGGIEMW IEPKXKARNGPVC YGA YDLXD LGGEPKQKTVRTRKYG
 BSC A . APFMGTTPNQYFEMYLDMKXGNNWYKLNDA SPULXSKGJTPVM IEPKXKARNGPVC YGA YDLXD LGGEPKQKTVRTRKYG
 AP1376 HICQTKGTPNQYFEMYLDMKXGNNWYKLNDA SPULXSKGJTPVM IEPKXKARNGPVC YGA YDLXD LGGEPKQKTVRTRKYG
 SP694 HIKKFTKGTTPNQYFEMYLDMKXGNNWYKLNDA SPULXSKGJTPVM IEPKXKARNGPVC YGA YDLXD LGGEPKQKTVRTRKYG
 SP722 HIKKFTKGTTPNQYFEMYLDMKXGNNWYKLNDA SPULXSKGJTPVM IEPKXKARNGPVC YGA YDLXD LGGEPKQKTVRTRKYG
 Tadm AM IAPKQQLQYFEMYTPEKQKMMRLRSUASLLELGGIEMW IEPKXKARNGPVC YGA YDLXD LGGEPKQKTVRTRKYG

140

707amr ILSQQLQYFEMYTPEKQKMMRLRSUASLLELGGIEMW IEPKXKARNGPVC YGA YDLXD LGGEPKQKTVRTRKYG
 AA349 ILSQQLQYFEMYTPEKQKMMRLRSUASLLELGGIEMW IEPKXKARNGPVC YGA YDLXD LGGEPKQKTVRTRKYG
 AA350 TRNQTQALVWALXSKG ILSQQLQYFEMYTPEKQKMMRLRSUASLLELGGIEMW IEPKXKARNGPVC YGA YDLXD LGGEPKQKTVRTRKYG
 BAP TSSSLQALVWALXSKG ILSQQLQYFEMYTPEKQKMMRLRSUASLLELGGIEMW IEPKXKARNGPVC YGA YDLXD LGGEPKQKTVRTRKYG
 BSC TKNZYQALVWALXSKG ILSQQLQYFEMYTPEKQKMMRLRSUASLLELGGIEMW IEPKXKARNGPVC YGA YDLXD LGGEPKQKTVRTRKYG
 AP1376 TRNQTQALVWALXSKG ILSQQLQYFEMYTPEKQKMMRLRSUASLLELGGIEMW IEPKXKARNGPVC YGA YDLXD LGGEPKQKTVRTRKYG
 SP694 TRNQTQALVWALXSKG ILSQQLQYFEMYTPEKQKMMRLRSUASLLELGGIEMW IEPKXKARNGPVC YGA YDLXD LGGEPKQKTVRTRKYG
 SP722 TRNQTQALVWALXSKG ILSQQLQYFEMYTPEKQKMMRLRSUASLLELGGIEMW IEPKXKARNGPVC YGA YDLXD LGGEPKQKTVRTRKYG
 Tadm TSCZLQALVWALXSKG ILSQQLQYFEMYTPEKQKMMRLRSUASLLELGGIEMW IEPKXKARNGPVC YGA YDLXD LGGEPKQKTVRTRKYG

