

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 630**

51 Int. Cl.:

C12N 9/28

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2012** **E 12153083 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015** **EP 2620496**

54 Título: **Alfa-amilasa**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
25.09.2015

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

PARENICOVA, LUCIE

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 546 630 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

Alfa-amilasa

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a una nueva alfa-amilasa, a un proceso para su preparación y al uso de la amilasa.

La invención se refiere a una secuencia de polinucleótido recientemente identificada que comprende un gen que codifica la nueva enzima alfa-amilasa. La invención proporciona la secuencia de codificación de longitud completa del nuevo gen así como la secuencia de aminoácidos de la proteína funcional de longitud completa del gen. La invención también se refiere a métodos de uso de estas proteínas en procesos industriales, por ejemplo en la industria alimentaria, tal como la industria de panadería. También se incluyen en la invención células transformadas con un polinucleótido de acuerdo con la invención adecuadas para producir estas proteínas y células. La invención se refiere a un método de fabricación del polinucleótido de acuerdo con la invención. La invención se refiere además a un método para fabricar el polipéptido de acuerdo con la invención.

Antecedentes de la invención

Los estudios sobre la rancidez del pan han indicado que la fracción de almidón del pan recristaliza durante el almacenamiento, causando de ese modo un aumento de la firmeza de la miga, que se puede medir como un aumento en la dureza de las rebanadas de pan.

La presente invención se refiere a una alfa-amilasa. Las alfa-amilasas se han usado en la industria durante mucho tiempo.

Las alfa-amilasas se han proporcionado tradicionalmente mediante la inclusión de harina de trigo o cebada malteada y proporcionan varias ventajas al panadero. La alfa-amilasa se usa para proporcionar una producción de gas y una retención de gas satisfactorias durante la fermentación de la masa y proporcionar un color de corteza satisfactorio. Esto significa que si esta enzima no se usa en cantidad suficiente, el volumen, la textura, y la apariencia del pan se ven básicamente perjudicados. La alfa-amilasa se encuentra en la naturaleza en la propia cosecha de trigo, medida rutinariamente mediante el Número de Caída de Hagberg (método 107 de ICC), y se han dado pasos para minimizar tales variaciones mediante la adición de alfa-amilasa en el molino y a través del uso de ingredientes de especialidades en panadería ya que la enzima tiene una importancia crítica.

Más recientemente, la alfa-amilasa de los cereales se ha reemplazado en gran medida por enzimas de fuentes microbianas, incluyendo fuentes fúngicas y bacterianas. Mediante el uso de la biotecnología en la selección de cepas, fermentación y procesamiento, se pueden preparar enzimas a partir de tales fuentes microbianas y esto presenta ventajas sobre la harina de malta debido a que la enzima tiene una calidad más controlada, es relativamente pura y más rentable en uso. Sin embargo, las propiedades de las alfa-amilasas, y sus efectos tecnológicos, muestran importantes diferencias. Además de tener influencia en la producción de gas, la retención de gas y el color de la corteza, la alfa amilasa puede tener relación con la vida en anaquel del producto horneado.

El almidón de la harina de trigo contiene dos fracciones principales, amilasa y amilopectina, y estas se organizan en forma de gránulos de almidón. Una proporción de estos gránulos de variedades de trigo de molienda dura se "dañan", separándose los gránulos como consecuencia de la energía de la molienda. En el proceso de horneado, los gránulos de almidón se gelatinizan; este proceso implica un hinchamiento del gránulo por la captación de agua y una pérdida de la naturaleza cristalina del gránulo; en particular, se conoce que las amilopectinas del gránulo nativo existen en forma de cristallitos y estas moléculas se disocian y pierden cristalinidad durante la gelatinización. Una vez se ha horneado el pan, la amilopectina recristaliza lentamente con el paso de los días y es esta recristalización, o retrogradación de almidón la que se considera la causa principal de la rancidez del pan.

Estas formas variables del almidón y su interacción con alfa-amilasa dictan el papel que tiene la enzima con respecto a la tecnología de la panadería. La alfa-amilasa de fuentes fúngicas, lo más habitualmente provenientes de especies de *Aspergillus*, actúa principalmente sobre el almidón dañado durante la mezcla de la masa y a través de la fermentación/prueba. La baja estabilidad térmica de la enzima significa que la enzima se inactiva durante el horneado y críticamente antes de que la gelatinización haya tenido lugar, de modo que existe poca o ninguna descomposición del almidón a partir de la fracción sin dañar. En consecuencia, la amilasa fúngica es útil en la provisión de azúcares para fermentación y color, pero prácticamente no tiene ningún valor en la prolongación de la vida en anaquel. Por otra parte, la alfa amilasa bacteriana, lo más habitualmente de *Bacillus amyloliquefaciens*, tiene una mayor estabilidad a la temperatura y actividad durante el horneado del pan y mientras el almidón experimenta la gelatinización. La amilasa bacteriana conduce de ese modo a una modificación en mayor extensión del almidón y, a su vez, de las calidades del pan horneado; en particular, la corteza del pan horneado puede ser sensiblemente más blanda a lo largo de la vida en anaquel y puede permitir que se aumente la vida en anaquel. Sin embargo, aunque la alfa-amilasa bacteriana puede ser útil con respecto a la prolongación de la vida en anaquel, es difícil de usar en sentido práctico ya que pequeñas sobredosis conducen a una estructura de miga inaceptable de poros grandes y

abiertos, mientras que la textura se puede volver demasiado blanda y "gomosa".

El inventor ha identificado una alfa amilasa de una fuente bacteriana particular que tiene una caída de termoeestabilidad intermedia entre las alfa amilasas fúngicas y bacterianas habituales. La termoeestabilidad de esta enzima es mayor que la de la alfa amilasa fúngica, permitiendo de este modo una mayor actividad en la amilopectina durante y después de la gelatinización, pero no actúa de forma tan prolongada en el proceso de horneado como las amilasas bacterianas habituales y no sobredigiere el almidón.

El documento de Patente US 4.598.048 describe la preparación de una enzima amilasa maltogénica. El documento de Patente US 4.604.355 describe una enzima amilasa maltogénica, la preparación y el uso de la misma. El documento de Patente US RE38.507 describe un proceso y un agente de antirancidez. El producto que se describe en el documento de Patente US RE38.507 se usa en la industria con el nombre comercial Novamyl®.

Se propuso encontrar un organismo capaz de producir una alfa-amilasa mejorada. En consecuencia, el inventor ha identificado la cepa NCIMB14276 de *Alicyclobacillus pohliae* que ha descubierto en el Antártico. Esta es una nueva cepa, y no se ha usado anteriormente como fuente para una alfa-amilasa que tiene propiedades mejoradas.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a polipéptidos. La invención proporciona una nueva alfa-amilasa que se puede usar para retardar la rancidez de productos horneados tales como pan y pasteles. La invención proporciona además nuevos polinucleótidos que codifican la nueva enzima alfa-amilasa.

Por lo tanto, la invención se refiere a:

un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de alfa-amilasa que comprende:

(a) una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 34 a 719 de SEC ID N°: 2; o

(b) una secuencia de polinucleótido como se expone en los nucleótidos 100 a 2157 de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3;

o

(c) una secuencia de polinucleótido como se expone en SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.

La invención se refiere además a:

un polipéptido de alfa-amilasa que comprende:

(a) una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 34 a 719 de SEC ID N°: 2; o

(b) una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido como se expone en los nucleótidos 100 a 2157 de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.

En otro aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende la secuencia de polinucleótido de acuerdo con la invención. La invención también se refiere a una célula hospedadora recombinante que comprende el polinucleótido de acuerdo con la invención. La invención se refiere un método de fabricar el polinucleótido de acuerdo con la invención. La invención se refiere además a un método para fabricar el polipéptido de acuerdo con la invención. La invención se refiere al uso de dicho polipéptido en la fabricación de alimentos. La invención también se refiere a una composición de enzima. La invención también se refiere a un método para preparar una masa y a una masa que comprende el polipéptido de acuerdo con la invención o la composición de enzima de acuerdo con la invención.

La invención también se refiere un método para preparar un producto horneado que comprende la etapa de hornear la masa de acuerdo con la invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 expone el mapa de plásmido de pGBB09.

La Figura 2 expone el mapa de plásmido de pGBB09DSM-AM1.

La Figura 3 expone SEC ID N°: 1.

La Figura 4 expone SEC ID N°: 2.

La Figura 5 expone SEC ID N°: 3.

Breve descripción del listado de secuencias

SEC ID N°: 1 expone la secuencia de polinucleótido de NCIMB14276 de *Alicyclobacillus pohliae* que codifica la secuencia de señal de tipo silvestre (expuesta en los nucleótidos 1 a 99), la alfa-amilasa de acuerdo con la invención (expuesta en los nucleótidos 100 a 2157), y un codón de terminación en el extremo 3' terminal (expuesto en los nucleótidos 2157 a 2160).

SEC ID N°: 2 expone la secuencia de aminoácidos de la secuencia de señal de tipo silvestre de NCIMB14276 de *Alicyclobacillus pohliae* (expuesta en los aminoácidos 1 a 33) y la alfa-amilasa de acuerdo con la invención (expuesta en los aminoácidos 34 a 719). También se denomina en el presente documento proteína DSM-AM.

SEC ID N°: 3 expone una secuencia de polinucleótido optimizada con codón de NCIMB14276 de *Alicyclobacillus pohliae* que codifica la secuencia de señal de tipo silvestre (expuesta en los nucleótidos 1 a 99), la alfa-amilasa de acuerdo con la invención (expuesta en los nucleótidos 100 a 2157), y un codón de terminación en el extremo 3' terminal (expuesto en los nucleótidos 2157 a 2160).

Descripción detallada de la invención

En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, las palabras "comprende" e "incluye" y variaciones tales como "comprender", "que comprende", "incluir" y "incluye" se han de interpretar como abiertas e inclusive. Es decir, se pretende que estas palabras expresen la posible inclusión de otros elementos o números enteros no indicados específicamente, cuando el contexto lo permita.

En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, la expresión "nucleótidos 100 a 2157" significa los nucleótidos 100 hasta e incluyendo el 2157. En la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones anexas, la expresión "aminoácidos 34 a 719" significa los aminoácidos 34 hasta e incluyendo el 719.

Las expresiones "polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 34 a 719 de SEC ID N°: 2", "polipéptido maduro expuesto en SEC ID N°: 2" y "DSM-AM madura" se usan de forma intercambiable en el presente documento

Las expresiones "polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 34 a 719 de SEC ID N°: 2", "polipéptido maduro de acuerdo con la invención", "enzima madura de acuerdo con la invención", "enzima amilolítica de acuerdo con la invención", "enzima alfa-amilasa de acuerdo con la invención", "alfa-amilasa de acuerdo con la invención" y "polipéptido de acuerdo con la invención" se usan de forma intercambiable en el presente documento.

Las expresiones "de acuerdo con la invención" y "de la invención" se usan de forma intercambiable en el presente documento.

Las expresiones "gen DSM-AM", "gen de alfa-amilasa de acuerdo con la invención", "gen AM" y "polinucleótido de acuerdo con SEC ID N°: 1" se usan de forma intercambiable en el presente documento. La expresión "polinucleótido de acuerdo con la invención" incluye SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 3.

En el contexto de la presente invención, "polipéptido maduro" se define en el presente documento como un polipéptido que tiene actividad de alfa-amilasa que está en su forma final después de la traducción y cualquier modificación posterior a la traducción, incluyendo procesamiento N-terminal, truncación C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. El proceso de maduración puede depender del vector de expresión particular usado, el hospedador de expresión y el proceso de producción.

Para confirmar la secuencia de polinucleótido del gen DSM-AM del NCIMB14276 de *Alicyclobacillus pohliae*, se secuenció el genoma completo de NCIMB14276 de *A. pohliae*. Los resultados del mismo confirmaron que el polinucleótido, que codifica la proteína DSM-AM, es como se desvela en SEC ID N°: 1. A partir de esto se confirmó la secuencia de 719 aminoácidos de la proteína DSM-AM como se expone en SEC ID N°: 2. Los primeros 33 aminoácidos, empezando desde el extremo N-terminal de la proteína DSM-AM, pertenecen a la secuencia de señal.

Polinucleótidos

La invención se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de alfa amilasa que comprende:

- (a) una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 34 a 719 de SEC ID N°: 2; o
- (b) una secuencia de polinucleótido como se expone en los nucleótidos 100 a 2157 de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3; o
- (c) una secuencia de polinucleótido como se expone en SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.

