

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 878**

51 Int. Cl.:

**C11D 3/386** (2006.01)

**C12N 9/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.1998** **E 09152241 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2015** **EP 2206768**

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

30 Prioridad:

**13.10.1997 DK 117297**

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

**29.05.2015**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SVENDSEN, ALLAN;**  
**BOCHERT, TORBEN y**  
**BISGAARD-FRANTZEN, HENRIK**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 536 878 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

## Mutantes de alfa-amilasa

## 5 Campo de la invención

[0001] La presente invención está relacionada, entre otras cosas, con las variantes nuevas (mutantes) de  $\alpha$ -amilasas originales tipo Termamyl, sobre todo variantes que presentan termoestabilidad aumentada a pH ácido y/o a bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (con respecto a la original) que es ventajoso con respecto a las aplicaciones de las variantes en el tratamiento industrial del almidón particularmente (p. ej. licuefacción o sacarificación del almidón).

## Antecedentes de la invención

[0002] Las  $\alpha$ -amilasas ( $\alpha$ -1,4-glucan-4-glucanohidrolasas, EC 3,2,1,1) constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del almidón y otros oligo y polisacáridos 1,4-glucosídicos lineales y ramificados.

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

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

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

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

## 40 Descripción breve de la invención

[0007] La presente invención se refiere a nuevas variantes (mutantes)  $\alpha$ -amilolíticas de una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl, en particular variantes que presentan termoestabilidad aumentada (con respecto a la original) que es ventajosa en relación con el tratamiento industrial del almidón (licuefacción, sacarificación del almidón y similares).

[0008] Más específicamente, la presente invención ofrece una variante de una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl original como se define en la reivindicación 1.

[0009] La presente invención proviene del sorprendente descubrimiento de los inventores de que en caso de combinar dos mutaciones (se describirá más abajo), la termoestabilidad de las  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl es aumentada a pH ácido y/o a baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en comparación con mutaciones únicas, tal como la mutación descrita en la WO 96/23873 (Novo Nordisk), es decir, eliminación de pares en la región R181\*, G182\*, T183\* y G184\* de la secuencia mostrada en la SEC ID N°: 1 de la presente.

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

## 60 Breve descripción del dibujo

[0011] La figura 1 es un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de seis  $\alpha$ -amilasas originales tipo Termamyl en el contexto de la invención. Los números en el extremo izquierdo designan las secuencias de aminoácidos respectivas como sigue:

- 1: SEC ID N°: 2,  
 2: Kaoamyl,  
 3: SEC ID N°: 1,  
 4: SEC ID N°: 5,  
 5: SEC ID N°: 4,  
 6: SEC ID N°: 3.

Descripción detallada de la invención

La  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl

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

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

[0014] Por la homología sustancial descubierta entre estas  $\alpha$ -amilasas, éstas se consideran que pertenecen a la misma clase de  $\alpha$ -amilasas, es decir la clase de " $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl".

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

[0016] Opcionalmente, la  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl puede además i) mostrar reactividad cruzada inmunológica con un anticuerpo producido contra al menos una de dichas  $\alpha$ -amilasas, y/o ii) ser codificada por una secuencia de ADN que hibridiza a las secuencias de ADN que codifican las  $\alpha$ -amilasas especificadas anteriormente que se desprenden de las SEC ID N°: 9, 10, 11 o 12 de la presente solicitud (cuyas secuencias codificantes codifican las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEC ID N°: 1, 2, 3, 4 y 5 de la presente, respectivamente) a partir de la SEC ID N°: 4 de la WO 95/26397 (cuya secuencia de AND, junto con el codón de parada TAA, se muestra en la SEC ID N°: 13 de la presente y codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 8 de la presente) y de SEC ID N°: 5 de la WO 95/26397 (mostrada en la SEC ID N°: 14 de la presente), respectivamente.

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

[0018] Un alineamiento estructural entre Termamyl y una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl puede ser usado para identificar posiciones equivalentes/correspondientes en otras  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl. Un método para obtener dicho alineamiento estructural es mediante el uso del programa Pile Up del paquete GCG usando valores por defecto de penalizaciones de espacio, es decir, una penalización por creación de espacio de 3.0 y penalización por extensión de espacio de 0.1. otros métodos de alineamiento estructural incluyen el análisis de agregados hidrofóbicos (Gaboriaud *et al.*, (1987), FEBS LETTERS 224, pp. 149-155 ) y enroscado inverso (Huber, T ; Torda, AE, PROTEIN SCIENCE Vol. 7, No. 1 pp. 142-149 (1998) ).

[0019] La propiedad i) de la  $\alpha$ -amilasa, es decir, la reactividad cruzada inmunológica, se puede ensayar usando un anticuerpo generado contra, o reactivo con, al menos un epítipo de la  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl relevante. El anticuerpo, que puede ser monoclonal o policlonal, se puede producir por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Hudson *et al.*, Practical Immunology, Third edition (1989), Blackwell Scientific Publications. La reactividad cruzada inmunológica se puede determinar usando ensayos conocidos en la técnica, ejemplos de éstos son Western Blotting o ensayo de inmunodifusión radial, por ejemplo, como se describe en Hudson *et al.*, 1989. A este respecto, la reactividad cruzada inmunológica entre las  $\alpha$ -amilasas que tienen las secuencias de aminoácidos SEC ID N°: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 respectivamente, se han encontrado.

[0020] La sonda de oligonucleótidos usada para la caracterización de la  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl según la propiedad ii) anterior se puede preparar de forma adecuada basándose en la secuencia de nucleótidos o aminoácidos parcial o completa de la  $\alpha$ -amilasa en cuestión. Condiciones adecuadas para probar la hibridación incluyen remojo previo en 5xSSC y prehibridación durante 1 hora a  $\sim 40^{\circ}\text{C}$  en una solución de 20% de formamida, solución de Denhardt 5x, fosfato sódico 50 mM, pH 6,8 y 50 mg de ADN de timo de ternera sonicated desnaturalizado, seguido de hibridación en la misma solución suplementada con 100 mM de ATP durante 18 horas a  $\sim 40^{\circ}\text{C}$ , seguido de lavado tres veces del filtro en 2 x SSC, 0,2% de SDS a  $40^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos (astringencia baja), preferiblemente a  $50^{\circ}\text{C}$  (astringencia media), más preferiblemente a  $65^{\circ}\text{C}$  (astringencia alta), incluso más preferiblemente a  $\sim 75^{\circ}\text{C}$  (astringencia muy alta). Más detalles sobre el método de hibridación se pueden encontrar en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor, 1989.

[0021] En el contexto presente, "derivado de" está destinado no sólo a indicar una  $\alpha$ -amilasa producida o producible por una cepa del organismo en cuestión, sino también una  $\alpha$ -amilasa codificada por una secuencia de ADN aislada de esta cepa y producida en un organismo huésped transformado con dicha secuencia de ADN. Finalmente, el término se destina a indicar una  $\alpha$ -amilasa que está codificada por una secuencia de ADN de origen sintético y/o de ADNc y que tiene las características de identificación de la  $\alpha$ -amilasa en cuestión. El término está también destinado a indicar que la  $\alpha$ -amilasa original puede ser una variante de  $\alpha$ -amilasa de origen natural, es decir, una variante que es el resultado de una modificación (inserción, sustitución, delección) de uno o más residuos aminoácidos de la  $\alpha$ -amilasa de origen natural.

$\alpha$ -amilasas híbridas originales

[0022] La  $\alpha$ -amilasa original puede ser una  $\alpha$ -amilasa híbrida, es decir una  $\alpha$ -amilasa que comprende una combinación de secuencias de aminoácidos parciales derivada de al menos dos  $\alpha$ -amilasas.

[0023] La  $\alpha$ -amilasa original híbrida puede ser una que basándose en la homología de aminoácidos y/o reactividad cruzada inmunológica y/o hibridación del ADN (como se ha definido arriba) puede ser determinada para pertenecer a la familia de  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl. En este caso, la  $\alpha$ -amilasa híbrida está normalmente compuesta por al menos una parte de una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl y parte(s) de una o varias otras  $\alpha$ -amilasas seleccionadas de las  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl o  $\alpha$ -amilasas que no son de tipo Termamyl de origen microbiano (bacteriano o fúngico) y/o mamífero.

[0024] Así, la  $\alpha$ -amilasa híbrida original puede comprender una combinación de secuencias de aminoácidos parciales que derivan de al menos dos  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl, o de al menos una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl y al menos una  $\alpha$ -amilasa bacteriana no de tipo Termamyl, o de al menos una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl y al menos una fúngica. La  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl de la cual deriva una secuencia de aminoácidos parcial puede, p. ej., ser cualquiera de estas  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl específicas a las que se hace referencia en este caso.

[0025] Por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa original puede comprender una parte C-terminal de una  $\alpha$ -amilasa derivada de una cepa de *B. licheniformis*, y una parte N-terminal de una  $\alpha$ -amilasa derivada de una cepa de *B. amyloliquefaciens* o de una cepa de *B. stearothermophilus*. Por ejemplo, la  $\alpha$ -amilasa original puede comprender al menos 430 residuos de aminoácidos de la parte C-terminal de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*, y puede, p. ej. comprender a) un segmento de aminoácido correspondiente a los 37 residuos de aminoácidos N-terminales de la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 5 y un segmento de aminoácido correspondiente a 445 residuos de aminoácidos C-terminales de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID n°. 4, o b) un segmento de aminoácido correspondiente a los 68 residuos de aminoácidos N-terminales de la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 3 y un segmento de aminoácido correspondiente a los 415 residuos de aminoácidos C-terminales de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 4.

[0026] La  $\alpha$ -amilasa que no es de tipo Termamyl puede, p. ej., ser una  $\alpha$ -amilasa fúngica, una  $\alpha$ -amilasa mamífera o vegetal o una  $\alpha$ -amilasa bacteriana (diferente de una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl). Ejemplos específicos de tales  $\alpha$ -amilasas incluyen la TAKA  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae*, la  $\alpha$ -amilasa ácida de *A. niger*, la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus subtilis*, la  $\alpha$ -amilasa pancreática porcina y una  $\alpha$ -amilasa de cebada. Todas estas  $\alpha$ -amilasas han dilucidado estructuras que son marcadamente diferentes de la estructura de una  $\alpha$ -amilasa típica tipo Termamyl como se ha hecho referencia en este caso.

[0027] Las  $\alpha$ -amilasas fúngicas mencionadas arriba, es decir, derivadas de *A. niger* y *A. oryzae*, son altamente homólogas a nivel aminoácido y se considera generalmente que pertenecen a la misma familia de  $\alpha$ -amilasas. La  $\alpha$ -amilasa fúngica derivada de *Aspergillus oryzae* está comercialmente disponible bajo el nombre comercial Fungamyl™.

5 [0028] Además, cuando se hace referencia a una variante particular de una  $\alpha$ -amilasa (variante de la invención) tipo Termamyl - en una manera convencional - por referencia a la modificación (p. ej. delección o sustitución) de residuos de aminoácidos específicos en la secuencia de aminoácidos de una  $\alpha$ -amilasa específica tipo Termamyl, debe entenderse que variantes de otra  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl modificadas en la(s) posición(es) equivalente(s) (según está determinado a partir del mejor alineamiento de secuencia de aminoácidos posible entre las secuencias de aminoácidos respectivas) están incluidas de ese modo.

10 [0029] Una forma de realización preferida de una variante de la invención es una derivada de una  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* (como la  $\alpha$ -amilasa original tipo Termamyl), p. ej. una de aquellas a las que se hace referencia arriba, tal como la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 4.

15 Construcción de variantes de la invención

[0030] La construcción de la variante de interés se puede realizar mediante el cultivo de un microorganismo que comprende una secuencia de ADN que codifica la variante bajo condiciones que son propicias para producir la variante. La variante puede luego ser recuperada posteriormente del caldo de cultivo resultante. Esto se describe con más detalle abajo.

20 Propiedades alteradas de variantes de la invención

[0031] A continuación se discute la relación entre mutaciones que pueden estar presentes en variantes de la invención, y alteraciones deseables en propiedades (relativas a las de la  $\alpha$ -amilasa original tipo Termamyl) que pueden resultar de las mismas.

25 Termoestabilidad aumentada a pH ácido y/o a baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$

[0032] Mutaciones de relevancia particular en relación con la obtención de variantes según la invención con termoestabilidad aumentada a pH ácido y/o a baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  incluyen mutaciones en la posición N190 (relativas a la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*, SEC ID N°: 4).

30 [0033] En el contexto de la invención, el término "pH ácido" se refiere a un pH por debajo de 7.0, especialmente debajo del rango de pH donde se realizan normalmente los procesos industriales de licuefacción del almidón, que está entre pH 5.5 y 6.2.

[0034] En el contexto de la presente invención el término "baja concentración de calcio" significa concentraciones por debajo del nivel normal usado en la licuefacción del almidón industrial. Las concentraciones normales varían dependiendo de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el maíz. Normalmente se añade una dosificación correspondiente a 1mM (40ppm) que con el nivel en el maíz da entre 40 y 60ppm de  $\text{Ca}^{2+}$  libre.

40 [0035] En el contexto de la invención el término "temperaturas elevadas" significa temperaturas entre 95°C y 160°C, especialmente el rango de temperatura donde se realizan normalmente los procesos industriales de licuefacción del almidón que está entre 95°C y 105°C.

[0036] Los inventores han descubierto ahora que la termoestabilidad a pH ácido y/o a baja concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser aumentada incluso más combinando ciertas mutaciones que incluyen las mutaciones anteriormente mencionadas y/o I201 entre sí.

50 [0037] Dichas mutaciones "anteriormente mencionadas" es la siguiente (relativa a la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis*, SEC ID N°: 4): N190.

[0038] Según la presente invención, dicha mutación en N190 se puede combinar además con delecciones en dos posiciones como se describe en la WO 96/23873 (es decir, en las posiciones T183 y G184 en SEC ID N°: 1 de la presente). Por lo tanto, según la invención las variantes de una  $\alpha$ -amilasa original tipo Termamyl con actividad  $\alpha$ -amilasa que comprende las mutaciones T183\* y G184\* y una sustitución seleccionada de N195A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V están contempladas.