140

707amr HFKXVWQKQSRLEMLRLEYSRQGLQXJLHWEVPTENKTYUZYLVYADPMDHPFVWNSLRRMGMVPTNTLGLDGFRIIDAVKJ
 AA349 HFKXVWQKQSRLEMLRLEYSRQGLQXJLHWEVPTENKTYUZYLVYADPMDHPFVWNSLRRMGMVPTNTLGLDGFRIIDAVKJ
 AA350 KSYGVWMDQSRKLEMLRLEYSRQGLQXJLHWEVPTENKTYUZYLVYADPMDHPFVWNSLRRMGMVPTNTLGLDGFRIIDAVKJ
 BAP HFKXVWQKQSRLEMLRLEYSRQGLQXJLHWEVPTENKTYUZYLVYADPMDHPFVWNSLRRMGMVPTNTLGLDGFRIIDAVKJ
 BSC HFKXVWQKQSRLEMLRLEYSRQGLQXJLHWEVPTENKTYUZYLVYADPMDHPFVWNSLRRMGMVPTNTLGLDGFRIIDAVKJ
 AP1376 HFKXVWQKQSRLEMLRLEYSRQGLQXJLHWEVPTENKTYUZYLVYADPMDHPFVWNSLRRMGMVPTNTLGLDGFRIIDAVKJ
 SP694 HFKXVWQKQSRLEMLRLEYSRQGLQXJLHWEVPTENKTYUZYLVYADPMDHPFVWNSLRRMGMVPTNTLGLDGFRIIDAVKJ
 SP722 HFKXVWQKQSRLEMLRLEYSRQGLQXJLHWEVPTENKTYUZYLVYADPMDHPFVWNSLRRMGMVPTNTLGLDGFRIIDAVKJ
 Tadm HFKXVWQKQSRLEMLRLEYSRQGLQXJLHWEVPTENKTYUZYLVYADPMDHPFVWNSLRRMGMVPTNTLGLDGFRIIDAVKJ

140

707amr ILYSPTSDWLIWVREKATKQKMEVAVSFPWMDLGAJTKYKQKMMRSHVFWVWLVKYLVAASGQCYCKRMIENSTVQR
 AA349 ILYSPTSDWLIWVREKATKQKMEVAVSFPWMDLGAJTKYKQKMMRSHVFWVWLVKYLVAASGQCYCKRMIENSTVQR
 AA350 ILYSPTSDWLIWVREKATKQKMEVAVSFPWMDLGAJTKYKQKMMRSHVFWVWLVKYLVAASGQCYCKRMIENSTVQR
 BAP ILYSPTSDWLIWVREKATKQKMEVAVSFPWMDLGAJTKYKQKMMRSHVFWVWLVKYLVAASGQCYCKRMIENSTVQR
 BSC ILYSPTSDWLIWVREKATKQKMEVAVSFPWMDLGAJTKYKQKMMRSHVFWVWLVKYLVAASGQCYCKRMIENSTVQR
 AP1376 ILYSPTSDWLIWVREKATKQKMEVAVSFPWMDLGAJTKYKQKMMRSHVFWVWLVKYLVAASGQCYCKRMIENSTVQR
 SP694 ILYSPTSDWLIWVREKATKQKMEVAVSFPWMDLGAJTKYKQKMMRSHVFWVWLVKYLVAASGQCYCKRMIENSTVQR
 SP722 ILYSPTSDWLIWVREKATKQKMEVAVSFPWMDLGAJTKYKQKMMRSHVFWVWLVKYLVAASGQCYCKRMIENSTVQR
 Tadm ILYSPTSDWLIWVREKATKQKMEVAVSFPWMDLGAJTKYKQKMMRSHVFWVWLVKYLVAASGQCYCKRMIENSTVQR