En un aspecto, un polinucleótido de la invención es un polinucleótido aislado que comprende:

- (a) una secuencia de polinucleótido como se expone en los nucleótidos 100 a 2157 de la secuencia de polinucleótido de SEC ID N°: 1 o 3 (inclusive los nucleótidos 100 y 2157, para evitar la duda); o
- (b) una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 34 a 719 de SEC ID N°: 2 (inclusive los aminoácidos 34 y 719, para evitar la duda).

En un aspecto tal polinucleótido aislado se puede obtener sintéticamente, por ejemplo mediante síntesis en fase sólida o mediante otros métodos conocidos por los expertos en la materia.

Las secuencias de acuerdo con SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 3 incluyen los nucleótidos que codifican el polipéptido maduro de acuerdo con la invención y la secuencia de señal de tipo silvestre. SEC ID N°: 2 incluye el polipéptido

maduro de acuerdo con la invención y la secuencia de señal de tipo silvestre.

Un "polinucleótido aislado" o "ácido nucleico aislado" es un ADN o ARN que no es inmediatamente contiguo con las dos secuencias codificantes con las que es inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y otra en el extremo 3') en el genoma de origen natural del organismo del que se obtiene. De ese modo, en una realización, un polinucleótido aislado incluye algunas o todas las secuencias no codificantes 5' (por ejemplo, promotor) que son inmediatamente contiguas a la secuencia codificante. Por lo tanto, la expresión incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora a un vector, en un plásmido o virus autónomamente replicante, o al ADN genómico de un procariota o eucariota, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc o un fragmento de ADN genómico producido por PCR o tratamiento de endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias. También incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica un polipéptido adicional que está básicamente exento de material celular, material viral, o medio de cultivo (cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante), o precursores químicos u otros compuestos químicos (cuando se sintetiza químicamente). Además, un "fragmento de polinucleótido aislado" es un fragmento de polinucleótido que no es de origen natural como fragmento y no se encontraría en estado natural.

La secuencia codificante de SEC ID N°: 1 o 3 se puede modificar mediante sustituciones de nucleótidos. El polinucleótido de SEC ID N°: 1 o 3 se puede modificar además o alternativamente mediante una o más inserciones y/o supresiones y/o mediante una prolongación en cualquiera o ambos extremos. El polinucleótido modificado codifica un polipéptido que tiene actividad de alfa amilasa.

En una realización del polinucleótido de acuerdo con la invención, el polinucleótido se produce mediante NCIMB14276 de *Alicyclobacillus pohliae*. Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" o la expresión "molécula de ácido nucleico" y similares se pretende que incluyan moléculas de ADN (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, ARNm) y análogos de ADN o ARN generados usando análogos de nucleótidos. La molécula de polinucleótido puede ser monocatenaria o bicatenaria, pero preferentemente es ADN bicatenario. El polinucleótido se puede sintetizar de modo que incluya nucleótidos sintéticos o modificados. Se conocen en la técnica numerosos tipos diferentes de modificaciones de polinucleótidos. Estos incluyen cadenas principales de metilfosfonato y fosforotioato, adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Tales oligonucleótidos se pueden usar, por ejemplo, para preparar polinucleótidos que tienen capacidades de emparejamiento de bases alteradas o aumento de resistencia a nucleasas.

Para los fines de la presente invención, se ha de entender que los polinucleótidos que se describen en el presente documento se pueden modificar mediante cualquier método disponible en la técnica. Tales modificaciones se pueden llevar a cabo, por ejemplo, para aumentar el grado en el que se puede expresar un polinucleótido de la invención en una célula hospedadora adecuada.

Un polinucleótido de la invención, tal como un polinucleótido de ADN, se puede producir de forma recombinante, sintética, o mediante cualquier medio disponible para los expertos en la materia. También se puede clonar mediante técnicas convencionales. Un polinucleótido de la invención se proporciona por lo general en forma aislada y/o purificada.

Los polinucleótidos se pueden producir usando medios recombinantes, por ejemplo usando técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de polimerasa). Esto implica preparar una pareja de cebadores (por ejemplo, de aproximadamente 15-30 nucleótidos) en una región del polinucleótido que se desea amplificar, poner en contacto los cebadores con ARNm o ARNc obtenido de una célula adecuada, llevar a cabo una reacción en cadena de polimerasa en condiciones que produzcan la amplificación de la región deseada, aislar y recuperar el ADN amplificado. Los cebadores se pueden diseñar para contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados de modo que el ADN amplificado se pueda clonar convenientemente en un vector de clonación adecuado.

Tales técnicas se pueden usar para obtener la totalidad o parte del polinucleótido de SEC ID N°: 1 o 3 que se describe en el presente documento o las variantes del mismo.

Los polinucleótidos que no tienen un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de SEC ID N°: 1 o 3 se pueden obtener mediante diversas formas. Por ejemplo, los polinucleótidos se pueden obtener mediante una técnica de mutagénesis apropiada, tal como mutagénesis dirigida al sitio de SEC ID N°: 1 o 3. Esto puede ser útil cuando, por ejemplo, se requieren cambios silentes de codón en las secuencias con el fin de optimizar las preferencias de codón para una célula hospedadora particular en la que se van a expresar las secuencias de polinucleótido. Pueden ser deseables otros cambios de secuencia con el fin de introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, o alterar la propiedad o la función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

Para aumentar la probabilidad de que la enzima introducida se exprese en forma activa en una célula de la invención, la correspondiente secuencia de nucleótidos codificante se puede adaptar para optimizar su uso del codón al de la célula hospedadora seleccionada, por ejemplo SEC ID N°: 3. Se conocen en la técnica varios métodos para la optimización de codón. Un método preferente para optimizar el uso del codón de la secuencia de

nucleótidos al de la célula hospedadora seleccionada es una tecnología de optimización de parejas de codones que se desvela en los documentos de Patente WO2006/077258 y/o WO2008/000632. El documento de Patente WO2008/000632 aborda la optimización de parejas de codones. La optimización de parejas de codones es un método en el que las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido se modifican con respecto a su uso del codón, en particular las parejas de codones que se usan, para obtener una mejora de la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifican el polipéptido y/o una mejora de la producción del polipéptido codificado. Las parejas de codón se definen como un conjunto de dos tripletes (codones) sucesivos en una secuencia codificante.

Como medida sencilla para la expresión génica y la eficacia de traducción, en el presente documento se usa el Índice de Adaptación de Codón (CAI), como se describe en Xuhua Xia, *Evolutionary Bioinformatics* 2007, 3: 53-58. El índice usa un conjunto de referencia de genes altamente expresados de una especie para evaluar las cualidades relativas de cada codón, y se calcula una puntuación para el gen a partir de la frecuencia de uso de todos los codones en ese gen. El índice evalúa el grado en el que ha sido eficaz la selección en el moldeado del patrón de uso de codón. A este respecto es útil para predecir el nivel de expresión de un gen, para evaluar la adaptación de los genes virales a sus hospedadores, y para realizar comparaciones de uso de codón en diferentes organismos. El índice también puede proporcionar una indicación aproximada de la probabilidad de éxito de la expresión de genes heterólogos. En los genes optimizados por pareja de codones de acuerdo con la invención, el CAI es 0,6 o más, 0,7 o más, 0,8 o más, 0,85 o más, 0,87 o más, 0,90 o más, 0,95 o más, o aproximadamente 1,0.

La invención proporciona además polinucleótidos bicatenarios que comprenden un polinucleótido de la invención y su complemento.

Los polinucleótidos, las sondas y los cebadores de la invención pueden portar una marca reveladora. Las marcas adecuadas incluyen radioisótopos tales como ³²P o ³⁵S, marcas enzimáticas, u otras marcas proteicas tales como biotina. Tales marcas se pueden añadir a los polinucleótidos, sondas o cebadores de la invención y se pueden detectar usando técnicas conocidas por sí mismas.

Polipéptidos

La invención proporciona un polipéptido (aislado) que tiene actividad de degradación de almidón. La invención se refiere además a un método para fabricar el polipéptido de acuerdo con la invención.

Los términos "péptido" y "oligopéptido" se consideran sinónimos (como se reconoce habitualmente) y cada término se puede usar de forma intercambiable cuando el contexto requiera indicar una cadena de al menos dos aminoácidos acoplados mediante enlaces peptídicos. La palabra "polipéptido" (o proteína) se usa en el presente documento para cadenas que contienen más de siete restos de aminoácido. Todas las fórmulas o secuencias de oligopéptidos y polipéptidos en el presente documento se escriben de izquierda a derecha y en la dirección del extremo amino terminal al extremo carboxi terminal. El código de tres letras de los aminoácidos que se usa en el presente documento se conoce habitualmente la técnica y se puede encontrar en Sambrook, *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001).

La invención se refiere a un polipéptido de alfa-amilasa que comprende:

- (a) una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 34 a 719 de SEC ID N°: 2; o
- (b) una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido como se expone en los nucleótidos 100 a 2157 de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.

En una realización, la invención se refiere a un polipéptido aislado que comprende:

- (a) una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 34 a 719 de SEC ID N°: 2; o
- (b) una secuencia de aminoácidos codificada por el polinucleótido como se expone en los nucleótidos 100 a 2157 de SEC ID N°: 1 o 3; o
- (c) la secuencia de aminoácidos de acuerdo con (b), en la que el polinucleótido se produce mediante NCIMB14276 de *Alicyclobacillus pohliae*.

En general, es preferente la secuencia de aminoácidos de origen natural que se muestra en los aminoácidos 34 a 719 de SEC ID N°: 2.

Como conocen los expertos en la materia, es posible que el extremo N-terminal y/o C-terminal de SEC ID N°: 2 o del polipéptido maduro de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC ID N°: 2 (como se expone en los aminoácidos 34 a 719) puedan ser heterogéneos, debido a variaciones en el procesamiento durante la maduración. En particular, se podrían producir tales variaciones de procesamiento tras la sobreexpresión del polipéptido. Además, la actividad de exoproteasa podría dar lugar a heterogeneidad. El grado en el que se produce la heterogeneidad depende también del hospedador y de los protocolos de fermentación que se usan. Tales artefactos de procesamiento del extremo C-terminal podrían conducir a polipéptidos más cortos o a polipéptidos más largos de lo que se indica en SEC ID N°: 2 o del polipéptido maduro de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC ID N°: 2. Como resultado de tales variaciones de procesamiento, el extremo N-terminal también podría ser heterogéneo. Las variantes de procesamiento en el extremo N-terminal se podrían deber a la escisión alternativa de

la secuencia de señal por parte de peptidasas de señal.

Un aspecto adicional proporciona un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de acuerdo con SEC ID N°: 2 o la proteína madura de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEC ID N°: 2 que contiene restos adicionales y comienza en la posición 1, o 2, o 3 etc. Alternativamente, podría carecer de ciertos residuos y en consecuencia comenzar en la posición 2, o 3, o 4 etc. Además, pueden estar presentes restos adicionales en el extremo C-terminal, por ejemplo en la posición 720, 721 etc. Alternativamente, el extremo C-terminal podría carecer de ciertos residuos y en consecuencia finalizar en la posición 718, o 717 etc.

De ese modo se puede modificar la secuencia del polipéptido de SEC ID N°: 2. Se pueden realizar sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 sustituciones. El polipéptido modificado conserva la actividad como alfa amilasa.

Preferentemente, tal polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que, cuando se alinea con la secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 2, comprende al menos uno de Asp en la posición 184, Ala en la posición 297, Thr en la posición 368 y Asn en la posición 489, definiéndose dichas posiciones con respecto a SEC ID N°: 2. Preferentemente, la alfa-amilasa comprende al menos Ala en la posición 297 y definiéndose la totalidad de dichas posiciones con respecto a SEC ID N°: 2.

El polipéptido puede comprender al menos dos de Asp en la posición 184, Ala en la posición 297, Thr en la posición 368 y Asn en la posición 489, definiéndose dichas posiciones con respecto a SEC ID N°: 2. Preferentemente tal polipéptido comprende al menos: Asp en la posición 184 y Ala en la posición 297; al menos Ala en la posición 297 y Thr en la posición 368; o al menos Ala en la posición 297 y Asn en la posición 489, definiéndose la totalidad de dichas posiciones con respecto a SEC ID N°: 2.

El polipéptido puede comprender al menos tres de Asp en la posición 184, Ala en la posición 297, Thr en la posición 368 y Asn en la posición 489, definiéndose dichas posiciones con respecto a SEC ID N°: 2. Preferentemente, tal polipéptido comprende al menos: Ala en la posición 297, Thr en la posición 368 y Asn en la posición 489; Asp en la posición 184, Ala en la posición 297 y Thr en la posición 368; o Asp en la posición 184, Ala en la posición 297 y Asn en la posición 489, definiéndose la totalidad de dichas posiciones con respecto a SEC ID N°: 2.