60 [0039] Debe ser enfatizado que no sólo las  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl mencionadas específicamente abajo están contempladas. También otras  $\alpha$ -amilasas comerciales tipo Termamyl están contempladas. Una lista no exhaustiva de estas  $\alpha$ -amilasas es la siguiente:  $\alpha$ -amilasas producidas por la cepa de *B. licheniformis* descrita en EP 0252666 (ATCC 27811) y las  $\alpha$ -amilasas identificadas en la WO 91/00353 y la WO 94/18314. Otras  $\alpha$ -amilasas comerciales tipo Termamyl de *B. licheniformis* son Optitherm™ y Takatherm™ (disponibles de Solvay), Maxamyl™ (disponible de Gist-Brocades/Genencor), Spezym AA™ Spezyme Delta AA™ (disponible de Genencor), y Keistase™ (disponible de Daiwa).

[0040] Se puede mencionar aquí que los residuos de aminoácidos, respectivamente, en posiciones correspondientes a N190, I201, D207 y E211, respectivamente, en la SEC ID N°: 4 constituyen residuos de aminoácidos que son conservadas en numerosas  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl. Así, por ejemplo, las posiciones correspondientes de estos residuos en las secuencias de aminoácidos de varias  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl que han sido ya mencionadas (véase *supra*) son las siguientes:

Tabla 1.

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

[0041] Mutaciones de estos residuos de aminoácidos conservados son muy importantes en relación con la mejora de la termoestabilidad a pH ácido y/o a baja concentración de calcio, y las mutaciones siguientes son de interés particular a este respecto (con referencia a la numeración de la secuencia de aminoácidos de *B. licheniformis* mostrada en la SEC ID N°: 4).

[0042] Deleciones de aminoácidos emparejados en posiciones correspondientes a R179-G182 en la SEC ID N°: 3 correspondientes a un espacio en la SEC ID N°: 4. cuando se alinea con numerosas  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl. Así, por ejemplo, las posiciones correspondientes de estos residuos en las secuencias de aminoácidos de varias  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl que ya han sido mencionadas (véase *supra*) son las siguientes:

Tabla 2.

$\alpha$ -amilasa tipo Termamyl	Deleciones de aminoácidos emparejados entre			
<i>B. amyloliquefaciens</i> ( SEC ID N°: 5)	R176,	G177,	E178,	G179
<i>B. stearothersophilus</i> ( SEC ID N°: 3)	R179,	G180,	I181,	G182
<i>Bacillus</i> WO 95/26397 ( SEC ID N°: 2)	R181,	G182,	T183,	G184
<i>Bacillus</i> WO 95/26397 ( SEC ID N°: 1)	R181,	G182,	D183,	G184
" <i>Bacillus</i> sp. #707" ( SEC ID N°: 6)	R181,	G182,	H183,	G184

[0043] Cuando se usa la SEC ID N°: 1 a la SEC ID N°: 6 como el esqueleto (es decir, como la  $\alpha$ -amilasa original tipo Termamyl) dos o tres mutaciones se pueden hacer según la invención en las siguientes regiones/posiciones para aumentar la termoestabilidad a pH ácido y/o a bajas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  (relativas a la original):

(relativo a SEC ID N°: 1 aquí):

- 1: una deleción de par de T183\*, G184\*; y
- 2: N195A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;

(relativo a SEC ID N°: 2 aquí):

- 1: una deleción de par de D183\*, G184\*; y
- 2: N195A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;

(relativo a SEC ID N°: 3 aquí):

- 1: una deleción de par de I181\*, G182\*; y
- 2: N193A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;

(relativo a SEC ID N°: 4 aquí):

- 1: una deleción de par de Q178\*, G179\*; y
- 2: N190A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;

(relativo a SEC ID N°: 5 aquí):

- 1: una deleción de par de E178\*, G179\*; y
- 2: N190A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V;

(relativo a SEC ID N°: 6 aquí):

- 1: una deleción de par de H183\*, G184\*; y

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

Mutaciones específicas dobles para el esqueleto SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 6 están catalogadas a continuación.

- 5 [0044] Usando la SEC ID N°: 1 como el esqueleto, las siguientes mutaciones dobles que dan como resultado el efecto deseado están contempladas según la invención:
- T183\*/G184\*/N195A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V.
- 10 [0045] Usando la SEC ID N°: 2 como el esqueleto, las siguientes mutaciones dobles que dan como resultado el efecto deseado están contempladas según la invención:
- D183\*/G189\*/N195A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V.
- 15 [0046] Usando la SEC ID n°. 3 como el esqueleto, las siguientes mutaciones dobles que dan como resultado el efecto deseado están contempladas según la invención:
- I181\*/G182\*/N193A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V.
- 20 [0047] Usando la SEC ID n°. 4 como el esqueleto, las siguientes mutaciones dobles que dan como resultado el efecto deseado están contempladas según la invención:
- Q178\*/G179\*/N190A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V.
- 25 [0048] Usando la SEC ID N°: 5 como el esqueleto, las siguientes mutaciones dobles que dan como resultado el efecto deseado están contempladas según la invención:
- E178\*/G179\*/N190A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V.
- 30 [0049] Usando la SEC ID N°: 6 como el esqueleto, las mutaciones siguientes dobles que dan como resultado el efecto deseado están contempladas según la invención:
- H183\*/G184\*/N195A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V.
- 35 [0050] Todas las  $\alpha$ -amilasas tipo Termamyl definidas arriba pueden ser usadas de manera adecuada como el esqueleto para preparar variantes de la invención.
- Mutaciones generales en variantes de la invención
- 40 [0051] Puede ser preferido que una variante de la invención comprenda una o más modificaciones además de estas perfiladas arriba. Así, puede ser ventajoso que uno o más residuos de prolina presentes en la parte de la variante de  $\alpha$ -amilasa que está modificada sea/n sustituido(s) con un residuo sin prolina que puede ser cualquiera de los residuos sin prolina posibles de origen natural, y que preferiblemente es una alanina, glicina, serina, treonina, valina o leucina.
- 45 [0052] De forma análoga, puede ser preferido que uno o más residuos de cisteína presentes entre los residuos de aminoácidos con el cual la  $\alpha$ -amilasa original es modificada sea/n sustituidos por un residuo sin cisteína tal como serina, alanina, treonina, glicina, valina o leucina.
- [0053] Además, una variante de la invención puede - bien como la única modificación o en combinación con cualquiera de las modificaciones perfiladas anteriores - ser modificada de modo que uno o más Asp y/o Glu presentes en un fragmento de aminoácido correspondiente al fragmento de aminoácido 185-209 de la SEC ID N°: 4 sea sustituido por un Asn y/o Gln, respectivamente. También de interés es la sustitución, en la  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl, de uno o más de los residuos de Lys presentes en un fragmento de aminoácido correspondiente al fragmento de aminoácido 185-209 de la SEC ID N°: 4 por un Arg.
- 50
- 55 [0054] Será entendido que la presente invención comprende variantes que incorporan dos o más de las modificaciones perfiladas arriba.
- [0055] Además, puede ser ventajoso introducir mutaciones puntuales en cualquiera de las variantes descritas aquí.
- 60 Métodos para preparar variantes de  $\alpha$ -amilasa
- [0056] Diferentes métodos para introducir mutaciones en genes son conocidos en la técnica. Después de una discusión breve de la clonación de las secuencias de ADN que codifican la  $\alpha$ -amilasa, métodos para generar mutaciones en sitios específicos dentro de la secuencia que codifica la  $\alpha$ -amilasa serán discutidos.
- 65

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

[0057] La secuencia de ADN que codifica una  $\alpha$ -amilasa original puede ser aislada de cualquier célula o microorganismo que produce la  $\alpha$ -amilasa en cuestión, usando varios métodos bien conocidos en la técnica. Primero, un ADN genómico y/o biblioteca de ADNc debería ser construido usando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la  $\alpha$ -amilasa que debe ser estudiada. Luego, si la secuencia de aminoácidos de la  $\alpha$ -amilasa es conocida, homólogos, sondas de oligonucleótidos marcadas pueden ser sintetizadas y usadas para identificar clones de codificación de  $\alpha$ -amilasa de una genoteca obtenida a partir del organismo en cuestión. De forma alternativa, una sonda de oligonucleótidos marcada que contiene secuencias homólogas a un gen de  $\alpha$ -amilasa conocido podría ser usada como una sonda para identificar clones de codificación de  $\alpha$ -amilasa, usando condiciones de hibridación y de lavado de menor astringencia.

[0058] Otro método adicional para identificar clones de codificación de  $\alpha$ -amilasa implica insertar fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformar las bacterias  $\alpha$ -amilasa-negativas con la biblioteca resultante de ADN genómico, y luego disponer en placas las bacterias transformadas sobre agar con un sustrato para  $\alpha$ -amilasa, de ese modo permitiendo que los clones que expresan la  $\alpha$ -amilasa sean identificados.

[0059] De forma alternativa, la secuencia de ADN que codifica la enzima puede ser preparada sintéticamente por métodos estándares establecidos, p. ej. el método de fosforamidita descrito por S.L. Beaucage y M.H. Caruthers (1981) o el método descrito por Matthes *et al.* (1984). En el método de fosforamidita, los oligonucleótidos son sintetizados, p. ej. en un sintetizador de ADN automático, purificados, anillados, ligados y clonados en vectores apropiados.

[0060] Finalmente, la secuencia de ADN puede ser de origen mezclado genómico y sintético, de origen mezclado sintético y de ADNc o de origen mezclado genómico y de ADNc, preparada para ligar fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según sea apropiado, los fragmentos correspondientes a varias partes de la secuencia de ADN entera), conforme a las técnicas estándares. La secuencia de ADN puede también ser preparada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4.683.202 o R.K. Saiki *et al.* (1988).

Mutagénesis dirigida

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

[0062] Otro método para introducir mutaciones en secuencias de ADN de codificación de  $\alpha$ -amilasa está descrita en Nelson y Long (1989). Esto implica la generación en 3 fases de un fragmento de la PCR que contiene la mutación deseada introducida usando una cadena de ADN sintetizada químicamente como uno de los cebadores en las reacciones de la PCR. Del fragmento generado por PCR, un fragmento de ADN portador de la mutación puede ser aislado por seccionamiento con endonucleasas de restricción y reinsertado en un plásmido de expresión.

Mutagénesis aleatoria

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

[0064] La mutagénesis aleatoria de una secuencia de ADN que codifica una  $\alpha$ -amilasa original puede ser convenientemente realizada usando cualquier método conocido en la técnica.

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

- (a) someter una secuencia de ADN que codifica la  $\alpha$ -amilasa original a mutagénesis aleatoria,
- (b) expresar la secuencia de ADN mutada obtenida en la fase (a) en una célula huésped, y



(c) seleccionar las células huéspedes que expresan una variante de  $\alpha$ -amilasa que tiene una propiedad alterada (es decir, termoestabilidad) con respecto a la  $\alpha$ -amilasa original

[0066] La fase (a) del método anterior de la invención se realiza preferiblemente usando cebadores dopados.

[0067] Por ejemplo, la mutagénesis aleatoria puede ser realizada usando un agente mutagenizante físico o químico adecuado, usando un oligonucleótido adecuado, o sometiendo la secuencia de ADN a mutagénesis generada por PCR. Además, la mutagénesis aleatoria puede ser realizada usando cualquier combinación de estos agentes mutagenizantes. El agente mutagenizante puede, p. ej., ser uno que induce transiciones, transversiones, inversiones, aleatorización, deleciones, y/o inserciones.

[0068] Ejemplos de un agente mutagenizante físico o químico adecuado para el presente objetivo incluyen irradiación ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), O-metil hidroxilamina, ácido nitroso, etil metano de sulfonato (EMS), bisulfito de sodio, ácido fórmico, y análogos de nucleótidos. Cuando tales agentes son usados, la mutagénesis es normalmente realizada incubando la secuencia de ADN que codifica la enzima madre para ser mutagenizada en presencia del agente mutagenizante de elección bajo condiciones adecuadas para que la mutagénesis tenga lugar, y seleccionando el ADN mutado con las propiedades deseadas.

[0069] Cuando la mutagénesis es realizada por el uso de un oligonucleótido, el oligonucleótido puede ser dopado o adicionado con los tres nucleótidos no originales durante la síntesis del oligonucleótido en las posiciones que deben ser cambiadas. El dopaje o adicionado puede ser hecho de modo que los codones para los aminoácidos indeseados sean evitados. Los oligonucleótidos dopados o adicionados pueden ser incorporados en el ADN que codifica la enzima  $\alpha$ -amilasa por cualquier técnica publicada, usando p. ej. PCR, LCR o cualquier ADN polimerasa y ligasa según se estime apropiado.

[0070] Preferiblemente, el dopaje se realiza usando el "dopaje aleatorio constante", donde el porcentaje de tipo salvaje y la mutación en cada posición está predefinido. Además, el dopaje puede ser dirigido hacia una preferencia para la introducción de nucleótidos determinados, y de ese modo una preferencia para la introducción de uno o más residuos de aminoácidos específicos. El dopaje puede ser hecho, p. ej., para permitir la introducción del 90% de tipo salvaje y del 10% de mutaciones en cada posición. Una consideración adicional en la elección de un esquema de dopaje se basa en limitaciones genéticas así como en estructurales de las proteínas. El esquema de dopaje puede ser hecho usando el programa DOPE que, entre otras cosas, asegura que se evita la introducción de codones de parada. Cuando se usa la mutagénesis generada por PCR, bien un gen tratado químicamente o que codifica una  $\alpha$ -amilasa original no tratada es sometido a PCR bajo condiciones que aumentan la desincorporación de nucleótidos (Deshler 1992. Leung *et al.*, Technique, Vol.1, 1989, págs. 11-15).