Fig. 1

```

321                                     400
TC728Y  RPSHAYT FVGNHDSQFZERLAKSFVSEMEKPLAVALTILTRQSYPSVYFGDYYS... PTHQVENMRSEIDPILSARQKYS
AA144  KPMHAYT FVDKHDGQCEBALERFVZEMPKDIAVALTLTRQCYPSVYFGDYYS... PTHQVAMRSEIDPILSARQKYS
AA140  KPMHAYT FVDKHDGQCEBALERFVZEMPKDIAVALTLTRQCYPSVYFGDYYS... PTHQVAMRSEIDPILSARQKYS
BAH  EHSKAYT FVGNHDSQFZERLAKSFVSEMEKPLAVALTILTRQSYPSVYFGDYYS... PTHQVENMRSEIDPILSARQKYS
SS1  QPTLAVTFVGNHDSQFZERLAKSFVSEMEKPLAVALTILTRQCYPSVYFGDYYS... PTHQVAMRSEIDPILSARQKYS
AP137E  EULAVTFVGNHDSQFZERLAKSFVSEMEKPLAVALTILTRQCYPSVYFGDYYS... PTHQVAMRSEIDPILSARQKYS
SP690  KPMHAYT FVDKHDGQCEBALERFVZEMPKDIAVALTLTRQCYPSVYFGDYYS... PTHQVAMRSEIDPILSARQKYS
SP771  KPMHAYT FVDKHDGQCEBALERFVZEMPKDIAVALTLTRQCYPSVYFGDYYS... PTHQVAMRSEIDPILSARQKYS
Tett  KPLAVTFVGNHDSQFZERLAKSFVSEMEKPLAVALTILTRQSYPSVYFGDYYS... PTHQVENMRSEIDPILSARQKYS

401                                     480
TC728Y  VGRQNDYLCQNHJISWTRESDIAKNSCLNITHEIDMDEEMNFVGRKACQVNSDITGRKQVYTCRNSGNGNFBVNSG
AA549  YGRQNDYLCQNHJISWTRESDIAKNSCLNITHEIDMDEEMNFVGRKACQVNSDITGRKQVYTCRNSGNGNFBVNSG
AA560  YGRQNDYLCQNHJISWTRESDIAKNSCLNITHEIDMDEEMNFVGRKACQVNSDITGRKQVYTCRNSGNGNFBVNSG
BAH  YGRQNDYLCQNHJISWTRESDIAKNSCLNITHEIDMDEEMNFVGRKACQVNSDITGRKQVYTCRNSGNGNFBVNSG
SS1  YGRQNDYLCQNHJISWTRESDIAKNSCLNITHEIDMDEEMNFVGRKACQVNSDITGRKQVYTCRNSGNGNFBVNSG
AP137E  YGRQNDYLCQNHJISWTRESDIAKNSCLNITHEIDMDEEMNFVGRKACQVNSDITGRKQVYTCRNSGNGNFBVNSG
SP690  YGRQNDYLCQNHJISWTRESDIAKNSCLNITHEIDMDEEMNFVGRKACQVNSDITGRKQVYTCRNSGNGNFBVNSG
SP771  YGRQNDYLCQNHJISWTRESDIAKNSCLNITHEIDMDEEMNFVGRKACQVNSDITGRKQVYTCRNSGNGNFBVNSG
Tett  YGRQNDYLCQNHJISWTRESDIAKNSCLNITHEIDMDEEMNFVGRKACQVNSDITGRKQVYTCRNSGNGNFBVNSG

481                                     560
TC728Y  SVSITVQR.....
AA144  SVSITVQR.....
AA140  SVSITVQR.....
BAH  SVSITVQR.....
SS1  SVSITVQR.....
AP137E  SVSITVQR.....
SP690  SVSITVQR.....
SP771  SVSITVQR.....
Tett  SVSITVQR.....

```

Fig. 1 (cont.)