El polipéptido puede comprender Asp en la posición 184, Ala en la posición 297, Thr en la posición 368 y Asn en la posición 489, definiéndose la totalidad de dichas posiciones con respecto a SEC ID N°: 2.

Los uno o más aminoácidos del polipéptido se pueden sustituir con el fin de mejorar la expresión en una célula hospedadora. Además se pueden sustituir uno o más aminoácidos de la proteína para cambiar la actividad específica o la estabilidad térmica de las enzimas.

Las sustituciones conservativas de aminoácidos se refieren a la intercambiabilidad de restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales hidroxil-alifáticas es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina.

Los grupos de sustitución conservativa de aminoácidos preferentes son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, y asparagina-glutamina. Las variantes sustitucionales de la secuencia de aminoácidos que se desvela en el presente documento son aquellas en las que se ha retirado al menos un resto de las secuencias desveladas y en su lugar se ha insertado un resto diferente. Preferentemente, el cambio de aminoácidos es conservativo. Las sustituciones conservativas preferentes para cada uno de los aminoácidos de origen natural son como siguen a continuación: Ala por ser; Arg por lys; Asn por gln o his; Asp por glu; Cys por ser o ala; Gln por asn; Glu por asp; Gly por pro; His por asn o gln; Ile por leu o val; Leu por ile o val; Lys por arg; gln o glu; Met por leu o ile; Phe por met, leu o tyr; Ser por thr; Thr por ser; Trp por tyr; Tyr por trp o phe; y, Val por ile o leu.

Los polipéptidos de la invención pueden estar en forma básicamente aislada. Se ha de entender que el polipéptido se puede mezclar con vehículos o diluyentes que no interfieran con el fin deseado del polipéptido y aún se pueda considerar básicamente aislado. El polipéptido de la invención también puede estar en forma básicamente purificada, en cuyo caso comprenderá generalmente el polipéptido en una preparación en la que más de un 50 %, por ejemplo, más de un 80 %, 90 %, 95 % o 99 % en peso del polipéptido en la preparación es un polipéptido de la invención.

Por ejemplo, los polipéptidos y las proteínas producidos de forma recombinante producidos en células hospedadoras se consideran aislados para el fin de la invención ya que son polipéptidos nativos recombinantes que se han purificado básicamente mediante cualquier técnica adecuada tal como, por ejemplo, el método de purificación de etapa individual que se desvela en Smith y Johnson, Gene 67:31-40 (1988).

El polipéptido la invención se puede modificar químicamente, por ejemplo modificar de forma posterior la traducción. Por ejemplo, se puede glicosilar o comprender restos de aminoácido modificados. También se puede modificar mediante la adición de residuos de Histidina o una marca T7 para ayudar a su purificación o mediante la adición de una secuencia de señal para estimular su secreción de una célula.

Para la secreción de la proteína traducida al lumen del retículo endoplasmático, al espacio periplasmático o al entorno extracelular, se puede fusionar una secuencia de señal de secreción apropiada al polinucleótido de la invención. Las señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

El polipéptido de acuerdo con la invención se puede producir en una forma modificada, tal como una proteína de fusión, y puede incluir no solo señales de secreción sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. De ese modo, por ejemplo, se puede añadir una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, al extremo N-terminal del polipéptido para mejorar la estabilidad y persistencia en la célula hospedadora, durante la purificación o durante la manipulación y almacenamiento posteriores. Además, se pueden añadir restos del péptido al polipéptido para facilitar la purificación.

Los polipéptidos de la presente invención incluyen productos purificados de forma natural, productos de procedimientos sintéticos químicos, y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un hospedador procariota o eucariota, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, plantas superiores, insectos y mamíferos. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glicosilados o pueden estar no glicosilados. Además, los polipéptidos de la invención también pueden incluir en algunos casos un resto de metionina modificado inicial como consecuencia de procesos mediados por el hospedador.

Identidad de secuencia

El término "homología" o las expresiones "porcentaje de identidad", "porcentaje de homología" e "identidad porcentual" se usan de forma intercambiable en el presente documento. Para los fines de la presente invención, aquí se define que con el fin de determinar el porcentaje de homología de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de polinucleótido (también denominadas en el presente documento secuencias de ácido nucleico), las secuencias se alinean con fines de comparación óptima. Con el fin de optimizar la alineación entre las dos secuencias se pueden introducir huecos en cualquiera de las secuencias que se comparan. Tal alineación se puede llevar a cabo en la longitud completa de las secuencias que se van a comparar. Alternativamente, la alineación se puede llevar a cabo en una longitud más corta, por ejemplo en aproximadamente 20, aproximadamente 50, aproximadamente 100 o más ácidos nucleicos del término "polipéptido" de la invención.

Para la secreción de la proteína traducida al lumen del retículo endoplasmático, al espacio periplasmático o al entorno extracelular, se puede fusionar una secuencia de señal de secreción apropiada al polinucleótido de la invención. Las señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

El polipéptido de acuerdo con la invención se puede producir en una forma modificada, tal como una proteína de fusión, y puede incluir no solo señales de secreción sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. De ese modo, por ejemplo, se puede añadir una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, al extremo N-terminal del polipéptido para mejorar la estabilidad y persistencia en la célula hospedadora, durante la purificación o durante la manipulación y almacenamiento posteriores. Además, se pueden añadir restos del péptido al polipéptido para facilitar la purificación.

Los polipéptidos de la presente invención incluyen productos purificados de forma natural, productos de procedimientos sintéticos químicos, y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un hospedador procariota o eucariota, incluyendo, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, plantas superiores, insectos y mamíferos. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden estar glicosilados o pueden estar no glicosilados. Además, los polipéptidos de la invención también pueden incluir en algunos casos un resto de metionina modificado inicial como consecuencia de procesos mediados por el hospedador.

Identidad de secuencia

El término "homología" o las expresiones "porcentaje de identidad", "porcentaje de homología" e "identidad porcentual" se usan de forma intercambiable en el presente documento. Para los fines de la presente invención, aquí se define que con el fin de determinar el porcentaje de homología de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de polinucleótido (también denominadas en el presente documento secuencias de ácido nucleico), las secuencias se alinean con fines de comparación óptima. Con el fin de optimizar la alineación entre las dos secuencias se pueden introducir huecos en cualquiera de las secuencias que se comparan. Tal alineación se puede llevar a cabo en la longitud completa de las secuencias que se van a comparar. Alternativamente, la alineación se puede llevar a cabo en una longitud más corta, por ejemplo en aproximadamente 20, aproximadamente 50, aproximadamente 100 o más ácidos nucleicos o aminoácidos. El porcentaje de homología o el porcentaje identidad

es el porcentaje de coincidencias idénticas entre las dos secuencias en la región alineada informada.

Se puede conseguir una comparación de secuencias y la determinación del porcentaje identidad entre dos secuencias usando un algoritmo matemático. Los expertos en la materia tendrán en cuenta el hecho de que están disponibles varios programas de ordenador diferentes para alinear dos secuencias y determinar la homología entre las dos secuencias (Kruskal, J. B. (1983) An overview of sequence comparison en D. Sankoff y J. B. Kruskal, (ed.), Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, pp. 1-44 Addison Wesley). El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se puede determinar usando el algoritmo de Needleman y Wunsch para la alineación de dos secuencias (Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). El algoritmo puede alinear tanto las secuencias de aminoácidos como las secuencias de polinucleótido. El algoritmo de Needleman-Wunsch se ha integrado en el programa de ordenador NEEDLE. Para los fines de la presente invención se usó el programa NEEDLE del paquete EMBOSS (versión 2.8.0 o superior, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden, I. y Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) pp. 276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Para la secuencia de proteínas se usó EBLSUM62 para la matriz de sustitución. Para la secuencia de nucleótidos, se usó EDNAFULL. Los parámetros opcionales usados son una penalización de hueco abierto de 10 y una penalización de prolongación de hueco de 0,5. Los expertos en la materia entenderán que estos diferentes parámetros producirán resultados ligeramente diferentes pero que el porcentaje de identidad global de dos secuencias no se altera significativamente cuando se usan diferentes algoritmos.

Después de la alineación mediante el programa NEEDLE como se ha descrito anteriormente se calcula el porcentaje de identidad entre una secuencia de búsqueda y una secuencia de la invención como sigue a continuación: número de posiciones correspondientes en la alineación que muestra un aminoácido idéntico o un nucleótido idéntico en ambas secuencias dividido por la longitud total de la alineación después de restar el número total de huecos en la alineación. El porcentaje de identidad como se define en el presente documento se puede obtener a partir de NEEDLE usando la opción NOBRIEF y se identifica en los resultados del programa como "identidad más prolongada".

Las secuencias de polinucleótido y proteína de la presente invención se pueden usar además como "secuencia de búsqueda" para llevar a cabo una búsqueda en bases de datos públicas, por ejemplo, para identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden llevar a cabo usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas de nucleótidos BLAST se pueden llevar a cabo con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas al polinucleótido de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST se pueden llevar a cabo con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener las secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17): 3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase la página principal de Centro Nacional para Información de Biotecnología en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

Vectores

Los polinucleótidos de la invención se pueden incorporar a un vector, incluyendo vectores de clonación y expresión. Un vector puede ser un vector replicable recombinante. El vector se puede usar para replicar un polinucleótido de la invención en una célula hospedadora compatible. El vector se puede someter de forma conveniente a procedimientos de ADN recombinante.

La invención también se refiere a métodos de crecimiento, transformación o transfección de tales vectores en una célula hospedadora adecuada, por ejemplo en condiciones en las que se produce la expresión de un polipéptido de la invención. La invención proporciona un método de preparación de polipéptidos de la invención por introducción de un polinucleótido de la invención en un vector, preferentemente un vector de expresión, introducción del vector en una célula hospedadora compatible, y crecimiento de la célula hospedadora en condiciones que provocan la replicación del vector. El vector se puede recuperar de la célula hospedadora.

Un vector de acuerdo con la invención puede ser un vector autónomamente replicante, es decir un vector que existe como entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra en el genoma de la célula hospedadora y se replica junto con el cromosoma o cromosomas en el que se ha integrado.

Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a bucle de ADN bicatenario circular en el que se pueden insertar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que se pueden insertar segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en la célula hospedadora en la que se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episomales). Otros vectores (por ejemplo, vectores de integración bacterianos

sin un origen adecuado de replicación o vectores de mamífero no episomales) se integran en el genoma de una célula hospedadora hasta la introducción en la célula hospedadora, y de ese modo se replican junto con el genoma hospedador.

- 5 Además, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los que se unen operativamente. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión". Las expresiones "vector de expresión", "constructo de expresión" y "vector de expresión recombinante" se usan de forma intercambiable en el presente documento. En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. Los términos "plásmido" y "vector" se pueden usar de forma intercambiable en el presente documento ya que el plásmido es la forma de vector usada de forma más habitual. Sin embargo, se pretende que la invención incluya otras formas de vectores de expresión, tales como cósmidos, vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados de replicación deficiente) y vectores de fago que sirven para funciones equivalentes.
- 10 Los vectores de acuerdo con la invención se pueden usar *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN o usar para transfectar o transformar una célula hospedadora, por ejemplo una célula bacteriana, y usar para la producción de una alfa-amilasa que está codificada por un polinucleótido de la invención.
- 15 Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden un polinucleótido de la invención en una forma adecuada para la expresión del polinucleótido en una célula hospedadora, lo que significa que el vector de expresión recombinante incluye una o más secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células hospedadoras que se usan para la expresión, que están unidas operativamente a la secuencia del polinucleótido que se va a expresar.
- 20 En un vector de expresión recombinante, "unido operativamente" pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés está unida a la secuencia o secuencias reguladoras de una forma que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula hospedadora cuando el vector se introduce en la célula hospedadora), es decir la expresión "unido operativamente" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar de la forma destinada. Una secuencia reguladora tal como un promotor, potenciador u otra señal de regulación de expresión "unida operativamente" a una secuencia codificante se posiciona de un modo tal que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control o las secuencias se disponen de modo que funcionen de acuerdo con su uso destinado, por ejemplo la transcripción se inicia en un promotor y transcurre a través de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido.
- 25 La expresión "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señal de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).
- 30 La expresión secuencias reguladoras incluye las secuencias que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en numerosos tipos de células hospedadoras y las que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en ciertas células hospedadoras (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejidos).
- 35 Un vector o constructo de expresión para una célula hospedadora dada puede comprender de ese modo los siguientes elementos unidos operativamente entre sí en orden consecutivo del extremo 5' al extremo 3' con respecto a la hebra codificante de la secuencia que codifica el polipéptido de la presente invención: (1) una secuencia promotora capaz de dirigir la transcripción de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en la célula hospedadora dada; (2) un sitio de unión a ribosoma para facilitar la traducción del ARN transcrito, (3) opcionalmente, una secuencia de señal capaz de dirigir la secreción del polipéptido desde la célula hospedadora dada al medio de cultivo; (4) una secuencia de polinucleótido de acuerdo con la invención; y, también preferentemente, (5) una región de terminación de la transcripción (terminador) capaz de terminar la transcripción corriente abajo de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido.
- 40 Corriente abajo de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención puede ser una región sin traducir 3' que contiene uno o más sitios de terminación de la transcripción (por ejemplo un terminador, también denominado en el presente documento codón de terminación). El origen del terminador es menos crítico. El terminador puede ser, por ejemplo, nativo para la secuencia de ADN que codifica el polipéptido. Sin embargo, se usa preferentemente un terminador bacteriano en células hospedadoras bacterianas y se usa un terminador fúngico filamentoso en células hospedadoras fúngicas filamentosas. Más preferentemente, el terminador es endógeno a la célula hospedadora (en la que se va a expresar la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido). En la región transcrita, puede estar presente un sitio de unión a ribosoma para la traducción. La parte codificante de los transcritos maduros expresados por los constructos incluirá un codón de terminación que es habitualmente AUG (o ATG), pero también hay codones de inicio alternativos tales como, por ejemplo, GUG (o GTG) y UUG (o TTG), que se usan en procariotas. También se posiciona apropiadamente un codón de terminación de la traducción o de terminación en el final del polipéptido que se va a traducir.
- 55
- 60
- 65