[0071] Cuando se usa mutagénesis generada por PCR, bien un gen tratado o no tratado químicamente que codifica una  $\alpha$ -amilasa original se somete a PCR bajo condiciones que aumentan la mala incorporación de nucleótidos (Deshler 1992; Leung *et al.*, Technique, Vol.1, 1989, pp. 11-15 ).

[0072] Una cepa mutágena de *E. coli* (Fowler *et al.*, Molec. Gen. Genet., 133, 1974, págs. 179-191), *S. cerevisiae* o cualquier otro organismo microbiano puede ser usada para la mutagénesis aleatoria del ADN que codifica la  $\alpha$ -amilasa por, p. ej., transformación de un plásmido conteniendo la glicosilasa original en la cepa mutágena, crecimiento de la cepa mutágena con el plásmido y aislamiento del plásmido mutado de la cepa mutágena. El plásmido mutado puede ser posteriormente transformado en el organismo de expresión.

[0073] La secuencia de ADN para ser mutagenizada puede estar convenientemente presente en una biblioteca genómica o de ADNc obtenida a partir de un organismo que expresa la  $\alpha$ -amilasa original. De forma alternativa, la secuencia de ADN puede estar presente en un vector adecuado tal como un plásmido o un bacteriófago, que como tal puede ser incubado con o expuesto de otra manera al agente mutagenizante. El ADN para ser mutagenizado puede también estar presente en una célula huésped bien siendo integrado en el genoma de dicha célula o estando presente en un vector albergado en la célula. Finalmente, el ADN para ser mutagenizado puede estar en forma aislada. Se entenderá que la secuencia de ADN para ser sometida a mutagénesis aleatoria es preferiblemente una secuencia de ADNc o de ADN genómico.

[0074] En algunos casos puede ser conveniente amplificar la secuencia de ADN mutada antes de realizar la fase de expresión b) o la fase de selección c). Tal amplificación puede ser realizada conforme a métodos conocidos en la técnica, el método actualmente preferido siendo la amplificación generada por PCR usando cebadores oligonucleótidos preparados basándose en la secuencia de ADN o de aminoácidos de la enzima original.

[0075] Después de la incubación con o exposición al agente mutagenizante, el ADN mutado es expresado mediante cultivo de una célula huésped adecuada llevando la secuencia de ADN bajo condiciones que permiten que la expresión tenga lugar. La célula huésped usada para este propósito puede ser una que haya sido transformada con la secuencia de ADN mutada, opcionalmente presente en un vector, o una que lleve la secuencia de ADN que codifica la enzima madre durante el tratamiento de mutagénesis. Ejemplos de células huéspedes adecuadas son los siguientes: bacterias gram positivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus*

*stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; y bacterias gram-negativas tales como *E. coli*.

5 [0076] La secuencia de ADN mutada puede además comprender una secuencia de ADN que codifica funciones que permiten la expresión de la secuencia de ADN mutada.

Mutagénesis localizada aleatoria

10 [0077] La mutagénesis aleatoria puede estar ventajosamente localizada en una parte de la  $\alpha$ -amilasa original en cuestión. Esto puede, p. ej., ser ventajoso cuando ciertas regiones de la enzima han sido identificadas para ser de importancia particular para una propiedad dada de la enzima, y cuando se modifican se prevé que resultarán en una variante con propiedades mejoradas. Tales regiones pueden normalmente ser identificadas cuando la estructura terciaria de la enzima madre ha sido dilucidada y relacionada con la función de la enzima.

15 [0078] La mutagénesis aleatoria localizada, o específica es convenientemente realizada usando técnicas de mutagénesis generada por PCR como se ha descrito anteriormente o cualquier otra técnica adecuada conocida en la técnica. De forma alternativa, la secuencia de ADN que codifica la parte de la secuencia de ADN para ser modificada puede ser aislada, p. ej., por inserción en un vector adecuado, y dicha parte puede ser posteriormente sometida a mutagénesis usando cualquiera de los métodos de mutagénesis mencionados anteriormente.

20 Métodos alternativos de suministro de variantes de  $\alpha$ -amilasa

[0079] Métodos alternativos para suministrar variantes de la invención incluyen el método de transposición de genes conocido en la técnica incluyendo los métodos p. ej. descritos en WO 95/22625 (de Affymax Technologies N.V.) y WO 25 96/00343 (de Novo Nordisk A/S).

Expresión de variantes de  $\alpha$ -amilasa

30 [0080] Según la invención, una secuencia de ADN que codifica la variante producida por métodos anteriormente descritos, o por cualesquiera métodos alternativos conocidos en la técnica, pueden ser expresados, en forma enzimática, usando un vector de expresión que normalmente incluye las secuencias de control que codifican un promotor, operador, sitio de unión al ribosoma, señal de iniciación de la traducción, y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores.

35 [0081] El vector de expresión recombinante que lleva la secuencia de ADN que codifica una variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención puede ser cualquier vector que puede ser sometido convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que debe ser introducido. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej. un plásmido, un bacteriófago 40 o un elemento extracromosómico, minicromosoma o un cromosoma artificial. De forma alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica con el(los) cromosoma(s) en el(los) que ha sido integrado.

45 [0082] En el vector, la secuencia de ADN debería ser operativamente conectada a una secuencia del promotor adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede ser derivada de genes que codifican proteínas bien homólogas o heterólogas a la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN que codifica una variante de  $\alpha$ -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  $\alpha$ -amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, los promotores del gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, los 50 promotores de la  $\alpha$ -amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, los promotores de los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis* etc. Para la transcripción en un huésped fúngico, ejemplos de promotores útiles son estos derivados del gen que codifica la TAKA amilasa de *A. oryzae*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la  $\alpha$ -amilasa neutra de *A. niger*, la  $\alpha$ -amilasa estable en ácido de *A. niger*, la glucoamilasa de *A. niger*, la lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteasa alcalina 55 de *A. oryzae*, la triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae* o la acetamidasa de *A. nidulans*.

[0083] El vector de expresión de la invención puede también comprender un terminador de la transcripción adecuado y, en eucariotas, las secuencias de poliadenilación conectadas operativamente a la secuencia de ADN que codifica la variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención. Las secuencias de terminación y de poliadenilación pueden derivar de manera 60 adecuada de las mismas fuentes que el promotor.

[0084] El vector puede además comprender una secuencia de ADN que permite que el vector se replique 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.

65

[0085] El vector puede también comprender un marcador seleccionable, p. ej. un gen cuyo producto implementa una falta en la célula huésped, tal como los genes *dal* de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, o uno que confiere resistencia antibiótica tal como resistencia a la ampicilina, la canamicina, el cloranfenicol o la tetraciclina. Además, el vector puede comprender marcadores de selección de *Aspergillus* tales como *amdS*, *argB*, *niaD* y *sC*, un marcador que da lugar a la resistencia a la higromicina, o la selección puede ser realizada por cotransformación, p. ej. como se describe en WO 91/17243.

[0086] Mientras que la expresión intracelular puede ser ventajosa en algunos aspectos, p. ej. cuando se usan bacterias determinadas como las células huéspedes, es generalmente preferido que la expresión sea extracelular. En general, las  $\alpha$ -amilasas de *Bacillus* mencionadas aquí comprenden una prerregión que permite la secreción de la proteasa expresada en el medio de cultivo. Si se desea, esta prerregión puede ser sustituida por una prerregión diferente o secuencia señal, convenientemente realizada por sustitución de las secuencias de ADN que codifican las prerregiones respectivas.

[0087] Los procedimientos usados para enlazar el constructo de ADN de la invención que codifica una variante de  $\alpha$ -amilasa, el promotor, terminador y otros elementos, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados conteniendo la información necesaria para la replicación, son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989 ).

[0088] La célula de la invención, bien comprendiendo un constructo de ADN o un vector de expresión de la invención tal como se ha definido anteriormente, es usado ventajosamente como una célula huésped en la producción recombinante de una variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención. La célula puede ser transformada con el constructo de ADN de la invención que codifica la variante, integrando convenientemente el constructo de ADN (en una o más copias) en el cromosoma huésped. Esta integración está generalmente considerada como una ventaja puesto que la secuencia de ADN es más propensa a ser mantenida de forma estable en la célula. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped puede ser realizada según métodos convencionales, p. ej. por recombinación homóloga o heteróloga. De forma alternativa, la célula puede ser transformada con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en relación con los diferentes tipos de células huéspedes.

[0089] La célula de la invención puede ser una célula de un organismo mayor tal como un mamífero o un insecto, pero es preferiblemente una célula microbiana, p. ej. una célula bacteriana o una fúngica (incluyendo la levadura).

[0090] 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 por transformación de protoplastos o usando células competentes de una manera conocida *per se*.

[0091] El organismo de levadura puede ser seleccionado favorablemente de una especie de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, p. ej. *Saccharomyces cerevisiae*. El hongo filamentoso puede ventajosamente pertenecer a una especie de *Aspergillus*, p. ej. *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*. Células micóticas pueden ser transformadas por un proceso que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguida por la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Un procedimiento adecuado para la transformación de células huéspedes de *Aspergillus* está descrito en EP 238 023.

[0092] En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para producir una variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención, dicho método comprende el cultivo de una célula huésped como se ha descrito anteriormente bajo condiciones propicias para la producción de la variante y la recuperación de la variante de las células y/o del medio de cultivo.

[0093] El medio usado para cultivar las células pueden ser cualquier medio convencional adecuado para el crecimiento de la célula huésped en cuestión y la obtención de la expresión de la variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o pueden ser preparados según recetas publicadas (p. ej. como se describe en los catálogos de la American Type Culture Collection).

[0094] La variante de  $\alpha$ -amilasa segregada de las células huéspedes pueden ser recuperadas convenientemente del medio de cultivo por procedimientos bien conocidos, incluyendo la separación de las células del medio por centrifugado o por filtración, y la precipitación de los componentes proteínicos del medio mediante una sal tal como sulfato de amonio, seguido del uso de procedimientos cromatográficos tales como la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, o similares.

#### Aplicaciones industriales

[0095] Las variantes de  $\alpha$ -amilasa de esta invención poseen propiedades valiosas que permiten una variedad de aplicaciones industriales. En particular, las variantes de la enzima de la invención son aplicables como un componente

en composiciones de detergentes para lavar la ropa, la vajilla y de limpieza de superficies duras. Numerosas variantes son particularmente útiles en la producción de edulcorantes y etanol del almidón, y/o para el desencolado textil.

Condiciones para procesos de conversión del almidón convencionales, incluyendo procesos de licuefacción y/o de sacarificación del almidón, están descritos en, p. ej., US 3.912.590 y en las publicaciones de patentes EP Nos. 252 730 y 63 909.

Producción de edulcorantes a partir del almidón:

[0096] Un proceso "tradicional" para la conversión del almidón en jarabes de fructosa normalmente consiste en tres procesos enzimáticos consecutivos, es decir, un proceso de licuefacción seguido de un proceso de sacarificación y un proceso de isomerización. Durante el proceso de licuefacción, el almidón es degradado por dextrinas por una  $\alpha$ -amilasa (p. ej. Termamyl™) a valores de pH entre 5.5 y 6.2 y a temperaturas de 95-160°C para un periodo de aprox. 2 horas. Para asegurar una estabilidad enzimática óptima bajo estas condiciones, se añade 1 mM de calcio (40 ppm de iones de calcio libre).

[0097] Después del proceso de licuefacción las dextrinas son convertidas en dextrosa por adición de una glucoamilasa (p. ej. AMG™) y una enzima desramificante, tal como una isoamilasa o una pululanasa (p. ej. Promozyme™). Antes de esta fase el pH es reducido a un valor debajo de 4.5, manteniendo la temperatura elevada (por encima de 95°C), y la actividad licuefactora de la  $\alpha$ -amilasa es desnaturalizada. La temperatura es bajada a 60°C, y la glucoamilasa y la enzima desramificante son agregadas. El proceso de sacarificación procede durante 24-72 horas.

[0098] Después del proceso de sacarificación el pH es aumentado a un valor en la gama de 6-8, preferiblemente pH 7.5, y el calcio es eliminado por intercambio iónico. El jarabe de dextrosa es luego convertido en jarabe rico en fructosa usando, p. ej., una glucosaisomerasa inmovilizada (tal como Sweetzyme™).

[0099] Al menos 1 mejora enzimática de este proceso podría ser prevista. La reducción de la dependencia de calcio de la  $\alpha$ -amilasa licuefactora. La adición de calcio libre es requerida para asegurar una estabilidad adecuadamente alta de la  $\alpha$ -amilasa, pero el calcio libre inhibe fuertemente la actividad de la glucosaisomerasa y debe ser eliminado, mediante una operación de unidad costosa, hasta una extensión que reduce el nivel de calcio libre por debajo de 3-5 ppm. Se podrían obtener ahorros en el coste si tal operación pudiera ser evitada y el proceso de licuefacción pudiera ser realizado sin adición de iones de calcio libre.

[0100] Para conseguir esto, una  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl menos dependiente de calcio que es estable y altamente activa a concentraciones bajas de calcio libre (< 40 ppm) es requerida. Tal  $\alpha$ -amilasa tipo Termamyl debería tener un pH óptimo a un pH en la gama de 4.5-6.5, preferiblemente en la gama de 4.5-5.5.

Composiciones de detergentes

[0101] Como se ha mencionado anteriormente, variantes de la invención pueden de manera adecuada ser incorporadas en composiciones de detergentes. Una termoestabilidad aumentada a concentraciones de calcio bajas serían muy provechosas para el rendimiento de la amilasa en detergentes, es decir, la región alcalina. Se hace referencia, por ejemplo, a WO 96/23874 y WO 97/07202 para detalles adicionales en lo que se refiere a ingredientes pertinentes de composiciones de detergentes (tales como detergentes para lavar la ropa o la vajilla), métodos apropiados de formulación de las variantes en tales composiciones de detergentes, y a ejemplos de tipos pertinentes de composiciones de detergentes.