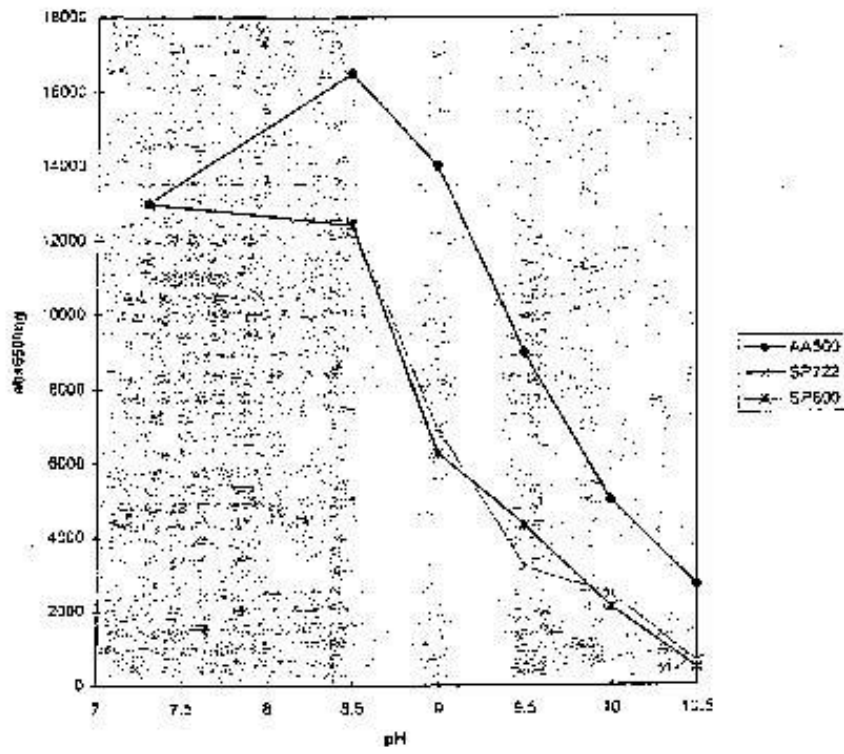


Fig. 2

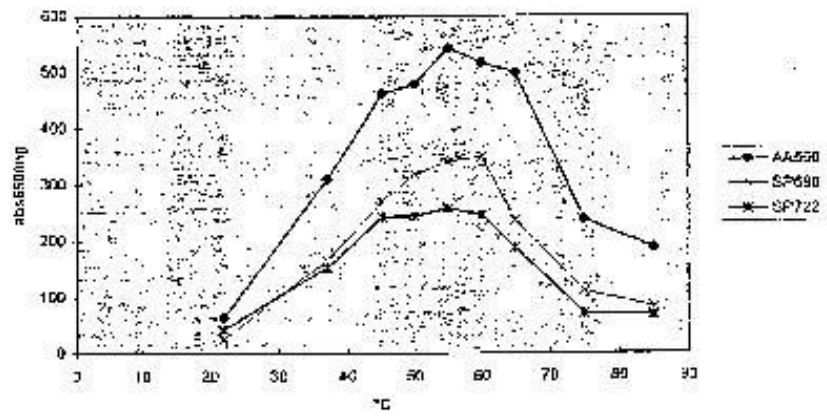


Fig. 3

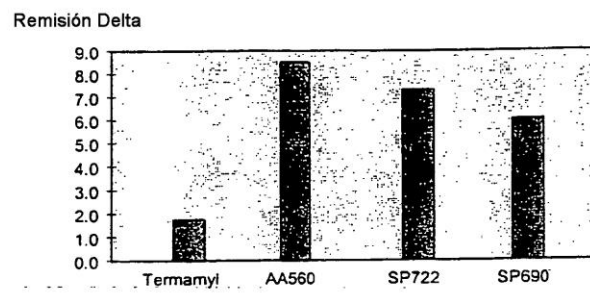


Fig. 4

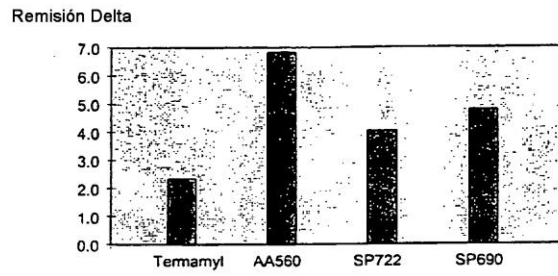


Fig. 5

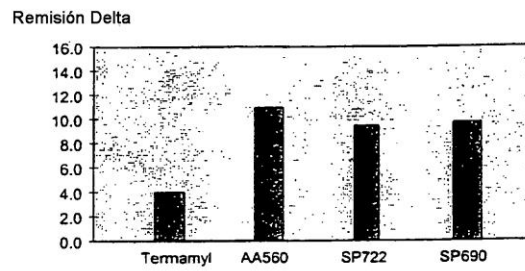


Fig. 6

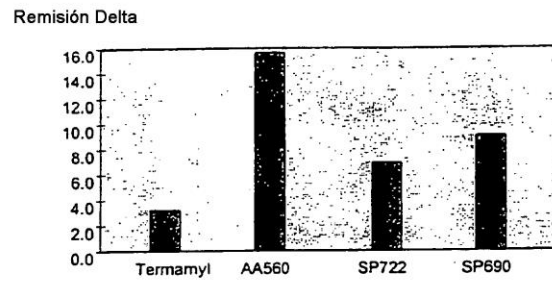


Fig. 7