También se puede conseguir la mejora de la expresión del polinucleótido de la invención mediante la selección de regiones reguladoras homólogas y heterólogas, por ejemplo promotor, líder de secreción y/o regiones terminadoras, que pueden servir para aumentar la expresión y, si se desea, los niveles de secreción de la proteína de interés desde el hospedador de expresión y/o para proporcionar el control inducible de la expresión de un polipéptido de la invención.

Los expertos en la materia entenderán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la selección de la célula hospedadora que se va a transformar, y el nivel de expresión de proteína deseado. Los vectores de expresión de la invención se pueden introducir en células hospedadoras para producir de ese modo proteínas y péptidos, codificados por polinucleótidos como se describen en el presente documento (por ejemplo, el polipéptido que tiene actividad de alfa amilasa de acuerdo con la invención o una variante del mismo como se describe en el presente documento).

Los vectores de expresión recombinantes de la invención, también denominados en el presente documento "vector de la invención" se pueden diseñar para la expresión de los polipéptidos de acuerdo con la invención en células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, los polipéptidos de acuerdo con la invención se pueden producir en células bacterianas tales como *E. coli* y *Bacillus*, células de insecto (usando vectores de expresión de baculovirus), células fúngicas, células de levadura o células de mamífero. Las células hospedadoras adecuadas se discuten en el presente documento y además en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Alternativamente, el vector de expresión recombinante se puede transcribir y traducir *in vitro*, por ejemplo usando secuencias reguladoras de promotor T7 y polimerasa T7.

Para la mayoría de las bacterias, hongos filamentosos y levaduras, el vector o constructo de expresión se integra preferentemente en el genoma de la célula hospedadora con el fin de obtener transformaciones estables. En el caso de que los constructos de expresión se integren en el genoma de las células hospedadoras, los constructos se integran en lugares aleatorios del genoma, o en un lugar diana predeterminado usando recombinación homóloga, en cuyo caso el lugar diana comprende preferentemente un gen altamente expresado.

Por lo tanto, algunos vectores de expresión útiles en la presente invención incluyen vectores derivados de cromosomas, episomales y de virus, por ejemplo, vectores que son un plásmido, bacteriófago, episoma de levadura, elementos cromosómicos de levadura, virus tales como baculovirus, papovavirus, vaccinia virus, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de la pseudorrabia y retrovirus, y vectores que son combinaciones de los mismos, tales como los que consisten en plásmido y elementos genéticos de bacteriófago, tales como cósmidos y fagémidos.

El polinucleótido de acuerdo con la invención debería estar unido operativamente a un promotor apropiado. Además del promotor nativo para el gen que codifica el polipéptido de la invención, se pueden usar otros promotores para dirigir la expresión del polipéptido de la invención. El promotor se puede seleccionar por su eficacia en la dirección de la expresión del polipéptido de la invención en el hospedador de expresión deseado. Un promotor adecuado puede ser un "promotor inducible" que es el que provoca la síntesis de ARNm de un gen que se inicia temporalmente en condiciones específicas. Alternativamente, un promotor puede ser un promotor "constitutivo", es decir el que permite que el gen se exprese en virtualmente todas las condiciones ambientales, es decir, un promotor que dirige una expresión génica constante no específica. Se puede usar un "promotor constitutivo fuerte", es decir, un promotor que provoca que los ARNm se inicien con una alta frecuencia en comparación con la célula hospedadora nativa.

En la invención se pueden usar preferentemente bacterias como células hospedadoras para la expresión del polipéptido de la invención, en particular *Bacillus*. Algunos promotores inducibles adecuados útiles en tales células hospedadoras incluyen: (i) promotores que se pueden regular principalmente mediante un factor auxiliar tal como un represor o un activador. Los represores son proteínas de unión a ADN de secuencia específica que reprimen la actividad del promotor. La transcripción se puede iniciar a partir de este promotor en presencia de un inductor que evita la unión del represor al operador del promotor. Algunos ejemplos de tales promotores de microorganismos Gram positivos incluyen, pero no se limitan a, *gnt* (promotor de operón de gluconato); *penP* de *Bacillus licheniformis*; *glnA* (glutamina sintetasa); *xyfAB* (operón de xilosa); *araABD* (operón de L-arabinosa) y el promotor P_{spac} , un promotor híbrido *SPO1/lac* que se puede controlar por inductores tales como isopropil- β -D-tiogalactopiranosido [IPTG] (Yansura D.G., Henner D.J. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 81 (2):439-443). Los activadores también son proteínas de unión a ADN de secuencia específica que inducen la actividad de promotor. Algunos ejemplos de tales promotores para microorganismos Gram positivos incluyen, pero no se limitan a, sistemas de dos componentes (PhoP-PhoR, DegU-DegS, Spo0A-Fosforelay), LevR, Mry y GltC. (ii) La producción de factores sigma secundarios puede ser responsable principalmente de la transcripción desde promotores específicos. Algunos ejemplos de microorganismos Gram positivos incluyen, pero no se limitan a, los promotores activados por factores sigma específicos de esporulación: σ^F , σ^E , σ^G y σ^K y el factor sigma de estrés general, σ^B . La respuesta mediada por σ^B está inducida por la limitación de energía y el estrés ambiental (Hecker M, Völker U. *Mol Microbiol.* 1998; 29(5):1129-1136). (iii) La atenuación y la antiterminación también regula la transcripción. Algunos ejemplos de microorganismos Gram positivos incluyen, pero no se limitan a, operón de *trp* y gen *sacB*. (iv) Otros promotores regulados en los vectores de expresión se basan en el sistema regulador *sacR* que confiere inducibilidad a la sacarosa (Klier AF, Rapoport G. *Annu Rev Microbiol.* 1988; 42:65-95).

Los promotores constitutivos fuertes se conocen bien y uno apropiado se puede seleccionar de acuerdo con la secuencia específica que se va a controlar en la célula hospedadora. Algunos promotores inducibles adecuados útiles en bacterias, tales como *Bacillus*, incluyen: promotores para microorganismos Gram positivos tales como, pero no limitados a, SP01-26, SP01-15, *veg*, *pyc* (promotor de piruvato carboxilasa), y *amyE*. Algunos ejemplos de

Algunos ejemplos adicionales de promotores útiles en células bacterianas, tales como *Bacillus*, incluyen los promotores de α -amilasa y *SPO2* así como promotores de genes de proteasa extracelulares.

En una realización preferente, las secuencias de promotor se pueden obtener a partir de una fuente bacteriana. En una realización más preferente, las secuencias de promotor se pueden obtener a partir de una bacteria Gram positiva tal como una cepa de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, o *Bacillus thuringiensis*; o una cepa de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; o a partir de una bacteria Gram negativa, por ejemplo, *E. coli* o *Pseudomonas* sp.

Un ejemplo de un promotor adecuado para dirigir la transcripción de una secuencia de polinucleótido en los métodos de la presente invención es el promotor obtenido a partir del operón *lac* de *E. coli*. Otro ejemplo es el promotor del gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (*dagA*). Otro ejemplo es el promotor del gen de proteasa alcalina de *Bacillus lentus* (*aprH*). Otro ejemplo es el promotor del gen de proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* (gen de subtilisina Carlsberg). Otro ejemplo es el promotor del gen de levansacarasa de *Bacillus subtilis* (*sacB*). Otro ejemplo es el promotor del gen de alfa amilasa de *Bacillus subtilis* (*amyF*). Otro ejemplo es el promotor del gen de alfa amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*). Otro ejemplo es el promotor del gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (*amyM*). Otro ejemplo es el promotor del gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (*amyQ*). Otro ejemplo es un promotor de "consenso" que tiene la secuencia TTGACA para la región "-35" y TATAAT para la región "-10". Otro ejemplo es el promotor del gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (*penP*). Otro ejemplo son los promotores de los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*.

Se pueden usar una diversidad de promotores que son capaces de dirigir la transcripción en las células hospedadoras recombinantes de la invención. Preferentemente la secuencia del promotor es de un gen altamente expresado. Algunos ejemplos de genes altamente expresados preferentes a partir de los cuales se pueden seleccionar los promotores y/o que están comprendidos en sitios diana predeterminados preferentes para la integración de constructos de expresión, incluyen, pero no se limitan a, genes que codifican enzimas glicolíticas tales como triosa-fosfato isomerasas (TPI), gliceraldehído-fosfato deshidrogenasas (GAPDH), fosfoglicerato quinasa (PGK), piruvato quinasa (PYK o PKI), alcohol deshidrogenasas (ADH), así como genes que codifican amilasas, glucoamilasas, proteasas, xilanasas, celobiohidrolasas, β -galactosidasas, alcohol (metanol) oxidasas, factores de elongación y proteínas ribosomales. Algunos ejemplos de genes altamente expresados adecuados incluyen, por ejemplo, el gen *LAC4* de *Kluyveromyces* sp., los genes de metanol oxidasa (AOX y MOX) de *Hansenula* y *Pichia*, respectivamente, los genes de glucoamilasa (*glaA*) de *A. niger* y *A. awamori*, el gen de TAKA-amilasa de *A. oryzae*, el gen *gpdA* de *A. nidulans* y el gen celobiohidrolasa de *T. reesei*.

Algunos ejemplos de promotores constitutivos y/o inducibles fuertes que son preferentes para su uso en células hospedadoras fúngicas de expresión son los que se pueden obtener a partir de genes fúngicos para promotores de xilanasas (*xlnA*), fitasa, ATP-sintetasa, subunidad 9 (*oliC*), triosa fosfato isomerasa (*tpi*), alcohol deshidrogenasa (*AdhA*), α -amilasa (*amy*), amiloglucosidasa (AG del gen *glaA*), acetamidasa (*amdS*) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gpd*).

Todos los promotores mencionados anteriormente están fácilmente disponibles en la técnica.

El vector puede contener un polinucleótido de la invención orientado en una dirección antisentido para proporcionar la producción de ARN antisentido.

El ADN del vector se puede introducir en células procariotas o eucariotas a través de técnicas de competencia natural, transformación convencional o transfección. Como se usa en el presente documento, los términos "transformación" y "transfección" se pretenden referir a una diversidad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir polinucleótidos extraños (por ejemplo, ADN) en una célula hospedadora, incluyendo coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transducción, infección, lipofección, transfección mediada por lípido catiónico o electroporación. Algunos métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedadoras se pueden encontrar en Sambrook, *et al.* (véase anteriormente) y otros manuales de laboratorio.

Con el fin de identificar y seleccionar células que alojen un vector, se introduce generalmente un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) en las células hospedadoras junto con el polinucleótido de la invención. Algunos marcadores seleccionables preferentes incluyen, pero no se limitan a, los

que confieren resistencia a fármacos o que complementan un defecto en la célula hospedadora.

Tales marcadores incluyen ATP sintetasa, subunidad 9 (*oliC*), orotidina-5'-fosfatodescarboxilasa (*pvrA*), el gen de resistencia G418 bacteriano (este también se puede usar en levadura, pero no en hongos), el gen de resistencia a la ampicilina (*E. coli*), los genes de resistencia para neomicina, kanamicina, tetraciclina, espectinomicina, eritromicina, cloranfenicol, fleomicina (*Bacillus*) y el gen *uidA* de *E. coli*, que codifica β -glucuronidasa (GUS). Los vectores se pueden usar *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN o usar para transfectar o transformar una célula hospedadora.