[0102] Composiciones de detergentes que comprenden una variante de la invención pueden adicionalmente comprender una o más enzimas adicionales, tales como una lipasa, cutinasa, proteasa, celulasa, peroxidasa o lacasa, y/u otra  $\alpha$ -amilasa.

[0103] Las variantes de  $\alpha$ -amilasa de la invención pueden ser incorporadas en detergentes a concentraciones empleadas de forma convencional. Está actualmente contemplado que una variante de la invención puede ser incorporada en una cantidad correspondiente a 0,00001-1 mg (calculada como proteína enzimática pura activa) de  $\alpha$ -amilasa por litro de solución de detergente para lavar la ropa/la vajilla usando niveles de dosificación convencionales de detergente.

[0104] La invención también se refiere a una composición comprendiendo una mezcla de una o más variantes de la invención derivadas de (como la  $\alpha$ -amilasa original tipo Termamyl) la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* que tiene la secuencia mostrada en SEC ID N°: 3 y una alfa-amilasa tipo Termamyl derivada de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia mostrada en SEC ID N°: 4.

[0105] Además, la invención también se refiere a una composición comprendiendo una mezcla de una o más variantes según la invención derivada de (como la  $\alpha$ -amilasa de original tipo Termamyl) la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* que tiene la secuencia mostrada en la SEC ID N°: 3 y una alfa-amilasa híbrida que comprende una parte de la  $\alpha$ -amilasa de *B. amyloliquefaciens* mostrada en la SEC ID N°: 5 y una parte de la  $\alpha$ -amilasa de *B. licheniformis* mostrada en la SEC ID N°: 4. Esta  $\alpha$ -amilasa híbrida tipo Termamyl mencionada comprende los 445 residuos de aminoácidos C-terminales

de *B. licheniformis* mostrados en la SEC ID N°: 4 y los 37 residuos de aminoácidos N-terminales de la  $\alpha$ -amilasa derivada de *B. amyloliquefaciens* mostrada en la SEC ID N°: 5. Esta última  $\alpha$ -amilasa híbrida mencionada puede de manera adecuada comprender las mutaciones siguientes: H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S (usando la numeración en la SEC ID N°: 4). En los ejemplos abajo dicha  $\alpha$ -amilasa híbrida original tipo Termamyl, se usa en combinación con variantes de la invención, dichas variantes pueden ser usadas en composiciones de la invención.

[0106] En una forma de realización específica de la invención la composición comprende una mezcla de TVB146 y LE174, p. ej., en una proporción de 2:1 a 1:2, tal como 1:1.

[0107] Una variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención o una composición de la invención puede en un aspecto de la invención ser usada para lavar la ropa y/o la vajilla; para desencolado textil o para licuefacción de almidón.

#### Materiales y métodos

##### Enzimas:

[0108] BSG alfa-amilasa: alfa-amilasa de *B. stearrowthermophilus* representada en la SEC ID N°: 3.  
 Variante TVB146 de alfa-amilasa: una variante de alfa-amilasa de *B. stearrowthermophilus* representada en la SEC ID N°: 3 con las mutaciones siguientes: con la delección en las posiciones I181-G182 + N193F. variante LE174 de alfa-amilasa híbrida:

LE174 es una alfa-amilasa híbrida tipo Termamyl que es idéntica a la secuencia de Termamyl, es decir, la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en la SEC ID N°: 4, a excepción de que los 35 residuos de aminoácidos N-terminales (de la proteína madura) han sido sustituidos por los 33 residuos N-terminales de BAN (proteína madura), es decir, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en la SEC ID N°: 5, que además tiene las siguientes mutaciones: H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S (usando la numeración de la SEC ID N°: 4). LE174 fue construida por SOE-PCR (Higuchi *et al.* 1988, Nucleic Acids Research 16:7351 ).

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

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

Composición de medio BPX:

[0110]

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

[0111] El cultivo es agitado a 37°C a 270 rpm durante 5 días.

[0112] Células y detritos celulares son eliminados del caldo de fermentación por centrifugado a 4500 rpm en 20-25 minutos. Después el sobrenadante es filtrado para obtener una solución completamente clara. El filtrado es concentrado y lavado en un filtro UF (membrana de corte de 10000) y el tampón es cambiado a 20mM de acetato a pH 5.5. El filtrado UF es aplicado en una S-sepharose F.F. y la elución se realiza por elución de fase con 0,2M de NaCl en el mismo tampón. El eluato es dializado contra 10mM de Tris, pH 9.0 y aplicado en una Q-sepharose F.F. y eluido con un gradiente lineal de 0-0,3M de NaCl sobre 6 volúmenes de columna. Las fracciones que contienen la actividad (medida por el ensayo Phadebas) son agrupadas, el pH fue ajustado a pH 7.5 y el color restante fue eliminado por un tratamiento con 0,5% p/vol. carbón activo en 5 minutos.

##### Determinación de la actividad - (KNU)

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

## ES 2 536 878 T3

Sustrato	almidón soluble
Contenido de calcio en solvente	0,0043 M
Tiempo de reacción	7-20 minutos
Temperatura	37°C
pH	5.6

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

### Determinación de la actividad BS-amilasa - KNU(S)

5

#### 1. Campo de aplicación

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

#### 10 2. Principio

[0116] La BS-amilasa degrada el sustrato (4,6-etilideno(G<sub>7</sub>)-p-nitrofenil(G<sub>1</sub>)- $\alpha$ ,D-maltoheptaósido (escrito como etilideno-G<sub>7</sub>-PNP) en, entre otras cosas, G<sub>2</sub>-PNP y G<sub>3</sub>-PNP, donde G se refiere a glucosa y PNP a p-nitrofenol.

15 [0117] G<sub>2</sub>-PNP y G<sub>3</sub>-PNP son degradados por  $\alpha$ -glucosidasa, que se añade en exceso, en glucosa y el p-nitrofenol coloreado de amarillo.

[0118] La reacción del color es vigilada *in situ* y el cambio de absorbencia en el tiempo es calculado como una expresión de la velocidad de la reacción y por lo tanto de la actividad de la enzima. Véanse las pautas de Boehringer Mannheim 1442 309 para detalles adicionales.

20

#### 2.1 Condiciones de reacción

Reacción:

25

[0119]

Temperatura: 37°

pH: 7.1

30

[0120] Tiempo de preincubación: 2 minutos

Detección:

35

[0121]

Longitud de onda: 405 nm

Tiempo de medida: 3 minutos

40

#### 3. Definición de unidades

[0122] La actividad alfa-amilasa de *Bacillus stearothermofius* (BS-amilasa) es determinada con respecto a un estándar de actividad declarada y establecida en unidades Kilo Novo (*Stearothermophilus*) o KNU(S)).

45

#### 4. Especificidad y sensibilidad

[0123] Límite de determinación: aprox. 0.4 KNU(s)/g

#### 5. Aparato

50

[0124] Analizador de Cobas Fara

Diluido (p. ej. Hamilton Microlab 1000)

Equilibrio analítico (p. ej. Mettler AE 100)

Placas de agitación

55

#### 6. Reactivos/sustratos

[0125] Un equipo preparado se usa en este análisis para determinar la actividad  $\alpha$ -amilasa. Obsérvese que los reactivos específicos para el sustrato y la  $\alpha$ -glucosidasa no se usan como se describe en las pautas de Boehringer Mannheim. No

obstante, las designaciones "tampón", "cristal 1", cristal 1a" y cristal 2" son aquellas a las que se hace referencia en estas pautas.

6.1. Sustrato

5

[0126] 4, 6-etilideno(G<sub>7</sub>)-p-nitrofenil(G<sub>1</sub>)- $\alpha$ ,D-maltoheptaósido (escrito como etilideno-G<sub>7</sub>-PNP) p. ej. Boehringer Mannheim 1442 309

6.2 Reactivo auxiliar de  $\alpha$ -glucosidasa

10

[0127]  $\alpha$ -glucosidasa, p. ej. Boehringer Mannheim 1442 309

6.3 Solución BRIJ 35

15

[0128]

BRIJ 35 (30% p/v de Sigma 430 AG-6)  
Agua desmineralizada

1000 ml  
hasta 2.000 ml

6.4 Estabilizador

20

[0129]

Solución BRIJ 35  
CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O (Merck 2382)  
Agua desmineralizada

33 ml  
882 g  
hasta 2.000 ml

7. Muestras y estándares

25

7.1 Curva estándar

Ejemplo: preparación de curva estándar de BS-amilasa

30

[0130] El estándar pertinente es diluido a 0.60 KNU(s)/ml como sigue. Una cantidad calculada de estándar es pesada y añadida a un matraz aforado de 200 ml, que es rellenado hasta alrededor de la marca de 2/3 con agua desmineralizada. Se añade estabilizador correspondiente al 1% del volumen del matraz y el matraz es rellenado hasta la marca con agua desmineralizada.

35

[0131] Se utiliza un Hamilton Microlab 1000 para producir las diluciones mostradas abajo. Agua desmineralizada con 1% de estabilizador se usa como el diluyente.

Número de dilución	Solución de reserva enzimática	1% estabilizador	KNU(s)/ml
1	20 $\mu$ L	580 $\mu$ L	0,02
2	30 $\mu$ L	570 $\mu$ L	0,03
3	40 $\mu$ L	560 $\mu$ L	0,04
4	50 $\mu$ L	550 $\mu$ L	0,05
5	60 $\mu$ L	540 $\mu$ L	0,06

7.2 Control de nivel

40

[0132] Un control del nivel de BS amilasa de Novo Nordisk A/S está incluido en todas las series usando el Cobas Fara. El control es diluido con 1% estabilizador de modo que la dilución final está en la gama de la curva estándar. Todos los pesos y diluciones están anotados en la lista de trabajo

7.3 Soluciones de muestra

45

Determinación única

[0133] Muestras de fermentación (no muestras finales) a partir de la producción, todas las muestras de fermentación de instalaciones experimentales y muestras de estabilidad de almacenamiento son pesadas y analizadas una vez sólo.

50

[0134] Determinación doble en 1 serie:

[0135] Muestras de proceso, muestras de fermentación final a partir de la producción, muestras de estudios de GLP y muestras de R&D son pesadas y analizadas dos veces.

[0136] Determinaciones dobles en 2 series:

[0137] Muestras de producto acabado son pesadas y analizadas dos veces en dos series separadas.

Concentración máxima de muestras en forma de polvo: 5%

[0138] Muestras de prueba son diluidas con agua desmineralizada con el 1% de estabilizador hasta aprox. 0.037 KNU(S)/ml basándose en su actividad prevista. La dilución final es hecha directamente en el vaso de muestra.

## 8. Procedimiento

### 8.1 Programa de menú de Cobas

[0139]

- El Programa de menú de Cobas se utiliza para sugerir el peso/diluciones de muestras y el control de nivel que debe ser usado.
- Las muestras son introducidas en el programa con un único código de identificación y una lista de trabajo es impresa.
- Las muestras y control son pesados y diluidos como se establece en la lista de trabajo con los datos de peso escritos a mano se insertan en el cuaderno de trabajo para el análisis de BS-amilasa .
- Los resultados son registrados automáticamente por el Cobas Fara como se describe en artículo 9 y se imprime junto con la curva estándar.
- Las listas de trabajo y resultados impresos son insertados en el cuaderno de trabajo para el análisis de BS-amilasa.

### 8.2 Instalación de Cobas Fara

[0140]

- Las muestras son colocadas en el porta muestra
- Los cinco estándares son colocados en el bastidor de calibrado en la posición 1 a 5 (estándar más fuerte en la posición 5), y el control colocado en el mismo bastidor en la posición 10
- El sustrato es transferido a un contenedor de reactivo de 30 ml y colocado en un bastidor de reactivo en la posición 2 (soporte 1)
- El reactivo auxiliar de  $\alpha$ -glucosidasa es transferido a un contenedor de reactivo de 50 ml y colocado en el bastidor de reactivo en la posición 2 (soporte C)

### 8.3 Análisis de Cobas Fare

[0141] Los principios principales del análisis son los siguientes: 20 $\mu$ L de muestra y 10 $\mu$ L de agua de enjuague son introducidos con pipeta en la cubeta junto con 250 $\mu$ L de reactivo auxiliar de  $\alpha$ -glucosidasa. La cubeta gira durante 10 segundos y los reactivos son expulsados en las cubetas horizontales. 25 $\mu$ L de sustrato y 20 $\mu$ L de agua de enjuague son extraídos con pipeta. Después de un 1 segundo de espera para asegurar que la temperatura es de 37°C, la cubeta gira otra vez y el sustrato es mezclado en las cubetas horizontales. La absorbencia es medida por primera vez después de 120 segundos y luego cada 5 segundos. La absorbencia es medida un total de 37 veces para cada muestra.

## 9. Cálculos

[0142] La actividad de las muestras es calculada respecto a Novo Nordisk A/S estándar.

[0143] La curva estándar es trazada por el analizador. La curva debe ser suavemente curvada, enjuagando sin parar hasta una absorbencia de alrededor de 0.25 para el estándar n°. 5.

[0144] La actividad de las muestras en KNU(S)/ml es leída de la curva estándar por el analizador.

[0145] Los cálculos finales para permitir que los pesos/diluciones usados emplean la fórmula siguiente:

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

S= lectura del resultado del análisis (KNU(S)/mL

V= volumen de matraz aforado usado en mL

F= factor de dilución para segunda dilución



W= peso de muestra enzimática en g

## 9.2 Cálculo de valores medios

5 [0146] Los resultados están establecidos con 3 dígitos significativos. No obstante, para la actividad de la muestra < 10 KNU(S)/g, sólo 2 dígitos significativos están provistos.

[0147] Las siguientes reglas se aplican en el cálculo de valores medios:

- 10 1. Los datos que se desvían más de 2 desviaciones estándares del valor medio no están incluidos en el cálculo.  
2. Determinación única y doble sobre una serie:

15 El valor medio es calculado en base de resultados que figuran dentro del área de actividad de la curva estándar.

3. Determinaciones dobles sobre dos series: todos los valores están incluidos en el valor medio. Los valores atípicos están omitidos.