También se incluyen, por ejemplo, genes de marcadores versátiles que se pueden usar para la transformación de la mayoría de los hongos filamentosos y las levaduras tales como genes de acetamidasa o ADNc (los genes *amdS*, *niaD*, *facA* o ADNc de *A. nidulans*, *A. oryzae* o *A. niger*), o los genes que proporcionan resistencia a antibióticos tales como resistencia a G418, higromicina, bleomicina, kanamicina, metotrexato, fleomicina o benomilo (*benA*). Alternativamente, se pueden usar marcadores de selección específicos tales como marcadores auxotróficos que requieren las correspondientes cepas hospedadoras mutantes: por ejemplo D-alanina racemasa (de *Bacillus*), URA3 (de *S. cerevisiae* o genes análogos de otras levaduras), *pyrG* o *pyrA* (de *A. nidulans* o *A. niger*), *argB* (de *A. nidulans* o *A. niger*) o *trpC*. En una realización preferente el marcador de selección se suprime en la célula hospedadora transformada después de la introducción del constructo de expresión de modo que se obtengan células hospedadoras transformadas capaces de producir el polipéptido que estén exentas de genes de marcador de selección.

La expresión de proteínas en procariotas a menudo se lleva a cabo con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o de no fusión. Los vectores de fusión añaden un número de aminoácidos a una proteína codificada en los mismos, por ejemplo al extremo amino terminal de la proteína recombinante. Tales vectores de fusión sirven por lo general para tres fines: 1) aumentar la expresión de la proteína recombinante; 2) aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como ligandos en una purificación por afinidad. A menudo, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión después de la purificación de la proteína de fusión.

Se conocen en la técnica medios de cultivo y condiciones apropiadas para las células hospedadoras descritas anteriormente.

Los vectores preferentes para su uso en bacterias se desvelan, por ejemplo, en el documento de Patente WO-A1-2004/074468, que se adjunta por la presente por referencia. Otros vectores adecuados serán claramente evidentes para el experto en la materia.

Los vectores de la invención se pueden transformar en una célula hospedadora adecuada como se describe en el presente documento para proporcionar la expresión de un polipéptido de la invención. De ese modo, en un aspecto adicional la invención proporciona un proceso para preparar un polipéptido de acuerdo con la invención que comprende cultivar una célula hospedadora transformada o transfectada con un vector de expresión que codifica el polipéptido, y recuperar el polipéptido expresado.

Células hospedadoras

La invención proporciona además "células hospedadoras recombinantes" también denominadas en el presente documento "células hospedadoras" transformadas o transfectadas con los vectores para la replicación y/o expresión de polinucleótidos de la invención. Las células se seleccionarán para ser compatibles con dicho vector. Se pueden seleccionar promotores y otras señales de regulación de expresión para ser compatibles con la célula hospedadora para la que se diseña la expresión.

La invención se refiere a células, por ejemplo, células hospedadoras transformadas o células hospedadoras recombinantes que comprenden un polinucleótido de acuerdo con la invención o que comprenden un vector de acuerdo con la invención.

Una "célula hospedadora transformada" o "célula hospedadora recombinante" es una célula en la cual (o en un ascendiente de la cual) se ha introducido, por medio de técnicas de ADN recombinante, un polinucleótido de acuerdo con la invención. Se incluyen células tanto procariotas como eucariotas, por ejemplo, bacterias, hongos, levaduras, de insecto, de mamífero y similares.

Son especialmente preferentes las células de una cepa de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, o *Bacillus thuringiensis*; o de una cepa de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; o de una bacteria Gram negativa, por ejemplo, *E. coli* o *Pseudomonas* sp.

De acuerdo con otro aspecto, la célula hospedadora es una célula hospedadora eucariota. Preferentemente, la célula eucariota es una célula de mamífero, insecto, planta, hongo, o alga. Algunas células de mamífero preferentes incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, células 293, células Per.C6[®], e hibridomas. Se encuentran disponibles al público diversos vectores adecuados para la transfección estable de células de mamífero, y también se conocen públicamente métodos para construir tales líneas celulares, por ejemplo, en Ausubel *et al.* (véase anteriormente).

Las células de insecto preferentes incluyen, por ejemplo, células Sf9 y Sf21 y derivados de las mismas.

Más preferentemente, la célula eucariota es una célula fúngica, es decir, una célula de levadura, tal como una cepa de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*. Más preferentemente de *Kluyveromyces lactis*, *S. cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica* y *Pichia pastoris*, o una célula fúngica filamentosa.

Los hongos filamentosos incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (según definen Hawksworth *et al.*, en, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK). Los hongos filamentosos se caracterizan por una pared micélica compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es mediante elongación de hifa y el catabolismo del carbono es obligatoriamente aeróbico. Las cepas fúngicas filamentosas incluyen, pero no se limitan a, cepas de *Acremonium*, *Agaricus*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Panerochaete*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, y *Trichoderma*. Las células fúngicas filamentosas preferentes pertenecen a una especie del género *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Penicillium*, *Talaromyces*, *Fusarium* o *Trichoderma*, y lo más preferentemente a las especies *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus sojae*, *Aspergillus fumigatus*, *Talaromyces emersonii*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium lucknowense*, *Myceliophthora thermophila*, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma reesei* o *Penicillium chrysogenum*. Una célula hospedadora más preferente es *Aspergillus niger*.

Cuando la célula hospedadora de acuerdo con la invención es una célula de *Aspergillus niger*, la célula hospedadora es preferentemente CBS 513.88, CBS124.903 o un derivado de la misma.

Se puede seleccionar una célula hospedadora que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modificar y procesar el producto génico de una forma específica y deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos de proteína pueden facilitar el funcionamiento óptimo de la proteína.

Las diversas células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación posteriores a la traducción de proteínas y productos génicos. Se pueden seleccionar líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados familiares para los expertos en la materia de la biología molecular y/o microbiología para asegurar la modificación y el procesamiento deseados y correctos de la proteína extraña producida. Para este fin, se pueden usar células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento apropiado del transcrito primario, glicosilación, y fosforilación del producto génico. Tales células se conocen en la técnica.

Si se desea, se puede usar una célula hospedadora como se ha descrito anteriormente en la preparación de un polipéptido de acuerdo con la invención. Tal método comprende por lo general cultivar una célula hospedadora recombinante (por ejemplo, transformada o transfectada con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente) en condiciones para proporcionar la expresión (mediante el vector) de una secuencia codificante que codifica el polipéptido, y opcionalmente recuperar, más preferentemente recuperar y purificar el polipéptido producido de la célula o el medio de cultivo. Se pueden incorporar polinucleótidos de la invención a un vector replicable recombinante, por ejemplo, un vector de expresión. El vector se puede usar para replicar el polinucleótido en una célula hospedadora compatible. De ese modo, en una realización adicional, la invención proporciona un método de preparación de un polinucleótido de la invención mediante la introducción de un polinucleótido de la invención en un vector replicable, introducción del vector en una célula hospedadora compatible y crecimiento de la célula hospedadora en condiciones que producen la replicación del vector. El vector se puede recuperar de la célula hospedadora.

Preferentemente, el polipéptido de acuerdo con la invención se produce en forma de una proteína secretada en cuyo caso la secuencia de nucleótidos que codifica una forma madura del polipéptido en el constructo de expresión está unida operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de señal. Preferentemente, la secuencia de señal es nativa (homóloga), también denominada en el presente documento de "tipo silvestre", de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Alternativamente, la secuencia de señal es extraña (heteróloga) a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, en cuyo caso la secuencia de señal es preferentemente endógena a la célula hospedadora en la que se expresa la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la invención. Algunos ejemplos de secuencias de señal adecuadas para *Bacillus* son las de los genes amyE, yurI, flilL, vpr, glpQ,

phy, lytC, ywsB, ybbD, ybxi, yoiA, yiqB, ybbC, pel, yckD, ywaD, ywmD, yweA, yraJ, dacF, yfjS, yybN, yrpD, yvcE, wprA, yxaL, ykwD, yncM2, sacB, phrC, SacC, yoqM, ykoJ, lip, yfkN, yurl, ybfO, yfkD, yoaJ, xynA, penP, ydjM, yddT, yojL, yomL, yqxl, yrvJ, yvpA, yjcM, yjfA, ypjP, ggt, yoqH, ywtD, ylaE, yraJ, lytB, lytD, nprB, nucB, rplR, yfhK, yjdB, ykvV, ybbE, yuiC, ylbL, yacD, yvpB de *Bacillus subtilis*. Las secuencias de señal de levadura adecuadas son las que provienen de genes de factor α de levadura. De forma similar, una secuencia de señal adecuada para células hospedadoras fúngicas filamentosas es, por ejemplo, una señal de secuencia de un gen de amiloglucosidasa (AG) fúngico filamentoso, por ejemplo, el gen *glaA* de *A. niger*. Este se puede usar en combinación con el propio promotor de amiloglucosidasa (también denominado (gluco) amilasa), así como en combinación con otros promotores. También se pueden usar secuencias de señal híbridas en el contexto de la presente invención.

Las secuencias líder de secreción heterólogas preferentes son las que se originan a partir del gen de amiloglucosidasa (AG) fúngico (*glaA* - versiones tanto de 18 como de 24 aminoácidos, por ejemplo, de *Aspergillus*), el gen del factor α - (levaduras, por ejemplo, *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o los genes de α -amilasa (*amyE*, *amyQ* y *amyL*) y proteasa alcalina *aprE* y proteasa natural (*Bacillus*). Los vectores se pueden transformar o transfectar en una célula hospedadora adecuada como se ha descrito anteriormente para que proporcionen la expresión de un polipéptido de la invención. Este proceso puede comprender cultivar una célula hospedadora transformada con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en condiciones para proporcionar la expresión mediante el vector de una secuencia codificante que codifica el polipéptido.

La invención proporciona de ese modo células hospedadoras transformadas o transfectadas con, o que comprenden, un polinucleótido o vector de la invención. Preferentemente, el polinucleótido se transporta en un vector para la replicación y expresión del polinucleótido. Las células se seleccionarán para que sean compatibles con dicho vector y pueden ser, por ejemplo, células procariotas (por ejemplo, bacterianas), fúngicas, de levadura o de plantas.

También se puede seleccionar una célula hospedadora heteróloga en la que se produce el polipéptido de la invención en una forma que está básicamente exenta de las actividades enzimáticas que podrían interferir con las aplicaciones, por ejemplo, exenta de enzimas de degradación de almidón, degradación de celulosa o degradación de hemicelulosa. Esto se puede conseguir seleccionando una célula hospedadora que no produce normalmente tales enzimas.

La invención incluye procesos para la producción del polipéptido de la invención por medio de expresión recombinante de una secuencia de ADN que codifica el polipéptido. Para este fin se puede usar la secuencia de ADN de la invención para amplificación y/o intercambio génico de señales de expresión, tales como promotores, secuencias de señal de secreción, con el fin de permitir la producción económica del polipéptido en una célula hospedadora homologa o heteróloga adecuada. Una célula hospedadora homologa es una célula hospedadora que es de la misma especie o que es una variante dentro de la misma especie que la especie a partir de la cual se obtiene la secuencia de ADN.

La célula hospedadora puede sobreexpresar el polipéptido, y se conocen bien las técnicas de ingeniería genética para la sobreexpresión. De ese modo, el hospedador puede tener dos o más copias del polinucleótido codificante (y el vector puede tener de ese modo dos o más copias en consecuencia).

Por lo tanto, en una realización de la invención la célula hospedadora recombinante de acuerdo con la invención es capaz de expresar o sobreexpresar un polinucleótido o vector de acuerdo con la invención.

Otro aspecto de la invención es un método para producir un polipéptido de la invención que comprende (a) cultivar una célula hospedadora recombinante de acuerdo con la invención en condiciones tales que se produzca el polipéptido de la invención; y (b) opcionalmente recuperar el polipéptido de la invención del medio de cultivo celular.

De acuerdo con la presente invención, la producción del polipéptido de la invención se puede efectuar mediante el cultivo de una célula hospedadora de acuerdo con la invención, que se ha transformado con uno o más polinucleótidos de la presente invención, en un medio de fermentación de nutrientes convencional. El método de la invención comprende la etapa de cultivar una célula hospedadora de la invención en condiciones tales que se produzca un polipéptido de la invención.

Las células hospedadoras recombinantes de acuerdo con la invención se pueden cultivar usando procedimientos conocidos en la técnica. Para cada combinación de un promotor y una célula hospedadora, están disponibles condiciones de cultivo que son propicias para la expresión de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido. Después de alcanzar la densidad o título celular deseado de polipéptido, se detiene el cultivo y se recupera el polipéptido usando procedimientos conocidos.

El término "cultivar" incluye mantener y/o hacer crecer una célula hospedadora recombinante viva de la presente invención, en particular la célula hospedadora recombinante de acuerdo con la invención. En un aspecto, se cultiva una célula hospedadora recombinante de la invención en medios líquidos. En otro aspecto, se cultiva una célula hospedadora recombinante en medios sólidos o medios semisólidos.

Preferentemente, la célula hospedadora recombinante de la invención se cultiva en medios líquidos que comprenden nutrientes esenciales o beneficiosos para el mantenimiento y/o crecimiento de la célula hospedadora recombinante. Tales nutrientes incluyen, pero no se limitan a, fuentes de carbono o sustratos de carbono, por ejemplo carbohidratos complejos tales como habas o granos, almidones, azúcares, alcoholes azúcares, hidrocarburos, aceites, grasas, ácidos grasos, ácidos orgánicos y alcoholes; fuentes de nitrógeno, por ejemplo proteínas vegetales, peptonas, péptidos y aminoácidos obtenidos a partir de granos, habas y tubérculos, proteínas, péptidos y aminoácidos obtenidos a partir de fuentes animales tales como carne, leche y subproductos animales tales como peptonas, extractos de carne e hidrolizados de caseína; fuentes de nitrógeno inorgánico tales como urea, sulfato de amonio, cloruro de amonio, nitrato de amonio y fosfato de amonio; fuentes de fósforo, por ejemplo ácido fosfórico, y sales de sodio y potasio del mismo; elementos traza, por ejemplo sales de magnesio, hierro, manganeso, calcio, cobre, cinc, boro, molibdeno y/o cobalto; así como factores de crecimiento tales como aminoácidos, vitaminas, promotores de crecimiento y similares.

La selección del medio apropiado se puede basar en la selección del hospedador de expresión, es decir la selección de la célula hospedadora recombinante y/o basarse en los requisitos reguladores del constructo de expresión. Los expertos en la materia conocen tales medios. Si se desea, en medio puede contener componentes adicionales que favorezcan a los hospedadores de expresión transformados con respecto a otros microorganismos potencialmente contaminantes.

Las células hospedadoras recombinantes se pueden cultivar en medios líquidos de forma continua o intermitente, mediante métodos de cultivo convencionales tales como cultivo en reposo, cultivo en tubo de ensayo, cultivo con agitación, cultivo con centrifugación y aireación o fermentación. Preferentemente, las células hospedadoras recombinantes se cultivan en un fermentador. Los procesos de fermentación de la invención incluyen métodos discontinuos, de alimentación de lotes y continuos. Se han desarrollado una diversidad de procesos y se conocen en la técnica.

Las células hospedadoras recombinantes se cultivan preferentemente a pH controlado. En una realización, las células hospedadoras recombinantes se pueden cultivar a un pH entre 4,5 y 8,5, preferentemente entre 6,0 y 8,5, más preferentemente a un pH de aproximadamente 7. El pH deseado se puede mantener mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia.

Preferentemente, las células hospedadoras recombinantes se cultivan además en condiciones de aireación controlada y en condiciones de temperatura controlada. En una realización, las temperaturas controladas incluyen temperaturas entre 15 y 70 °C, preferentemente las temperaturas están entre 20 y 55 °C, más preferentemente entre 30 y 50 °C.

Las condiciones apropiadas se seleccionan habitualmente basándose en la selección del hospedador de expresión y de la proteína que se va a producir.

Después de la fermentación, si fuera necesario, las células se pueden retirar el caldo de fermentación por medio de centrifugación o filtración. Después de que se haya detenido la fermentación y después de la retirada de las células, el polipéptido de la invención se puede recuperar a continuación y, si se desea, purificar y aislar mediante medios convencionales que incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con una resina convencional, tratamiento con un adsorbente convencional, alteración de pH, extracción con disolventes, diálisis, filtración, concentración, cristalización, recristalización, ajuste de pH, liofilización y similares.

Por ejemplo, la enzima alfa-amilasa de acuerdo con la invención se puede recuperar y purificar de cultivos celulares recombinantes mediante métodos conocidos en la técnica (Protein Purification Protocols, serie Methods in Molecular Biology de Paul Cutler, Humana Press, 2004).

Habitualmente, el compuesto está "aislado" cuando la preparación resultante está básicamente exenta de otros componentes. En una realización, la preparación tiene una pureza de más de aproximadamente un 80 % (en peso seco) del compuesto deseado (por ejemplo, menos de aproximadamente un 20 % de todos los medios, componentes o productos secundarios de fermentación), más preferentemente más de aproximadamente un 90 % del compuesto deseado, incluso más preferentemente más de aproximadamente un 95 % el compuesto deseado y lo más preferentemente más de aproximadamente de un 98 a un 99 % del compuesto deseado.

Alternativamente, sin embargo, el compuesto deseado no se purifica a partir de la célula hospedadora recombinante o del cultivo. El cultivo completo o el sobrenadante del cultivo se pueden usar como fuente del producto. En una realización específica, el cultivo o el sobrenadante del cultivo se usan sin modificación. En una realización adicional, el cultivo o el sobrenadante del cultivo se concentran, se secan y/o se liofilizan.

La célula hospedadora recombinante de la invención es capaz de producir un polipéptido del compuesto de la invención en condiciones adecuadas. Preferentemente, la producción de un polipéptido de la invención significa la producción de al menos aproximadamente 50 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 500 mg, aproximadamente 1 g, aproximadamente 3 g, aproximadamente 5 g o aproximadamente

10 g del polipéptido de la invención por litro de medio de cultivo.

Preparación de enzima

- 5 Se cultivó la cepa de *Bacillus* DSM-AMB154-1 (véanse los ejemplos) en condiciones aeróbicas en un medio de fermentación adecuado.

10 Un medio de fermentación adecuado puede contener fuentes asimilables de carbono y nitrógeno además de sales inorgánicas opcionalmente junto con nutrientes promotores de crecimiento, tales como extracto de levadura. La fermentación se lleva a cabo por lo general a 35-40 °C y a un pH de 6,5-7,5 y preferentemente se mantiene aproximadamente constante por medios automáticos. La enzima se extrae del medio. Al final de la fermentación, si se requiere, el hospedador de producción se puede eliminar por medios conocidos por los expertos en la materia. El caldo de cultivo resultante se puede liberar de células bacterianas y residuos de las mismas junto con otros sólidos, por ejemplo mediante filtración o centrifugación. El filtrado o sobrenadante que contiene la enzima se puede clarificar adicionalmente, por ejemplo mediante filtración o centrifugación, y a continuación concentrar según sea necesario, por ejemplo mediante ultrafiltración o en un evaporador a presión reducida para proporcionar un concentrado que, si se desea, se puede llevar a sequedad, por ejemplo mediante liofilización o secado por pulverización. Por lo general, el producto de enzima resultante en bruto exhibe una actividad en el intervalo de aproximadamente 10.000 - 500.000 MU por gramo.

20 El polinucleótido de acuerdo con la invención comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

La invención se refiere a un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de alfa-amilasa que comprende:

- 25 (a) una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 34 a 719 de SEC ID N°: 2; o
(b) una secuencia de polinucleótido como se expone en los nucleótidos 100 a 2157 de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3; o
(c) una secuencia de polinucleótido como se expone en SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.

30 El polinucleótido de acuerdo con la invención codifica una alfa-amilasa.

En una realización del polinucleótido de acuerdo con la invención, el polinucleótido es un polinucleótido aislado que comprende:

- 35 (a) una secuencia de polinucleótido como se expone en SEC ID N°: 1 o 3; o
(b) una secuencia de polinucleótido como se expone en los nucleótidos 100 a 2157 de la secuencia de polinucleótido de SEC ID N°: 1 o 3 (inclusive los nucleótidos 100 y 2157, para evitar la duda); o
(c) una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 2 o que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 34 a 719 de SEC ID N°: 2 (inclusive los aminoácidos 34 y 719, para evitar la duda).

En una realización del polinucleótido de acuerdo con la invención, el polinucleótido se produce mediante NCIMB14276 de *Alicyclobacillus pohliae*.

- 45 En un aspecto adicional del polinucleótido de acuerdo con la invención el polinucleótido aislado se produce mediante NCIMB14276 de *Alicyclobacillus pohliae*.

El vector de acuerdo con la invención comprende la secuencia de polinucleótido de acuerdo con la invención.

- 50 En una realización del vector de acuerdo con la invención el vector es un vector de expresión, en el que la secuencia de polinucleótido de acuerdo con la invención está unida operativamente al menos a una secuencia reguladora que permite la expresión de la secuencia de polinucleótido en una célula hospedadora adecuada.

55 Algunas células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, incluyendo *Escherichia*, *Anabaena*, *Caulobacter*, *Gluconobacter*, *Rhodobacter*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Rhizobium* (*Sinorhizobium*), *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Metilobacterium*, *Staphylococcus* o *Streptomyces*. En un aspecto del vector de acuerdo con la invención, la célula hospedadora es una célula bacteriana que se selecciona entre el grupo que consiste en *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. halodurans*, *B. pumilus*, *G. oxydans*, *Caulobacter crescentus* CB 15, *Metilobacterium extorquens*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Pseudomonas zeaxanthinifaciens*, *Paracoccus denitrificans*, *C. glutamicum*, *Staphylococcus carnosus*, *Streptomyces lividans*, *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium radiobacter*.

65 En una realización adicional del vector de acuerdo con la invención la célula hospedadora adecuada es una especie de *Aspergillus*, *Bacillus*, *Chrysosporium*, *Escherichia*, *Kluyveromyces*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces*, *Streptomyces* o *Talaromyces*, preferentemente la célula hospedadora es una especie de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus Niger* o *Aspergillus oryzae*.

La célula hospedadora recombinante de acuerdo con la invención comprende el polinucleótido de acuerdo con la invención o comprende el vector de acuerdo con la invención.

En una realización de la célula hospedadora recombinante de acuerdo con la invención, la célula hospedadora recombinante es capaz de expresar o sobreexpresar el polinucleótido de acuerdo con la invención o el vector de acuerdo con la invención.

El método de acuerdo con la invención para fabricar el polinucleótido de acuerdo con la invención o el vector de acuerdo con la invención comprende las etapas de cultivar una célula hospedadora transformada con dicho polinucleótido o dicho vector y aislar dicho polinucleótido o dicho vector de dicha célula hospedadora.

El polipéptido de acuerdo con la invención comprende:
un polipéptido de alfa-amilasa que comprende:

- (a) una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 34 a 719 de SEC ID N°: 2; o
- (b) una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido como se expone en los nucleótidos 100 a 2157 de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.

En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, el polipéptido es un polipéptido aislado que comprende:

- (a) una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 34 a 719 de SEC ID N°: 2; o
- (b) una secuencia de aminoácidos codificada por el polinucleótido como se expone los nucleótidos 100 a 2157 de SEC ID N°: 1 o 3; o
- (c) la secuencia de aminoácidos de acuerdo con (b), en la que el polinucleótido se produce mediante NCIMB14276 de *Alicyclobacillus pohliae*.

En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, el polipéptido se puede obtener mediante la expresión del polinucleótido de acuerdo con invención o el vector de acuerdo con la invención en una célula hospedadora apropiada.

El método de acuerdo con la invención para fabricar el polipéptido de acuerdo con la invención comprende cultivar la célula hospedadora recombinante de acuerdo con la invención en condiciones que permitan la expresión del polipéptido de acuerdo con la invención o el vector de acuerdo con la invención y, opcionalmente, recuperar el polipéptido codificado de la célula o el medio de cultivo.

En una realización del método de acuerdo con la invención para fabricar el polipéptido de acuerdo con la invención el método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un vector, comprendiendo el vector un polinucleótido que comprende:

- (a) una secuencia de polinucleótido como se expone en SEC ID N°: 1 o 3; o
- (b) una secuencia de polinucleótido como se expone en los nucleótidos 100 a 2157 de la secuencia de polinucleótido de SEC ID N°: 1 o 3 (inclusive los nucleótidos 100 y 2157, para evitar la duda); o
- (c) una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 2 o que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 34 a 719 de SEC ID N°: 2 (inclusive los aminoácidos 34 y 719, para evitar la duda),

en condiciones que permitan la expresión del vector y, opcionalmente, recuperar el polipéptido codificado de la célula o el medio de cultivo.