## 20 10. Exactitud y precisión

[0148] El coeficiente de variación es del 2,9% basado en la validación retrospectiva de resultados de análisis para varios productos finales y el control de nivel.

## 25 Ensayo para actividad $\alpha$ -amilasa

[0149] La actividad  $\alpha$ -amilasa está determinada por un método que utiliza comprimidos Phadebas® como sustrato. Comprimidos de Phadebas (prueba de amilasa de Phadebas®, suministrados por Pharmacia Diagnostic) contienen un polímero de almidón coloreado de azul insoluble reticulado que ha sido mezclado con albúmina de suero bovino y una sustancia de tampón y dispuesto en comprimidos.

30 [0150] Para cada medición única una pastilla es suspendida en un tubo que contiene 5 ml de tampón Britton-Robinson 50 mM (50 mM de ácido acético, 50 mM de ácido fosfórico, 50 mM de ácido bórico, 0.1 mM de  $\text{CaCl}_2$ , pH ajustado al valor de interés con NaOH). La prueba es realizada al baño maría a la temperatura de interés. La  $\alpha$ -amilasa que debe evaluarse es diluida en x ml de 50 mM de tampón Britton-Robinson. 1 ml de esta solución de  $\alpha$ -amilasa se añade a 5 ml de tampón Britton-Robinson 50 mM. El almidón es hidrolizado por la  $\alpha$ -amilasa dando fragmentos azules solubles. La absorbencia de la solución azul resultante, medida espectrofotométricamente a 620 nm, es una función de la actividad  $\alpha$ -amilasa.

40 [0151] Es importante que la absorbencia de 620 nm medida después de 10 o 15 minutos de incubación (duración de la prueba) esté en el rango de 0.2 a 2.0 unidades de absorbencia a 620 nm. En este rango de absorbencia hay linealidad entre actividad y absorbencia (ley de Lambert-Beer). La dilución de la enzima debe en consecuencia ser ajustada para cumplir este criterio. Bajo un grupo específico de condiciones (temp., pH, tiempo de reacción, condiciones de tampón) 1 mg de una  $\alpha$ -amilasa dada hidrolizará una cantidad determinada de sustrato y un color azul será producido. La intensidad del color es medida a 620 nm. La absorbencia medida es directamente proporcional a la actividad específica (actividad/mg de proteína  $\alpha$ -amilasa pura) de la  $\alpha$ -amilasa en cuestión bajo el conjunto de condiciones dadas.

## Ejemplos

### 50 Ejemplo 1

Construcción de variantes de BSG  $\alpha$ -amilasa (SEC ID N°: 3)

[0152] El gen que codifica BSG, amyS, está localizado en el plásmido pPL1117. Este plásmido contiene también el gen que confiere resistencia a la canamicina y un origen de replicación, ambos obtenidos del plásmido pUB110 (Gryczan, T.J. *et al* (1978) J.Bact 134:318-329).

[0153] La secuencia de ADN de la parte madura de amyS está mostrada como la SEC ID N°: 11 y la secuencia de aminoácidos de la proteína madura está mostrada como la SEC ID N°: 3.

60 [0154] La variante TVB145 de BSG, que contiene una deleción de 6 nucleótidos correspondientes a los aminoácidos I181-G182 en la proteína madura, es construida como sigue:

[0155] La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es utilizada para amplificar la parte del gen amyS (del plásmido pPL1117), localizada entre los cebadores de ADN BSG1 (SEC ID N°: 15) y BSGM2 (SEC ID N°: 18). BSG1 es idéntico a una parte del gen amyS mientras que BSGM2 contiene la deleción de 6 pb de nucleótidos. Una reacción PCR estándar se realiza: 94°C durante 5 minutos, 25 ciclos de (94°C durante 45 segundos, 50°C durante 45 segundos, 72°C durante

90 segundos), 72°C durante 7 minutos usando la polimerasa Pwo bajo condiciones recomendadas por el fabricante, Boehringer Mannheim GmbH.

5 [0156] La banda amplificada de aproximadamente 550pb resultante fue usada como un megacebador (Barik, S and Galinski, MS (1991): Biotechniques 10: 489-490) junto con el cebador BSG3 en una segunda PCR con pPL1117 como molde dando como resultado un fragmento de ADN de aproximadamente 1080 pb.

10 [0157] Este fragmento de ADN es digerido con endonucleasas de restricción Acc65I y Sall y el fragmento resultante de aproximadamente 550 pb es ligado en el plásmido pPL1117 digerido con las mismas enzimas y transformadas en la cepa SHA273 de *Bacillus subtilis* con la proteasa y la amilasa borradas (descrita en WO92/11357 y WO95/10603).

15 [0158] Los transformantes resistentes a la canamicina y degradantes del almidón fueron analizados para la presencia de las mutaciones deseadas (digestión de restricción para verificar la introducción de un sitio HindIII en el gen). La secuencia de ADN entre los sitios de restricción Acc65I y Sall fue verificada por la secuenciación del ADN para asegurar la presencia de sólo las mutaciones deseadas.

20 [0159] La variante TVB146 de BSG que contiene la misma delección de 6 nucleótidos como TVB145 y una sustitución adicional de asparagina 193 para una fenilalanina, N193F, fue construida en una vía similar como TVB145 utilizando el cebador BSGM3 (SEC ID N°: 19) en la primera PCR.

25 [0160] La variante TVB161 de BSG, conteniendo la delección de I181-G182. N193F, y L204F, se construye de una manera similar a las dos variantes precedentes con la excepción de que el molde para las reacciones de la PCR sea el plásmido pTVB146 (pPL1117 conteniendo las mutaciones de TVB146 dentro de amyS y el oligonucleótido mutagénico para la primera PCR sea BSGM3.

30 [0161] La variante TVB162 de BSG, conteniendo la delección de I181-G182. N193F, y E210H, es construida en una vía similar como TVB161 a excepción de que el oligonucleótido mutagénico es BSGM4 (SEC ID N°: 20).

35 [0162] La variante TVB163 de BSG, conteniendo la delección de I181-G182. N193F, y E214Q, es construida en una vía similar como TVB161 a excepción de que el oligonucleótido mutagénico es BSGM5 (SEC ID N°: 21).

40 [0163] Las variantes de BSG arriba construidas fueron luego fermentadas y purificadas como se ha descrito anteriormente en la sección "Materiales y Métodos".

## 35 Ejemplo 2

Medición de la estabilidad dependiente del calcio y del pH

40 [0164] Normalmente, el proceso de licuefacción industrial funciona usando pH 6.0-6.2 como pH de licuefacción y una adición de 40 ppm de calcio libre para mejorar la estabilidad a 95°C-105°C. Algunas sustituciones aquí propuestas han sido hechas para mejorar la estabilidad a

1. pH inferior a pH 6.2 y/o

45 2. a niveles de calcio libre inferiores a 40 ppm de calcio libre.

[0165] Dos métodos diferentes han sido usados para medir las mejoras en estabilidad obtenidas por las diferentes sustituciones en la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus*:

50 Método 1. Un ensayo que mide la estabilidad a pH reducido, pH 5.0, en presencia de 5 ppm de calcio libre. 10  $\mu$ g de la variante fueron incubadas bajo las condiciones siguientes: una solución de acetato 0.1 M, pH ajustado a pH 5.0, que contiene 5ppm de calcio y 5% p/p de almidón de maíz común (libre de calcio). La incubación fue hecha al baño maría a 95°C durante 30 minutos.

55 Método 2. Un ensayo que mide la estabilidad en la ausencia de calcio libre y donde el pH es mantenido a pH 6.0. Este ensayo mide la reducción en la sensibilidad de calcio: 10  $\mu$ g de la variante fueron incubados bajo las condiciones siguientes: una solución de acetato 0.1 M, pH ajustado a pH 6.0, que contiene 5% p/p de almidón de maíz común (libre de calcio). La incubación fue hecha al baño maría a 95°C durante 30 minutos.

Determinación de la estabilidad

60 [0166] Todos los ensayos de estabilidad 1, 2 han sido hechos usando la misma configuración. El método fue:

[0167] La enzima fue incubada bajo las condiciones pertinentes (1-4). Las muestras fueron tomadas a 0, 5, 10, 15 y 30 minutos y diluidas 25 veces (misma dilución para todas las muestras tomadas) en tampón de ensayo

65

[0168] (0.1M Tampón de Britton 50mM pH 7.3) y la actividad fue medida usando el ensayo Phadebas (Pharmacia) bajo condiciones estándares pH 7.3, 37°C.

5 [0169] La actividad medida antes de la incubación (0 minutos) fue usada como referencia (100%). El descenso en porcentaje fue calculado como función del período de incubación. La tabla muestra la actividad residual después de 30 minutos de incubación.

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

10 [0170]

Minutos de incubación	Peso amilasa SEC. ID. NO:3 (BSG)	Variante SEC. ID N°: 3 con delección en POS. I181-G182 (TVB145)	Variante SEC. ID N°: 3 con delección en POS. I181-G182 + N193F (TVB146)	Variante SEC. ID N°: 3 con delección en POS. I181-G182 + N193F + E214Q (TVB163)
0	100	100	100	100
5	29	71	83	77
10	9	62	77	70
15	3	50	72	67
30	1	33	62	60

[0171] Método de estabilidad 1. / Mejora de estabilidad a pH bajo. La temperatura descrita en método 1 ha sido reducida de 95°C a 70°C puesto que las amilasas mencionadas para la SEC ID N°: 1 y 2 tiene una termoestabilidad inferior que aquella para la SEC ID N°: 3.

15

Minutos de incubación	Peso amilasa SEC. ID. No: 2	Variante SEC. ID N°: 2 con delección en POS. D183-G184	Amilasa de SEC. ID N°: 1	Variante de SEC. ID N°: 1 con delección en POS. T183-G184
0	100	100	100	100
5	73	92	41	76
10	59	88	19	69
15	48	91	11	62
30	28	92	3	59

Método de estabilidad 2. / sensibilidad a bajo calcio

[0172]

20

Minutos de incubación	Peso de amilasa de SEC ID N°: 3 (BSG)	Variante de SEC ID N°: 3 con delección en POS. I181-G182 (TVB145)	Variante de SEC ID N°: 3 con delección en POS. I181-G182 + N193F (TVB146)	Variante de SEC ID N°: 3 con delección en POS. I181-G182 + N193F + E214Q (TVB163)
0	100	100	100	100
5	60	82	81	82
10	42	76	80	83
15	31	77	81	79
30	15	67	78	79

Determinación de la actividad específica.

25 [0173] La actividad específica fue determinada usando el ensayo Phadebas (Pharmacia) como actividad/mg de enzima. La actividad fue determinada usando el ensayo de  $\alpha$ -amilasa descrito en la sección Materiales y Métodos de la presente.

[0174] La actividad específica de la enzima madre y una mutación única y doble fue determinada para:

BSG: SEC ID N°:3 (enzima original) 20000 NU/mg  
 TVB145: SEC ID N°:3 con la delección en posiciones I181-G182: 34600 NU/mg (mutación única)

TVB146: SEC ID N°:3 con la delección en posiciones I181-G182 + 36600 NU/mg  
 N193F: (mutación doble)  
 TVB163: SEC ID N°:3 con la delección en posiciones I181- 36300 NU/mg  
 G182+N193F+E214Q: (mutación triple)

**Ejemplo 3**

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

5

[0175] Experimentos de licuefacción en instalación experimental fueron realizados en el sistema mini-jet usando una dosificación de 50 NU (S)/g DS a pH 5.5 con 5 ppm de Ca<sup>++</sup> añadido, para comparar el rendimiento de la variante de BSG alfa-amilasa TVB146 formulada (SEC ID N°: 3 con delección en posiciones

10

[0176] I181-G182 + N193F) con aquella de BSG alfa-amilasa original (SEC ID N°: 3). La reacción fue vigilada midiendo el aumento de DE (método de Neocuproina) como función de tiempo.

15

[0177] Mezclas de almidón de maíz fueron preparadas suspendiendo 11,8 kg de Cerestar C\*Pharm GL 03406 (89 % almidón) en agua desionizada y compensando hasta 30 kg. El pH fue ajustado a 5.5 a temperatura ambiente, después de la adición de 0,55 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O.

[0178] Las enzimas siguientes fueron usadas:

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

20

[0179] Una cantidad de enzima correspondiente a 50 NU (SM9)/g DS fue añadida, y la conductividad ajustada a 300mS usando NaCl. Las condiciones estándares fueron las siguientes:

Concentración de sustrato	35 % p/p (inicial) 31,6-31,9 % p/p (final)
Temperatura	105°C, 5 min (licuefacción primaria) 95°C, 90 min (licuefacción secundaria)
pH (inicial)	5.5

25

[0180] Después del sometimiento a presión, el almidón licuado fue recogido y transportado en termo-matracas sellados de la instalación experimental al laboratorio, donde se continuó la licuefacción secundaria a 95 °C.

30

[0181] 10 ml de muestras fueron tomadas a intervalos de 15 minutos de 15-90 minutos. 2 gotas de 1 N HCl fueron añadidas para inactivar la enzima. A partir de estas muestras, 0,3-0,1 g (según el DE previsto) fueron pesadas y diluidas a 100 ml. Azúcares de reducción fueron luego determinados según el método Neocuproina (Determinación de azúcar de reducción con precisión mejorada. Dygert, Li, Florida and Thomas (1965). Anal. Biochem 13: 368) y los valores de DE determinados. El desarrollo de DE como función del tiempo está provisto en la siguiente tabla:

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

35

[0182] Como se puede observar la variante de alfa-amilasa TVB146 dio mejor rendimiento significativamente bajo condiciones de aplicación industrialmente relevantes a niveles bajos de calcio que la BSG alfa-amilasa original.

**Ejemplo 4**

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

40

[0183] La cocción a presión y licuefacción usando una combinación de las variantes de alfa-amilasa, TVB146 y LE174 (proporción 1:1) fueron realizadas en las condiciones siguientes:

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

D.S. 35% usando agua DI

5 Ca<sup>2+</sup> libre 2.7ppm a pH 5.3 (ningún añadido, del almidón sólo) pH 5.3 inicial

Unidades en dosis de AF9 (AF9 está disponible bajo pedido) para cada variante enzimática fue 28 NU/g de almidón db para una dosis total de 56 NU/g de temperatura en licuefacción primaria 105°C

10 Tiempo de mantenimiento en licuefacción primaria 5 minutos

Temperatura en licuefacción secundaria 95°C

15 [0184] A 15 minutos en licuefacción secundaria 1.5 gms de hidrolizado fue añadido a un litro volumétrico pesado que contiene 500cc de agua DI y 1 ml de un HCl normal y el peso exacto añadido fue registrado. Esto fue repetido a intervalos de 15 minutos hasta a 90 minutos con un punto adicional a 127 minutos. Estos fueron diluidos hasta un litro y determinados para equivalencia de dextrosa por medio del método de Neocuproina como se describe por Dygert, Li, Florida and Thomas. Determination of reducing sugar with improved precision (1965). Anal. Biochem 13: 368.

20 [0170] Los resultados fueron los siguientes:

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

Referencias citadas

25 [0186]

Klein, C., *et al.*, Biochemistry 1992, 31, 8740-8746.

Mizuno, H., *et al.*, J. Mol. Biol. (1993) 234, 1282-1283.

Chang, C., *et al.*, J. Mol. Biol. (1993) 229, 235-238.

30 Larson, S.B., J. Mol. Biol. (1994) 235, 1560-1584.

Lawson, C.L., J. Mol. Biol. (1994) 236, 590-600.

Qian, M., *et al.*, J. Mol. Biol. (1993) 231, 785-799.

Brady, R.L., *et al.*, Acta Crystallogr. sect. B, 47, 527-535.

Swift, H.J., *et al.*, Acta Crystallogr. sect. B, 47, 535-544.

35 A. Kadziola, Ph.D. Thesis: "An alpha-amylase from Barley and its Complex with a Substrate Analogue Inhibitor Studied by X-ray Crystallography", Department of Chemistry University of Copenhagen 1993.

MacGregor, E.A., Food Hydrocolloids, 1987, Vol.1, No. 5-6.

B. Diderichsen and L. Christiansen, Cloning of a maltogenic  $\alpha$ -amylase from *Bacillus stearothermophilus*, FEMS Microbiol. letters: 56: pp. 53-60 (1988 ).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gryczan *et al.*, 1978, J. Bacteriol. 134, pp. 318-329.

S.D. Erlich, 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. 74, pp. 1680-1682.

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

55 Listado de secuencias

[0187]

5 <110> Novozymes A/S  
<120> Mutantes de alfa-amilasa  
<130> 5276.215-EP  
10 <160> 21  
<170> PatentIn versión 3.5  
15 <210> 1  
<211> 485  
<212> PRT  
<213> Bacillus sp.  
<400>

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

Asp His Pro Glu Val Ile His Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr  
 210 215 220  
 Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His  
 225 230 235 240  
 Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr  
 245 250 255  
 Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu  
 260 265 270  
 Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val  
 275 280 285  
 Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly  
 290 295 300  
 Gly Tyr Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys  
 305 310 315 320  
 His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro  
 325 330 335  
 Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Gln Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 340 345 350  
 Tyr Ala Leu Val Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr  
 355 360 365  
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser  
 370 375 380  
 Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Phe Ala Tyr Gly Thr  
 385 390 395 400  
 Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
 405 410 415  
 Gly Asn Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp  
 420 425 430  
 Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Asn Lys Ala Gly  
 435 440 445  
 Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile  
 450 455 460  
 Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
 465 470 475 480  
 Val Trp Val Lys Gln  
 485



<210> 2  
<211> 485  
<212> PRT  
5 <213> Bacillus sp.  
<400>

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ser  
 20 25 30  
 Asn Leu Arg Asn Arg Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Ala Trp  
 35 40 45  
 Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
 50 55 60  
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Ser Gln Leu Glu Ser Ala Ile His Ala Leu Lys Asn Asn Gly  
 85 90 95  
 Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp  
 100 105 110  
 Ala Thr Glu Asn Val Leu Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn  
 115 120 125  
 Gln Glu Ile Ser Gly Asp Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp  
 130 135 140  
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
 145 150 155 160  
 His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Phe Gln Asn Arg  
 165 170 175  
 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp  
 180 185 190  
 Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met  
 195 200 205  
 Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Arg Trp Gly Glu Trp Tyr  
 210 215 220  
 Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His

225					230					235					240
Ile	Lys	Tyr	Ser	Phe 245	Thr	Arg	Asp	Trp	Leu 250	Thr	His	Val	Arg	Asn 255	Ala
Thr	Gly	Lys	Glu 260	Met	Phe	Ala	Val	Ala 265	Glu	Phe	Trp	Lys	Asn 270	Asp	Leu
Gly	Ala	Leu 275	Glu	Asn	Tyr	Leu	Asn 280	Lys	Thr	Asn	Trp	Asn 285	His	Ser	Val
Phe	Asp 290	Val	Pro	Leu	His	Tyr 295	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ala 300	Ser	Asn	Ser	Gly
Gly 305	Asn	Tyr	Asp	Met	Ala 310	Lys	Leu	Leu	Asn	Gly 315	Thr	Val	Val	Gln	Lys 320
His	Pro	Met	His	Ala 325	Val	Thr	Phe	Val	Asp 330	Asn	His	Asp	Ser	Gln 335	Pro
Gly	Glu	Ser	Leu 340	Glu	Ser	Phe	Val	Gln 345	Glu	Trp	Phe	Lys	Pro 350	Leu	Ala
Tyr	Ala	Leu 355	Ile	Leu	Thr	Arg	Glu 360	Gln	Gly	Tyr	Pro	Ser 365	Val	Phe	Tyr
Gly	Asp 370	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Pro 375	Thr	His	Ser	Val	Pro 380	Ala	Met	Lys	Ala
Lys 385	Ile	Asp	Pro	Ile	Leu 390	Glu	Ala	Arg	Gln	Asn 395	Phe	Ala	Tyr	Gly	Thr 400
Gln	His	Asp	Tyr	Phe 405	Asp	His	His	Asn	Ile 410	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg 415	Glu
Gly	Asn	Thr	Thr 420	His	Pro	Asn	Ser	Gly 425	Leu	Ala	Thr	Ile	Met 430	Ser	Asp
Gly	Pro	Gly 435	Gly	Glu	Lys	Trp	Met 440	Tyr	Val	Gly	Gln	Asn 445	Lys	Ala	Gly
Gln	Val 450	Trp	His	Asp	Ile	Thr 455	Gly	Asn	Lys	Pro	Gly 460	Thr	Val	Thr	Ile
Asn 465	Ala	Asp	Gly	Trp	Ala 470	Asn	Phe	Ser	Val	Asn 475	Gly	Gly	Ser	Val	Ser 480
Ile	Trp	Val	Lys	Arg 485											

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 514

&lt;212&gt; PRT

5 &lt;213&gt; Bacillus stearothermophilus

&lt;400&gt;

Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu  
 1 5 10 15  
 Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn  
 20 25 30  
 Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys  
 35 40 45  
 Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp  
 50 55 60  
 Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Ala Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr  
 65 70 75 80  
 Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met  
 85 90 95  
 Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly  
 100 105 110  
 Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln  
 115 120 125  
 Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe  
 130 135 140  
 Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His  
 145 150 155 160  
 Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr  
 165 170 175  
 Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu  
 180 185 190  
 Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His  
 195 200 205  
 Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Ser Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn  
 210 215 220  
 Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys  
 225 230 235 240  
 Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Asp Val Arg Ser Gln Thr Gly  
 245 250 255

Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys  
 260 265 270  
 Leu His Asn Tyr Ile Met Lys Thr Asn Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp  
 275 280 285  
 Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Thr  
 290 295 300  
 Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro  
 305 310 315 320  
 Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln  
 325 330 335  
 Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala  
 340 345 350  
 Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp  
 355 360 365  
 Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile  
 370 375 380  
 Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His  
 385 390 395 400  
 Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Val  
 405 410 415  
 Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro  
 420 425 430  
 Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val  
 435 440 445  
 Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser  
 450 455 460  
 Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp  
 465 470 475 480  
 Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Trp Ser Ile Thr Thr  
 485 490 495  
 Arg Pro Trp Thr Asp Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val  
 500 505 510

**Ala Trp**

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

Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro  
 1 5 10 15  
 Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu  
 20 25 30  
 Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly  
 35 40 45  
 Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu  
 50 55 60  
 Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys  
 65 70 75 80  
 Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn  
 85 90 95  
 Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr  
 100 105 110  
 Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val  
 115 120 125  
 Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro  
 130 135 140  
 Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe  
 145 150 155 160  
 Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys  
 165 170 175  
 Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn  
 180 185 190  
 Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val  
 195 200 205  
 Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln  
 210 215 220  
 Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe  
 225 230 235 240  
 Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met  
 245 250 255

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

Val Gln Arg

<210> 5

<211> 480

<212> PRT

5 <213> Bacillus amyloliquefaciens

<400>

Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp  
 20 25 30  
 Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser  
 35 40 45  
 Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu  
 50 55 60  
 Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ser Glu  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln Val Tyr  
 85 90 95  
 Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp  
 100 105 110  
 Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn Arg Asn Gln Glu Thr Ser  
 115 120 125  
 Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp Phe Arg Phe Pro Gly Arg  
 130 135 140  
 Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly  
 145 150 155 160  
 Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg Ile Phe Lys Phe Arg  
 165 170 175  
 Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Ser Glu Asn Gly Asn  
 180 185 190  
 Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr Asp His Pro Asp Val  
 195 200 205  
 Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Ser  
 210 215 220  
 Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe Ser Phe  
 225 230 235 240  
 Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met  
 245 250 255  
 Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn Ala Gly Lys Leu Glu Asn  
 260 265 270  
 Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser Val Phe Asp Val Pro Leu  
 275 280 285



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

<210> 6

<211> 485

<212> PRT

5 <213> Bacillus sp.

<400>

ES 2 536 878 T3

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr  
1 5 10 15  
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Asn Ser Asp Ala Ser  
20 25 30  
Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp  
35 40 45

Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
 50 55 60  
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Ser Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly  
 85 90 95  
 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp  
 100 105 110  
 Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn  
 115 120 125  
 Gln Glu Val Thr Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Arg Phe Asp  
 130 135 140  
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
 145 150 155 160  
 His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Arg Leu Asn Asn Arg  
 165 170 175  
 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly His Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp  
 180 185 190  
 Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met  
 195 200 205  
 Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr  
 210 215 220  
 Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His  
 225 230 235 240  
 Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala  
 245 250 255  
 Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu  
 260 265 270  
 Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Gln Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val  
 275 280 285  
 Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly  
 290 295 300  
 Gly Asn Tyr Asp Met Arg Asn Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg  
 305 310 315 320  
 His Pro Ser His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro

			325						330					335		
Glu	Glu	Ala	Leu 340	Glu	Ser	Phe	Val	Glu 345	Glu	Trp	Phe	Lys	Pro 350	Leu	Ala	
Tyr	Ala	Leu 355	Thr	Leu	Thr	Arg	Glu 360	Gln	Gly	Tyr	Pro	Ser 365	Val	Phe	Tyr	
Gly	Asp 370	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Pro 375	Thr	His	Gly	Val	Pro 380	Ala	Met	Arg	Ser	
Lys 385	Ile	Asp	Pro	Ile	Leu 390	Glu	Ala	Arg	Gln	Lys 395	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Lys 400	
Gln	Asn	Asp	Tyr	Leu 405	Asp	His	His	Asn	Ile 410	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg 415	Glu	
Gly	Asn	Thr	Ala 420	His	Pro	Asn	Ser	Gly 425	Leu	Ala	Thr	Ile	Met 430	Ser	Asp	
Gly	Ala	Gly 435	Gly	Ser	Lys	Trp	Met 440	Phe	Val	Gly	Arg	Asn 445	Lys	Ala	Gly	
Gln	Val 450	Trp	Ser	Asp	Ile	Thr 455	Gly	Asn	Arg	Thr	Gly 460	Thr	Val	Thr	Ile	
Asn 465	Ala	Asp	Gly	Trp	Gly 470	Asn	Phe	Ser	Val	Asn 475	Gly	Gly	Ser	Val	Ser 480	
Ile	Trp	Val	Asn	Lys 485												

<210> 7  
 <211> 485  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus sp.  
 <400>

5

ES 2 536 878 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Trp Val Lys Gln  
 485

<210> 8

<211> 485

<212> PRT

5 <213> Bacillus sp.