En una realización del método de acuerdo con la invención para fabricar el polipéptido de acuerdo con la invención del método comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un polinucleótido, comprendiendo dicho polinucleótido:

- (a) una secuencia de polinucleótido como se expone en SEC ID N°: 1 o 3; o
 - (b) una secuencia de polinucleótido como se expone en los nucleótidos 100 a 2157 de la secuencia de polinucleótido de SEC ID N°: 1 o 3 (inclusive los nucleótidos 100 y 2157, para evitar la duda); o
 - (c) una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 2 o que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 34 a 719 de SEC ID N°: 2 (inclusive los aminoácidos 34 y 719, para evitar la duda),
- en condiciones que permitan la expresión del polinucleótido y, opcionalmente, recuperar el polipéptido codificado de la célula o el medio de cultivo.

La invención se refiere al uso del polipéptido de acuerdo con la invención en la fabricación de alimentos.

En una realización del uso de acuerdo con la invención en la fabricación de alimentos, el uso es la fabricación de un producto horneado, preferentemente pan o pasteles.

La composición de enzima de acuerdo con la invención comprende el polipéptido de acuerdo con la invención y uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en polvo de leche, gluten, grasa granulada, una enzima adicional, un aminoácido, una sal, oxidantes (incluyendo ácido ascórbico, bromato y Azodicarbonamida

(ADA)), agentes reductores (incluyendo L-cisteína), emulgentes (incluyendo mono/diglicéridos tales como monoestearato de glicerol (GMS), estearoil lactilato sódico (SSL), estearoil lactilato de calcio (CSL), ésteres de poliglicerol de ácidos grasos (PGE) y DATEM), gomas (incluyendo goma de guar y goma de xantano), aromas, ácidos (incluyendo ácido cítrico, ácido propiónico), almidón, almidón modificado, gluten, humectantes (incluyendo glicerol) y conservantes.

En una realización de la composición de enzima de acuerdo con la invención la enzima adicional es una enzima lipolítica, preferentemente una fosfolipasa, una galactolipasa o un enzima que tiene actividad tanto de fosfolipasa como de galactolipasa.

En una realización de la composición de enzima de acuerdo con la invención la enzima adicional es una fosfolipasa.

En una realización de la composición de enzima de acuerdo con la invención la enzima adicional es una galactolipasa.

En una realización de la composición de enzima de acuerdo con la invención la enzima adicional es una enzima que tiene actividad tanto de fosfolipasa como de galactolipasa.

El método de acuerdo con la invención para preparar una masa comprende la etapa de combinar el polipéptido de acuerdo con la invención o la composición de enzima de acuerdo con la invención y al menos un ingrediente de masa. "Combinar" incluye, sin limitación, añadir el polipéptido o la composición de enzima de acuerdo con la invención al menos a un ingrediente de masa, añadir el al menos un ingrediente de masa al polipéptido o la composición de enzima de acuerdo con la invención, mezclar el polipéptido de acuerdo con la invención y el al menos un ingrediente de masa.

En un aspecto del método de acuerdo con la invención para preparar una masa, el método comprende las etapas de combinar el polipéptido de acuerdo con la invención y al menos un componente seleccionado entre harina, huevos, agua, sal, azúcar, aromas, grasa (incluyendo mantequilla, margarina, aceite y manteca), levadura de repostería, sistemas de fermentación químicos, leche, oxidantes (incluyendo ácido ascórbico, bromato y Azodicarbonamido (ADA)), agentes reductores (incluyendo L-cisteína), emulgentes (incluyendo mono/diglicéridos tales como monoestearato de glicerol (GMS), estearoil lactilato sódico (SSL), estearoil lactilato de calcio (CSL), ésteres de poliglicerol de ácidos grasos (PGE) y DATEM), gomas (incluyendo goma de guar y goma de xantano), aromas, ácidos (incluyendo ácido cítrico, ácido propiónico), almidón, almidón modificado, gluten, humectantes (incluyendo glicerol) y conservantes.

En un aspecto del método de acuerdo con la invención para preparar una masa, el método comprende las etapas de combinar la composición de enzima de acuerdo con la invención y al menos un componente seleccionado entre harina, huevos, agua, sal, azúcar, aromas, grasa (incluyendo mantequilla, margarina, aceite y manteca), levadura de repostería, sistemas de fermentación químicos, leche, oxidantes (incluyendo ácido ascórbico, bromato y Azodicarbonamido (ADA)), agentes reductores (incluyendo L-cisteína), emulgentes (incluyendo mono/diglicéridos tales como monoestearato de glicerol (GMS), estearoil lactilato sódico (SSL), estearoil lactilato de calcio (CSL), ésteres de poliglicerol de ácidos grasos (PGE) y DATEM), gomas (incluyendo goma de guar y goma de xantano), aromas, ácidos (incluyendo ácido cítrico, ácido propiónico), almidón, almidón modificado, gluten, humectantes (incluyendo glicerol) y conservantes.

"Combinar" en los dos aspectos anteriores incluye, sin limitación, añadir el polipéptido o la composición de enzima de acuerdo con la invención al menos al un componente indicado anteriormente, añadir el al menos un componente indicado anteriormente al polipéptido o la composición de enzima de acuerdo con la invención, mezclar el polipéptido de acuerdo con la invención y el al menos un componente indicado anteriormente.

La masa de acuerdo con la invención comprende el polipéptido de acuerdo con la invención o la composición de enzima de acuerdo con la invención.

la invención y el al menos un componente indicado anteriormente.

La masa de acuerdo con la invención comprende el polipéptido de acuerdo con la invención o la composición de enzima de acuerdo con la invención.

El método de acuerdo con la invención para preparar un producto horneado comprende la etapa de hornear la masa de acuerdo con la invención.

En una realización del método para preparar un producto horneado, el método comprende hornear una masa que comprende el polipéptido de acuerdo con la invención.

En una realización del método para preparar un producto horneado, el método comprende hornear una masa que comprende la composición de enzima de acuerdo con la invención.

En una realización del método para preparar un producto horneado, el producto horneado es pan o pasteles.

Se puede obtener un producto horneado mediante el método de acuerdo con la invención para preparar el producto horneado.

La alfa-amilasa de acuerdo con la invención es una enzima de degradación de almidón. La actividad de alfa-amilasa se puede determinar adecuadamente usando el procedimiento Ceralpha[®], que está recomendado por la Asociación Americana de Químicos de Cereales (AACC).

Una lipasa es una enzima que hidroliza triacilglicerol y/o galactolípidos y/o fosfolípidos.

La actividad de lipasa se puede determinar espectrofotométricamente usando el sustrato cromogénico palmitato de p-nitrofenilo (pNPP, Sigma N-2752). En este ensayo el pNPP se disuelve en 2-propanol (40 mg de pNPP por 10 ml de 2-propanol (Merck 1.09634)) y se suspende en tampón acetato 100 mM de pH = 5,0 que contiene Triton X-100 al 1,0 % (Merck 1.12298) (5 ml de sustrato en 45 ml de tampón). La concentración final de sustrato es 1,1 mM. La lipasa se incuba con esta solución de sustrato a 37 °C durante 10 minutos. La reacción se detiene por adición de tampón de parada TRIS al 2 % (Merck 1.08387) + Triton X-100 al 1 % en una proporción 1:1 con respecto a la mezcla de reacción y posteriormente se mide el p-nitrofenol (pNP) formado a 405 nm. Este ensayo también se puede aplicar a diferentes valores de pH con el fin de determinar la dependencia de pH de una lipasa. Se debería entender que se podrían requerir diferentes tampones para diferentes valores de pH o que podrían ser necesarios diferentes detergentes para formar la emulsión del sustrato. Una unidad de lipasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de p-nitrofenol por minuto en las condiciones de reacción indicadas. Se debería entender que no es infrecuente practicar en el análisis de rutina el uso de soluciones patrón enzimáticas de calibración con una actividad determinada conocida en un ensayo diferente para correlacionar la actividad de un ensayo dado con las unidades que se determinarían en el ensayo de calibración.

Alternativamente, la actividad de lipasa se puede determinar usando 2,3-mercapto-1-propanol-tributirato (TBDMP) como sustrato. La lipasa hidroliza el enlace o enlaces tioéster del TBDMP liberando de ese modo ácido butanoico y 2,3-mercapto-1-propanol-dibutirato, 2,3-mercapto-1-propanol-monobutirato o 2,3-mercapto-1-propanol. Los grupos tiol liberados se valoran en una reacción posterior con 4,4,-ditiodipiridina (DTDP) para formar 4-tiopiridona. La última está en un equilibrio tautomérico con 4-mercaptopiridina que absorbe a 334 nm. La reacción se lleva a cabo en tampón acetato 0,1 M de pH 5,0 que contiene Triton-X100 al 0,2 %, TBDMP 0,65 mM y DTDP 0,2 mM a 37 °C. Una unidad de lipasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de 4-tiopiridona por minuto en las condiciones de reacción indicadas.

Además de la medida espectrofotométrica, la actividad de lipasa también se puede determinar usando medidas valorimétricas. Por ejemplo, la actividad de esterasa de una enzima lipolítica se puede medir con tributirina como sustrato de acuerdo con Food Chemical Codex, cuarta edición, National Academy Press, 1996, p803.

Una fosfolipasa es una enzima que cataliza la liberación de grupos acilo grasos a partir de un fosfolípido. Puede ser una fosfolipasa A2 (PLA2, EC 3.1.1.4) o una fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32). Puede tener o no tener otras actividades tales como actividad de triacilglicerol lipasa (EC 3.1.1.3) y/o galactolipasa (EC 3.1.1.26).

La fosfolipasa puede ser una enzima nativa de fuentes microbianas o de mamífero.

Un ejemplo de una fosfolipasa de mamífero es PLA2 pancreática, por ejemplo PLA2 bovina o porcina tal como el producto comercial Lecitase 10L (PLA2 porcina, producto de Novozymes A/S).

Las fosfolipasas microbianas pueden provenir de *Fusarium*, por ejemplo, fosfolipasa A1 de *F. oxysporum* (documento de Patente WO 1998/026057), fosfolipasa A1 de *F. venenatum* (descrita en el documento de Patente WO 2004/097012 como una fosfolipasa A2 denominada FvPLA2), de *Tuber*, por ejemplo fosfolipasa A2 de *T. borchii* (denominada TbPLA2, documento de Patente WO 2004/097012).

La fosfolipasa también puede ser una variante de enzima lipolítica con actividad de fosfolipasa, por ejemplo como se describe en los documentos de Patente WO 2000/032758 o WO 2003/060112.

La fosfolipasa también puede catalizar la liberación de grupos acilo grasos de otros lípidos presentes en la masa, particularmente lípidos de trigo. De ese modo, la fosfolipasa puede tener actividad de triacilglicerol lipasa (EC 3,1.1.3) y/o actividad de galactolipasa (EC 3,1.1.26). La fosfolipasa puede ser una enzima lipolítica como se describe en el documento de Patente WO2009/106575, tal como el producto comercial Panamore[®], producto de DSM.

La expresión "producto horneado" se refiere a un producto alimentario horneado preparado a partir de una masa.

Algunos ejemplos de productos horneados, ya sean de tipo blanco, marrón o integral, que se pueden producir ventajosamente mediante la presente invención incluyen pan (en particular pan blanco, integral o de centeno), por lo general en forma de barras o panecillos, pan de tipo *baguette* francesa, repostería, *croissants*, *brioche*, *panettone*,

pasta, fideos (cocidos, fritos o salteados), pan de pita y otros panes planos, tortillas, tacos, pasteles, tortillas, galletas en particular magdalenas, roscas, pan ácimo, pasta de hojaldre, pan al vapor, pan crujiente, *brownies*, pasteles en láminas, tentempiés (por ejemplo, galletas saladas, pedacitos de tortilla, aperitivos fabricados, patatas fritas fabricadas).

Algunos productos horneados incluyen sin limitación pan enlatado, barras de pan, ondas, panecillos, pan ácimo, *focaccia*, tostada Melba, *zwieback*, *croutons*, galletas saladas blandas, pan duro y blando, palitos de pan, pan fermentado con levadura y fermentado químicamente, productos de masa laminada tales como pasteles daneses, *croissants* o productos de hojaldre, magdalenas, danesas, *bagels*, revestimientos de repostería, *crackers*, obleas, masa de pizza, tortillas, productos de pasta, *crepes*, gofres, productos parcialmente horneados y productos de masa refrigerada y congelada.

Un ejemplo de un producto parcialmente horneado incluye, sin limitación, pan parcialmente horneado que se completa el punto de venta o consumo con un segundo proceso de horneado corto.