<400>

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

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

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

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

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

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

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

Ala Thr Glu Asn Val Leu Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn  
 115 120 125  
 Gln Glu Ile Ser Gly Asp Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp  
 130 135 140  
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
 145 150 155 160  
 His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Phe Gln Asn Arg  
 165 170 175  
 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp  
 180 185 190  
 Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met  
 195 200 205  
 Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Arg Trp Gly Glu Trp Tyr  
 210 215 220  
 Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His  
 225 230 235  
 Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Ala  
 245 250 255  
 Thr Gly Lys Glu Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu  
 260 265 270  
 Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val  
 275 280 285  
 Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly  
 290 295 300  
 Gly Asn Tyr Asp Met Ala Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Gln Lys  
 305 310 315 320  
 His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro  
 325 330 335  
 Gly Glu Ser Leu Glu Ser Phe Val Gln Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 340 345 350  
 Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr  
 355 360 365  
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Ser Val Pro Ala Met Lys Ala  
 370 375 380



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

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

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

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

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

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

Ile Trp Val Lys Arg  
485

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

5

```

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

gaatcctttg ttcaacaatg gtttaaacca cttgcatatg cattggttct gacaagggaa 1080  
 caaggttatc cttccgtatt ttatgggat tactacgta tccaacca tgggtttccg 1140  
 gctatgaaat ctaaaataga ccctcttctg caggcacgtc aaacttttgc ctatggtacg 1200  
 cagcatgatt actttgatca tcatgatatt atcggttgga caagagaggg aatagctcc 1260  
 catccaaatt caggccttgc caccattatg tcagatggtc caggtggtaa caaatggatg 1320  
 tatgtgggga aaaataaagc gggacaagtt tggagagata ttaccggaaa taggacaggc 1380  
 accgtcacia ttaatgcaga cggatggggt aatttctctg ttaatggagg gtccgtttcg 1440  
 gtttgggtga agcaa 1455

<210> 10  
 <211> 1455  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus sp.  
 <400>

5

catcataatg ggacaaatgg gacgatgat caatactttg aatggcactt gcctaatgat 60  
 gggaaatcact ggaatagatt aagagatgat gctagtaatc taagaaatag aggtataacc 120  
 gctatttgga ttccgcctgc ctggaaaggg acttcgcaa atgatgtggg gtatggagcc 180  
 tatgatcttt atgatttagg ggaatttaac caaaagggga cggttcgtac taagtatggg 240  
 acacgtagtc aattggagtc tgccatccat gctttaaaga ataatggcgt tcaagtttat 300  
 ggggatgtag tgatgaacca taaaggagga gctgatgcta cagaaaacgt tcttgctgtc 360  
 gaggtgaatc caaataaccg gaatcaagaa atatctgggg actacacaat tgaggcttgg 420  
 actaagtttg attttccagg gaggggtaac acatactcag actttaaatg gcgttggat 480  
 catttcgatg gtgtagattg ggatcaatca cgacaattcc aaaatcgtat ctacaaattc 540  
 cgaggtgatg gtaaggcatg ggattgggaa gtagattcgg aaaatggaaa ttatgattat 600  
 ttaatgtatg cagatgtaga tatggatcat ccggaggtag taaatgagct tagaagatgg 660  
 ggagaatggt atacaataac attaaatctt gatggattta ggatcgtatg ggtgaagcat 720  
 attaaatata gctttacacg tgattggttg acccatgtaa gaaacgcaac gggaaaagaa 780  
 atgrrtgctg ttgctgaatt ttggaaaaat gatttaggtg ccttggagaa ctatttaaat 840  
 aaaacaaact ggaatcattc tgtctttgat gtcccccttc attataatct ttataacgcg 900  
 tcaaatagtg gaggcaacta tgacatggca aaacttctta atggaacggt tgttcaaaaag 960  
 catccaatgc atgccgtaac ttttgggat aatcacgatt ctcaacctgg ggaatcatta 1020  
 gaatcatttg tacaagaatg gtttaagcca cttgcttatg cgcttatttt aacaagagaa 1080  
 caaggctatc cctctgtctt ctatggtgac tactatggaa ttccaacaca tagtgtccca 1140  
 gcaatgaaag ccaagattga tccaatctta gaggcgcgtc aaaatcttgc atatggaaca 1200  
 caacatgatt attttgacca tcataatata atcggatgga cacgtgaagg aataccacg 1260  
 catcccaatt caggacttgc gactatcatg tcggatgggc cagggggaga gaaatggatg 1320  
 tacgtagggc aaaataaagc aggtcaagtt tggcatgaca taactggaaa taaaccagga 1380

acagttacga tcaatgcaga tggatgggct aatttttcag taaatggagg atctgtttcc 1440

atctgggtga aacga 1455

<210> 11

<211> 1548

<212> ADN

5 <213> Bacillus sp.

<400>

gccgcaccgt ttaacggcac catgatgcag tattttgaat ggtacttgcc ggatgatggc 60

acgttatgga ccaaagtggc caatgaagcc aacaacttat ccagccttgg catcaccgct 120

ctttggctgc cgcccgctta caaaggaaca agccgcagcg acgtagggta cggagtatac 180

gacttgatg acctcggcga attcaatcaa aaagggaccg tccgcacaaa atacggaaca 240

aaagctcaat atcttcaagc cattcaagcc gccacgccc ctggaatgca agtgtacgcc 300

gatgtcgtgt tcgaccataa aggcggcgtt gacggcacgg aatgggtgga cgccgtcgaa 360

gtcaatccgt ccgaccgcaa ccaagaaatc tcgggcacct atcaaatcca agcatggacg 420

aaatttgatt ttcccgggcg gggcaacacc tactccagct ttaagtggcg ctggtaccat 480

tttgacggcg ttgattggga cgaagccga aaattgagcc gcatttaca atccgcggc 540

atcggcaaag cgtgggattg ggaagtagac acggaaaacg gaaactatga ctacttaatg 600

tatgccgacc ttgatatgga tcatcccga gtcgtgacc agctgaaaaa ctgggggaaa 660

tggtatgtca acacaacgaa cattgatggg ttccggcttg atgccgtcaa gcatattaag 720

ttcagttttt ttccctgattg gttgtcgtat gtgcttctc agactggcaa gccgctat 780

accgtcgggg aatattggag ctatgacatc aacaagttgc acaattacat tacgaaaaca 840

gacggaacga tgtctttgtt tgatgccccg ttacacaaca aattttatac cgtttccaaa 900

tcagggggcg catttgatat gcgcacgta atgaccaata ctctcatgaa agatcaaccg 960

acattggccg tcaccttcgt tgataatcat gacaccgaac ccggccaagc gctgcagtca 1020

tgggtcgacc catggttcaa accgttggct tacgcctta ttctaactcg gcaggaagga 1080

taccctgctg tcttttatgg tgactattat ggcatccac aatataacat tccttcgctg 1140

aaaagcaaaa tcgatccgct cctcatcgcg cgcagggatt atgcttacgg aacgcaacat 1200

gattatcttg atcactccga catcatcggg tggacaaggg aagggggcac tgaaaaacca 1260

ggatccggac tggccgcact gatcaccgat gggccgggag gaagcaaatg gatgtacgtt 1320

ggcaacaac acgctggaaa agtgttctat gaccttaccg gcaaccggag tgacaccgtc 1380

accatcaaca gtgatggatg gggggaattc aaagtcaatg gcggttcggt ttcggtttgg 1440

gttctagaa aaacgaccgt ttctaccatc gctcggccga tcacaacccg accgtggact 1500

ggtgaattcg tccggttgac cgaaccacgg ttggtggcat ggccttga 1548

10 <210> 12

<211> 2084

<212> ADN

<213> Bacillus sp.

<400>

gccccgcaca	tacgaaaaga	ctggctgaaa	acattgagcc	tttgatgact	gatgatttgg	60
ctgaagaagt	ggatcgattg	tttgagaaaa	gaagaagacc	ataaaaatac	cttgtctgtc	120
atcagacagg	gtatttttta	tgctgtccag	actgtccgct	gtgtaaaaat	aaggaataaa	180
ggggggttgt	tattatttta	ctgatatgta	aaatataatt	tgtataagaa	aatgagaggg	240
agaggaaaca	tgattcaaaa	acgaaagcgg	acagtttcgt	tcagacttgt	gcttatgtgc	300
acgctgttat	ttgtcagttt	gccgattaca	aaaacatcag	ccgtaaattg	cacgctgatg	360
cagtattttg	aatggtatac	gccgaacgac	ggccagcatt	ggaaacgatt	gcagaatgat	420
gcggaacatt	tatcggatat	cggaatcact	gccgtctgga	ttcctcccgc	atacaaagga	480
ttgagccaat	ccgataacgg	atacggacct	tatgatttgt	atgatttagg	agaattccag	540
caaaaagggg	cggtcagaac	gaaatacggc	acaaaatcag	agcttcaaga	tgcgatcggc	600
tcactgcatt	cccggaacgt	ccaagtatac	ggagatgtgg	ttttgaatca	taaggctggt	660
gctgatgcaa	cagaagatgt	aactgccgtc	gaagtcaatc	cggccaatag	aatcaggaa	720
acttcggagg	aatatcaaat	caaagcgtgg	acggattttc	gttttccggg	ccgtggaaac	780
acgtacagtg	attttaaatg	gcattggtat	catttcgacg	gagcggactg	ggatgaatcc	840
cggaagatca	gccgcattct	taagtttcgt	ggggaaggaa	aagcgtggga	ttgggaagta	900
tcaagtgaaa	acggcaacta	tgactattta	atgtatgctg	atgttgacta	cgaccacct	960
gatgtcgtgg	cagagacaaa	aaaatggggg	atctggtatg	cgaatgaact	gtcattagac	1020
ggcttccgta	ttgatgccgc	caaacatatt	aaattttcat	ttctgcgtga	ttgggttcag	1080
gcggtcagac	aggcgacggg	aaaagaaatg	tttacggttg	cggagtattg	gcagaataat	1140
gccgggaaac	tcgaaaacta	cttgaataaa	acaagcttta	atcaatccgt	gtttgatgtt	1200
ccgcttcatt	tcaatttaca	ggcggcttcc	tcacaaggag	gcggatatga	tatgaggcgt	1260
ttgctggacg	gtaccgttgt	gtccaggcat	ccggaaaagg	cggttacatt	tgttgaaaat	1320
catgacacac	agccgggaca	gtcattggaa	tcgacagtcc	aaacttggtt	taaaccgctt	1380
gcatacgcct	ttattttgac	aagagaatcc	ggttatcctc	aggtgttcta	tggggatatg	1440
tacgggacaa	aagggacatc	gccaaaggaa	attcctcac	tgaaagataa	tatagagccg	1500
attttaaaag	cgcgtaagga	gtacgcatac	gggccccagc	acgattatat	tgaccacccg	1560
gatgtgatcg	gatggacgag	ggaaggtgac	agctccgccg	ccaaatcagg	tttgccgct	1620
ttaatcacgg	acggacccgg	cggatcaaag	cggatgtatg	ccggcctgaa	aatgcccggc	1680
gagacatggt	atgacataac	gggcaaccgt	tcagatactg	taaaaatcgg	atctgacggc	1740
tggggagagt	ttcatgtaa	cgatgggtcc	gtctccattt	atgttcagaa	ataaggtaat	1800
aaaaaaacac	ctccaagctg	agtgcgggta	tcagcttggg	ggtgcgttta	tttttcagc	1860
cgtatgacaa	ggtcggcatc	aggtgtgaca	aatacggtat	gctggctgtc	ataggtgaca	1920
aatcccgggtt	ttgcgccgct	tggttttttc	acatgtctga	tttttgata	atcaacaggc	1980
acggagccgg	aatctttcgc	cttggaaaaa	taagcggcga	tcgtagctgc	ttccaatatg	2040
gattgttcat	cgggatcgct	gcttttaatc	acaacgtggg	atcc		2084

<211> 1455  
 <212> ADN  
 <213> Bacillus sp.

5 <400>

cafcataatg	gaacaaatgg	tactatgatg	caatatttcg	aatgggtattt	gccaatgac	60
gggaatcatt	ggaacaggtt	gagggatgac	gcagctaact	taaagagtaa	agggataaca	120
gctgtatgga	tcccacctgc	atggaagggg	acttcccaga	atgatgtagg	ttatggagcc	180
tatgatttat	atgatcttgg	agagtttaac	cagaagggga	cggttcgtac	aaaatatgga	240
acacgcaacc	agctacaggc	tgcggtgacc	tctttaaaaa	ataacggcat	tcaggtatat	300
ggtgatgtcg	tcatgaatca	taaaggtgga	gcagatggta	cggaaattgt	aaatgicggta	360
gaagtgaatc	ggagcaaccg	aaaccaggaa	acctcaggag	agtatgcaat	agaagcgtgg	420
acaaagtttg	atcttcctgg	aagaggaaat	aaccattcca	gctttaagtg	gcgctgggtat	480
cattttgatg	ggacagattg	ggatcagtca	cgccagcttc	aaaacaaaa	atataaattc	540
aggggaacag	gcaaggcctg	ggactgggaa	gtcgatacag	agaatggcaa	ctatgactat	600
cttatgtatg	cagacgtgga	tatggatcac	ccagaagtaa	tacatgaact	tagaaactgg	660
ggagtgtggt	atacgaatac	actgaacctt	gatggattta	gaatagatgc	agtgaacat	720
ataaaatata	gctttacgag	agattggctt	acacatgtgc	gtaacaccac	aggtaaacca	780
atgtttgcag	tggctgagtt	ttggaaaaat	gaccttggtg	caattgaaaa	ctatttgaat	840
aaaacaagtt	ggaatcactc	ggtgtttgat	gttcctctcc	actataattt	gtacaatgca	900
tctaatagcg	gtggttatta	tgatatgaga	aatattttaa	atggttctgt	ggtgcaaaaa	960
catccaacac	atgccgttac	ttttgttgat	aacctatgatt	ctcagcccgg	ggaagcattg	1020
gaatcctttg	ttcaacaatg	gtttaacca	cttgcatatg	cattggttct	gacaagggaa	1080
caaggttatc	cttccgtatt	ttatggggat	tactacggta	tcccaacca	tgggtttccg	1140
gctatgaaat	ctaaaataga	ccctcttctg	caggcacgtc	aaacttttgc	ctatgggtacg	1200
cagcatgatt	actttgatca	tcatgatatt	atcggttgga	caagagaggg	aaatagctcc	1260
catccaaatt	caggccttgc	caccattatg	tcagatggtc	caggtggtaa	caaatggatg	1320
tatgtgggga	aaaataaagc	gggacaagtt	tggagagata	ttaccggaaa	taggacaggc	1380
accgtcacia	ttaatgcaga	cggatggggt	aatttctctg	ttaatggagg	gtccgtttcg	1440
gtttgggtga	agcaa					1455

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

10

catcataatg ggacaaatgg gacgatgatg caatactttg aatggcactt gcctaatgat 60  
 gggaatcact ggaatagatt aagagatgat gctagtaatc taagaaatag aggtataacc 120  
 gctatattgga ttccgcctgc ctggaaaggg acttcgcaaa atgatgtggg gtatggagcc 180  
 tatgatcttt atgatitagg ggaatttaat caaaagggga cggttcgtac taagtatggg 240  
 acacgtagtc aattggagtc tgccatccat gctttaaaga ataatggcgt tcaagtttat 300  
 ggggatgtag tgatgaacca taaaggagga gctgatgcta cagaaaacgt tcttgctgtc 360  
 gaggtgaatc caaataaccg gaatcaagaa atatctgggg actacacaat tgaggcttgg 420  
 actaagtttg attttccagg gaggggtaat acatactcag actttaaatg gcgttggtat 480  
 catttcgatg gtgtagattg ggatcaatca cgacaattcc aaaatcgtat ctacaaattc 540  
 cgaggtgatg gtaaggcatg ggattgggaa gtagattcgg aaaatggaaa ttatgattat 600  
 ttaatgtatg cagatgtaga tatggatcat ccggaggtag taaatgagct tagaagatgg 660  
 ggagaatggg atacaatac attaaatctt gatggattta ggatcgatgc ggtgaagcat 720  
 attaaatata gctttacacg tgattgggtg acccatgtaa gaaacgcaac gggaaaagaa 780  
 atgtttgctg ttgctgaatt ttggaaaaat gatttaggtg ccttggagaa ctatttaaat 840  
 aaaacaaact ggaatcattc tgtctttgat gtcccccttc attataatct ttataacgcg 900  
 tcaaatagtg gaggcaacta tgacatggca aaacttctta atggaacggt tgttcaaaag 960  
 catccaatgc atgccgtaac ttttgtggat aatcacgatt ctcaacctgg ggaatcatta 1020  
 gaatcatttg tacaagaatg gttaagcca cttgcttatg cgcttatttt aacaagagaa 1080  
 caaggctatc cctctgtctt ctatgggtgac tactatggaa ttccaacaca tagtgtccca 1140  
 gcaatgaaag ccaagattga tccaatctta gaggcgcgtc aaaattttgc atatggaaca 1200  
 caacatgatt attttgacca tcataatata atcggatgga cacgtgaagg aataccacg 1260  
 catcccaatt caggacttgc gactatcatg tcggatgggc cagggggaga gaaatggatg 1320  
 tacgtagggc aaaataaagc aggtcaagtt tggcatgaca taactggaaa taaaccagga 1380  
 acagttacga tcaatgcaga tggatgggct aatttttcag taaatggagg atctgtttcc 1440  
 atttgggtga aacga 1455

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

10 <220>  
 <223> Cebador BSG1

<400> 15  
 ccatgatgca gtatttgaa tgg 23

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

20 <220>  
 <223> Cebador BSG3

<400> 16  
 gtcaccataa aagacgcacg gg 22

5 <210> 17  
 <211> 70  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Cebador BSGM1

<400>  
**gtcatagttt ccgaattccg tgtctacttc ccaatcccaa tccaagctt tgccgcgaa 60**  
**tttgtaaattg 70**

15 <210> 18  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Cebador BSGM2

<400> 18  
 ctactccca atccaagct ttgccgcca atttgaaat g 41

25 <210> 19  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Cebador BSGM3

<400> 19  
 ggatgatcca tgcaaagtc ggcatac 27

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

40 <220>  
 <223> Cebador BSGM4

<400> 20  
 45 ctcggtcacc acgtgggat gatcc 25

<210> 21  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 50 <213> Artificial

<220>  
 <223> Cebador BSGM5

55 <400> 21  
 ccagttttc agctgggtca cgac 24

## REIVINDICACIONES

1. Variante de una  $\alpha$ -amilasa original tipo Termamyl, donde la  $\alpha$ -amilasa original tipo Termamyl es seleccionada entre:
- 5 (i) SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2, SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 4, SEC ID NO: 5, SEC ID N°: 6, SEC ID N°: 7 o SEC ID N°: 8; o
- (ii) una  $\alpha$ -amilasa original tipo Termamyl que tiene al menos el 80% de homología con una de las secuencias de (i);
- 10 y donde la variante tiene actividad  $\alpha$ -amilasa y comprende las mutaciones H183\* y G184\* y una sustitución seleccionada de N195A, R, D, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, P, S, T, W, Y, V (con respecto a SEC ID N°: 6) o en posiciones correspondientes en otra  $\alpha$ -amilasa original tipo Termamyl, y
- 15 donde la variante muestra termoestabilidad aumentada a pH ácido y/o a concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  por debajo de 40 ppm, en comparación con una variante correspondiente que comprende las mutaciones H183\* y G184\* sin la sustitución en N195.
2. Constructo de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una variante de  $\alpha$ -amilasa según la reivindicación 1.
3. Vector de expresión recombinante que porta un constructo de ADN según la reivindicación 2.
- 20 4. Célula que es transformada con un constructo de ADN según la reivindicación 2 o un vector según la reivindicación 3.
5. Célula según la reivindicación 4, que es un microorganismo.
- 25 6. Aditivo de detergente que comprende una variante de  $\alpha$ -amilasa según la reivindicación 1, opcionalmente en forma de granulado no pulverulento, líquido estabilizado o enzima protegida.
7. Composición de detergente que comprende una variante de  $\alpha$ -amilasa según la reivindicación 1.
- 30 8. Composición de detergente para lavar la vajilla a mano o a máquina que comprende una variante de  $\alpha$ -amilasa según la reivindicación 1.
9. Composición de detergente para lavar la ropa que comprende una variante de  $\alpha$ -amilasa según la reivindicación 1.
- 35 10. Composición que comprende:
- (i) una mezcla de  $\alpha$ -amilasas de *B. licheniformis* que tiene la secuencia mostrada en SEC ID N°: 4 con una o más variantes según la reivindicación 1 derivadas a partir de (como la  $\alpha$ -amilasa original tipo Termamyl) la  $\alpha$ -amilasa de
- 40 *B. stearothermophilus* que tiene la secuencia mostrada en SEC ID N°: 3; o
- (ii) una mezcla de  $\alpha$ -amilasas de *B. stearothermophilus* que tiene la secuencia mostrada en SEC ID N°: 4 con una o más variantes según la reivindicación 1 derivadas a partir de una o más  $\alpha$ -amilasas originales tipo Termamyl; o
- (iii) una mezcla de una o más variantes según la reivindicación 1 derivadas a partir de (como la  $\alpha$ -amilasa original tipo Termamyl) la  $\alpha$ -amilasa de *B. stearothermophilus* que tiene la secuencia mostrada en SEC ID N°: 3 con una o
- 45 más variantes según la reivindicación 1 derivadas a partir de una o más otras  $\alpha$ -amilasas originales tipo Termamyl.
11. Uso de una variante de  $\alpha$ -amilasa según la reivindicación 1 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 para lavar la ropa y/o la vajilla.
- 50 12. Uso de una variante de  $\alpha$ -amilasa según la reivindicación 1 o una composición según la reivindicación 9 para descolado textil.
13. Uso de una variante de  $\alpha$ -amilasa según la reivindicación 1 o una composición según la reivindicación 10 para licuefacción del almidón.
- 55



```

1  HHNGTNGTMM QYFEWHLPLND GNHWNRLRDD ASNLRNRGIT AIWIPPAWKG 50
  ..NGTNGTMM QYFEWYLPND GNHWNRLRSD ASNLKDKGIS AVWIPPAWKG
  HHNGTNGTMM QYFEWYLPND GNHWNRLRDD AANLKSKGIT AVWIPPAWKG
  ...VNGTLM QYFEWYTPND GQHWKRLQND AEHLSDIGIT AVWIPPAYKG
  ..ANLNGTLM QYFEWYMPND GQHWRRLLQND SAYLAEHGIT AVWIPPAYKG
  .AAPFNGTMM QYFEWYLPDD GTLWTKVANE ANNLSLGLIT ALWLPPAYKG

51
  1  TSQNDVGYGA YDLYDLGFEF QKGTVRTKYG TRSOLESAIH ALKNNGVQVY 100
  2  ASQNDVGYGA YDLYDLGFEF QKGTIRTKYG TRNQLQAAVN ALKSNGLIQVY
  3  TSQNDVGYGA YDLYDLGFEF QKGTVRTKYG TRNQLQAAVT SLKNNGIQVY
  4  LSQSDNGYGP YDLYDLGFEF QKGTVRTKYG TKSELODAIG SLHSRNVQVY
  5  TSQADVGYGA YDLYDLGFEF QKGTVRTKYG TKGELQSAIK SLHSRDLNVY
  6  TSRSQDVGYG YDLYDLGFEF QKGTVRTKYG TRAQYLLQAIQ AAHAAGMQVY

101
  1  GDVVMNHKGG ADATENVLAV EVNPNRNQOE ISGDYTIEMW TKFDFPGRGN 150
  2  GDVVMNHKGG ADATEMVRV EVNPNRNQOE VSGEYTIEMW TKFDFPGRGN
  3  GDVVMNHKGG ADGTEIVNAV EVNRSNRNQE TSGEYAIEMW TKFDFPGRGN
  4  GDVVLNHKAG ADATEDVTAV EVNPNRNQOE TSEEYQIKAW TDFRFPGRGN
  5  GDVVINHKGG ADATEDVTAV EVDPADRNRV ISGEHLIKAW THFHFPRGRS
  6  ADVVFDHKGG ADGTEWVDV EVNPSDRNQE ISGTYYIQIQAW TKFDFPGRGN

151
  1  TYSDFKWRWY HFDGVDWDQS RQFONRIYKF RGDGKAWDWE VDSENGNYDY 200
  2  THSNFKWRWY HFDGVDWDQS RKLNNRIYKF RGDGKAWDWE VDTENGNYYDY
  3  NHSSEKWRWY HFDGTDWDQS RQLQNKIYKF RGTGKAWDWE VDTENGNYYDY
  4  TYSDFKWHWY HFDGADWDES RKL.SRIYKF RGEKAWDWE VSSENGNYDY
  5  TYSDFKWHWY HFDGTDWDES RKL.NRIYKF .QKAWDWE VSNENGNYYDY
  6  TYSSEKWRWY HFDGVDWDES RKL.SRIYKF RGIGKAWDWE VDTENGNYYDY

```

Fig. 1

```

5      201      250
1      LMVADVMDH PEVVELRRW GEWYNTLNL DGFRIDAVKH IKYSFTRDWL
2      LMVADIDMDH PEVVELRNW GVWYNTLGL DGFRIDAVKH IKYSFTRDWS
3      LMVADVMDH PEVHELNRW GVWYNTLNL DGFRIDAVKH IKYSFTRDWL
4      LMVADVDDH PDVVAETKKW GIWYANELSL DGFRIDAAKH IKFSFLRDWV
10     LMVADIDYDH PDVAAEIKRW GTWYANELQL DGFRLDVAVKH IKFSFLRDWV
      LMVADLDMDH PEVVELKNW GKWYVNTNI DGFRLDVAVKH IKFSFFPDWL

      251      300
1      THVRNATGKE MEVAEEFKN DLGALENYLN KTNWNHVSFD VPLHYNLYNA
15     2      IHVRSATGKN MEVAEEFKN DLGALENYLN KTNWNHVSFD VPLHYNFYNA
      3      THVRNTGKP MEVAEEFKN DLGALENYLN KTSWNHSAFD VPLHYNLYNA
      4      QAVRQATGKE MFTVAEYWQN NAGLENYLN KTSFNQSVFD VPLHFNLQAA
      5      NHVREKTGKE MFTVAEYWQN DLGALENYLN KTFNHSVFD VPLHYQFHAA
      6      SYVRSQTGKP LFTVGEYWSY DINKLHNYIT KTDGTMSLFD APLHNKFYTA

20     301      350
1      SNSGGNYDMA KLLNGTVVQK HPMHAVTFVD NHDSQPGESL ESFVQEWFKP
2      SKSGGYDMR QIFNGTVVQR HPMHAVTFVD NHDSQPEEAL ESFVEEWFKP
3      SNSGGYDMR NILNGSVVQK HPTHAVTFVD NHDSQPGEAL ESFVQQWFKP
25     4      SSQGGYDMR RLLDGTVVSR HPEKAVTFVE NHDTPGQSL ESTVQITWFKP
      5      STQGGYDMR KLLNGTVVSK HPLKSVTFVD NHDTPGQSL ESTVQITWFKP
      6      SKSGGAFDMR TLMNTLMKD QPTLAVTFVD NHDTEPGQAL QSWVDPWFKP

30     351      400
1      LAYALLITRE QGYPSVFGD YGIPFHS.. .VPAMKAKID PILEARQNFA
2      LAYALLITRE QGYPSVFGD YGIPFHS.. .VPAMSKID PILEARQKYA
3      LAYALLITRE QGYPSVFGD YGIPFHS.. .VPAMSKID PLLQARQTFE
4      LAYAFILTR SGYPQVFGD MYGKGTSPK EIPSLKDNIE PILKARKEYA
5      LAYAFILTR SGYPQVFGD MYGKGTSPK EIPALKHKIE PILKARKQYA
35     6      LAYAFILTRQ EGYPCVFGD YGIPQYN.. .IPSLKSKID PLLIARRDYA

```

Fig. 1

Figura 1 (continuación)

```

401      YGTQHDYFDH HNIIGWTREG NTTHPNSGLA TIMSDGPGGE KWMYVVGQNK 450
      YGRQN.....
      YGTQHDYFDH HDIIGWTREG NSSHPNSGLA TIMSDGPGGN KWMYVVGKNA
      YGPQHDYIDH PDVIGWTREG DSSAAKSGLA ALITDGP GGS KRM YAGL KNA
      YGAQHDYFDH HDIVGWTREG DSSVANSGLA ALITDGP GGA KRM YVGR QNA
      YGTQHDYLDH SDIIGWTREG GTEKPGSGLA ALITDGP GGS KWM YVVG KQHA

10      451
      1  GQVWH DITGN KPGT V TINAD GWANFSVNGG SVS I WVKR... 500
      2  .....
      3  GQVWR DITGN RTGT V TINAD GWGNFSVNGG SVS V WVKQ...
      4  GETWY DITGN RSDT VKIGSD GWGEFHVNDG SVS I YVQ...
      5  GETWH DITGN RSEP V VINSE GWGEFHVNGG SVS I YVQR...
      6  GKVFY DLTGN RSDT V TINSD GWGEFKVNGG SVS V WVP RKT TVSTI ARPIT

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

25

```

Figura 1 (continuación)

Fig. 1