El término "masa" se define en el presente documento con una mezcla de harina y otros ingredientes. En un aspecto, la masa es lo suficientemente firme para amasar o pasar el rodillo. La masa puede ser fresca, congelada, preparada o parcialmente horneada. La preparación de masa congelada se describe por Kulp y Lorenz en *Frozen and Refrigerated Doughs and Batters*.

La masa se prepara usando ingredientes de masa, que incluyen sin limitación harina (de cereales), una fuente de lecitina incluyendo huevos, agua, sal, azúcar, aromas, una fuente de grasa incluyendo mantequilla, margarina, aceite y manteca, levadura de repostería, sistemas de fermentación química tales como una combinación de un ácido (compuesto generador) y bicarbonato, una fuente de proteína incluyendo leche, harina de soja, oxidantes (incluyendo ácido ascórbico, bromato y Azodicarbonamido (ADA)), agentes reductores (incluyendo L-cisteína), emulgentes (incluyendo mono/diglicéridos tales como monoestearato de glicerol (GMS), estearoil lactilato sódico (SSL), estearoil lactilato de calcio (CSL), ésteres de poliglicerol de ácidos grasos (PGE) y DATEM), gomas (incluyendo goma de guar y goma de xantano), aromas, ácidos (incluyendo ácido cítrico, ácido propiónico), almidón, almidón modificado, gluten, humectantes (incluyendo glicerol) y conservantes.

Algunos cereales incluyen maíz, arroz, trigo, cebada, sorgo, mijo, avena, centeno, triticale, trigo sarraceno, quinoa, espelta, *einkorn*, *emmer*, *durum* y *kamut*.

La masa se prepara habitualmente a partir de ingredientes de masa básicos incluyendo harina (cereal), tal como harina de trigo o harina de arroz, agua y opcionalmente sal. Para productos fermentados, se usa principalmente levadura de repostería junto con sistemas de fermentación química tales como una combinación de un ácido (compuesto generador) y bicarbonato.

El término masa incluye en el presente documento mezcla para rebozar. Una mezcla para rebozar es una mezcla semilíquida, suficientemente poco espesa para poder caer o verterse desde una cuchara, de una o más harinas combinadas con líquidos tales como agua, leche o huevos usada para preparar diversos alimentos, incluyendo pasteles.

Una masa se puede preparar usando una mezcla incluyendo una mezcla de pasteles, una mezcla de galletas, una mezcla de *brownie*, una mezcla de pan, una mezcla de cortitas y una mezcla de *crepe*.

El término masa incluye masa congelada, que también se puede denominar masa refrigerada. Existen diferentes tipos de masa congelada; la que se congela antes de la prueba y la que se congela después de una etapa de prueba parcial o completa. La masa congelada se usa por lo general para fabricar productos de pan que incluyen sin limitación galletas, pan, palitos de pan y *croissants*.

La invención también se refiere al uso de la alfa-amilasa de acuerdo con la invención en diversos procesos industriales. A pesar de la experiencia a largo plazo obtenida con estos procesos, la alfa-amilasa de acuerdo con la invención pueden presentar ventajas con respecto a las enzimas usadas en la actualidad. Dependiendo de la aplicación específica, estas ventajas pueden incluir aspectos tales como costes de producción inferiores, mayor especificidad hacia el sustrato, menor capacidad antigénica, menos actividades secundarias indeseables, mayores rendimientos cuando se produce en un microorganismo adecuado, pH e intervalos de temperatura más adecuados, mejor sabor en el producto final así como buena calidad y aspectos kosher.

Preferentemente, la alfa amilasa de acuerdo con la invención se puede usar en la industria alimentaria, más preferentemente en la fabricación de alimentos.

Un ejemplo de una aplicación industrial de la enzima alfa-amilasa de acuerdo con la invención en alimentos es su uso en aplicaciones de repostería. La alfa-amilasa de acuerdo con la invención se puede usar, por ejemplo, en productos horneados tales como pan o pasteles. Por ejemplo, para mejorar la calidad de la masa y/o del producto horneado.

Por lo tanto, en una realización de la invención se proporciona el uso de la alfa-amilasa de acuerdo con la invención en la preparación de una masa y se proporciona una masa que comprende la alfa-amilasa de acuerdo con la invención. La invención también proporciona la preparación de una masa que comprende las etapas de añadir la alfa-amilasa de acuerdo con la invención al menos a un ingrediente de masa.

Generalmente, se añaden por separado a la masa levadura, enzimas y opcionalmente aditivos.

Las enzimas se pueden añadir en forma seca, por ejemplo, granulada o en forma líquida. Los aditivos se encuentran en la mayoría de los casos en forma de polvo. Los aditivos incluyen oxidantes (incluyendo ácido ascórbico, bromato y Azodicarbonamido (ADA)), agentes reductores (incluyendo L-cisteína), emulgentes (incluyendo mono/diglicéridos tales como monoestearato de glicerol (GMS), estearoil lactilato sódico (SSL), estearoil lactilato de calcio (CSL), ésteres de poliglicerol de ácidos grasos (PGE) y DATEM), gomas (incluyendo goma de guar y goma de xantano), aromas, ácidos (incluyendo ácido cítrico, ácido propiónico), almidón, almidón modificado, gluten, humectantes (incluyendo glicerol) y conservantes.

La preparación de una masa a partir de los ingredientes de masa se conoce bien la técnica e incluye la mezcla de dichos ingredientes y opcionalmente una o más etapas de moldeado y fermentación.

La preparación de productos horneados a partir de tales masas también se conoce en la técnica y puede comprender moldeado y conformado y posterior fermentación de la masa seguido de horneado a las temperaturas y tiempos de horneado requeridos. En una realización, la invención proporciona un método para preparar un producto horneado que comprende la etapa de hornear la masa de acuerdo con la invención. El horneado de la masa para producir un producto horneado se puede llevar a cabo usando métodos bien conocidos en la técnica. De acuerdo con este método, se puede obtener un producto horneado. Preferentemente, el producto horneado es pan o pasteles. En un aspecto de la invención, la alfa-amilasa de acuerdo con la invención se puede usar para preparar masas laminadas para productos horneados más crujientes.

La presente invención también se refiere a métodos para preparar una masa o un producto horneado que comprenden incorporar a la masa una cantidad eficaz de la alfa-amilasa de acuerdo con la invención, que mejora una o más propiedades de la masa o del producto horneado obtenido a partir de la masa con respecto a una masa o un producto horneado en el que no se incorpora el polipéptido.

La expresión "incorporar a la masa" se define en el presente documento como añadir la enzima alfa-amilasa de acuerdo con la invención a la masa, cualquier ingrediente a partir del cual se va a preparar la masa, y/o cualquier mezcla de ingredientes de masa a partir de la cual se va a preparar la masa. En otras palabras, la enzima alfa-amilasa de acuerdo con la invención se puede añadir en cualquier etapa de la preparación de la masa y se puede añadir en una, dos o más etapas. La enzima alfa-amilasa de acuerdo con la invención se añade a los ingredientes de una masa que se amasa y hornea para preparar el producto horneado usando métodos bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.567.046, y los documentos de Patente EP-A-426.211, JP-A-60-78529, JP-A-62-111629, y JP-A-63-258528.

La expresión "cantidad eficaz" se define en el presente documento como una cantidad de la alfa-amilasa de acuerdo con la invención que es suficiente para proporcionar un efecto medible en al menos una propiedad de interés de la masa y/o el producto horneado. Una cantidad adecuada está en un intervalo de 10-20000 unidades de MU/kg de harina, preferentemente 100-2000 unidades de MU/kg de harina, 200-1000 unidades de MU/kg de harina. Una cantidad adecuada incluye 1 ppm-2000 ppm, preferentemente 10-200 ppm, preferentemente 20-80 ppm de una enzima que tiene una actividad en un intervalo de aproximadamente 10.000 a 12.000, preferentemente de aproximadamente 10.000 MU/g. En el presente documento y en lo sucesivo MU significa Unidad de Maltotriosa como se define en los ejemplos bajo el título Ensayo de Maltotriosa (Ensayo de MU).

La expresión "propiedad mejorada" se define en el presente documento como cualquier propiedad de una masa y/o un producto obtenido a partir de la masa, particularmente un producto horneado, que mejora por la acción de la enzima alfa-amilasa de acuerdo con la invención con respecto a una masa o producto en el que no se incorpora la enzima alfa-amilasa de acuerdo con la invención. La propiedad mejorada puede incluir, pero no se limita a, aumento de la resistencia de la masa, aumento de la elasticidad de la masa, aumento de la estabilidad de la masa, reducción de la adherencia de la masa, mejora de la extensibilidad de la masa, mejora de la mecanización de la masa, mejora el volumen del producto horneado, mejora del aroma del producto horneado, mejora de la estructura de la corteza del producto horneado, mejora de la blandura de la corteza del producto horneado, mejora de la formación de burbujas del producto horneado, mejora del carácter crujiente, mejora de la resiliencia tanto inicial como en particular después de almacenamiento, reducción de la dureza después de almacenamiento y/o mejora de antirancidez del producto horneado.

La propiedad mejorada se puede terminar por comparación de una masa y/o un producto horneado preparado con y sin la adición del polipéptido (aislado) de la presente invención de acuerdo con los métodos de la presente invención que se describen posteriormente en los Ejemplos. Las cualidades organolépticas se pueden evaluar usando procedimientos bien establecidos en la industria de la panadería, y pueden incluir, por ejemplo, el uso de un jurado

de degustadores entrenados.

La expresión "mejora de la resistencia de la masa" se define en el presente documento como la propiedad de una masa que tiene generalmente más propiedades elásticas y/o requiere más trabajo para moldear y dar forma.

La expresión "mejora de la elasticidad de la masa" se define en el presente documento como la propiedad de una masa que tiene una mayor tendencia a recobrar a su forma original después de someterse a cierta tensión física.

La expresión "mejora de la estabilidad de la masa" se define en el presente documento como la propiedad de una masa que es menos susceptible a formar defectos como consecuencia del abuso mecánico manteniendo mejor de ese modo su forma y volumen y se evalúa como la proporción peso:ancho de una sección transversal de una barra después de una prueba normal y/o prolongada.

La expresión "reducción de la adherencia de la masa" se define en el presente documento como la propiedad de una masa que tiene menos tendencia a adherirse a superficies, por ejemplo, a la maquinaria de producción de masa, y se evalúa empíricamente mediante un panadero ensayador cualificado o se mide mediante el uso de un analizador de textura (por ejemplo, un TAXT Plus) como se conoce en la técnica.

La expresión "mejora de la extensibilidad de la masa" se define en el presente documento como la propiedad de una masa que se puede someter a un aumento de tensión o estiramiento sin ruptura.

La expresión "mejora de la mecanización de la masa" se define en el presente documento como la propiedad de una masa que es generalmente menos pegajosa y/o más firme y/o más elástica. En consecuencia, se producen menos fallos en el equipo de la planta y se reduce la necesidad de limpieza.

La expresión "aumento del volumen del producto horneado" se mide preferentemente como el volumen de una barra de pan dada determinado mediante un analizador automatizado de volumen de pan (por ejemplo, BVM-3, TexVol Instruments AB, Viken, Suecia), usando detección por ultrasonidos o láser como se conoce en la técnica. En el caso de que aumente el volumen, la propiedad mejora. Alternativamente, el peso del producto horneado después del horneado en un recipiente del mismo tamaño es un indicativo del volumen del producto horneado. En el caso de que el peso del producto horneado aumente, el volumen del producto horneado aumenta.

La expresión "reducción de la formación de burbujas del producto horneado" se define en el presente documento como una reducción determinada visualmente de la formación de burbujas en la corteza del producto horneado

La expresión "mejora de la estructura de la corteza del producto horneado" se define en el presente documento como la propiedad de un producto horneado con paredes de celdas más finas y/o celdas más delgadas en la corteza y/o distribución más uniforme/homogénea de las celdas en la corteza y se evalúa habitualmente de forma visual por el panadero o mediante análisis de imágenes digital como se conoce en la técnica (por ejemplo, C-cell, Calibre Control International Ltd, Appleton, Warrington, UK).

La expresión "mejora de la blandura del producto horneado" es lo contrario de "dureza" y se define en el presente documento como la propiedad de un producto horneado que se comprime con mayor facilidad y se evalúa empíricamente mediante un panadero ensayador cualificado o se mide mediante el uso de un analizador de textura (por ejemplo, TAXT Plus) como se conoce en la técnica.

La expresión "mejora del aroma del producto horneado" se evalúa mediante un jurado de ensayadores entrenados.

La expresión "mejora de antirancidez del producto horneado" se define en el presente documento como las propiedades de un producto horneado que tienen una velocidad reducida de degradación de los parámetros de calidad, por ejemplo reducción de la dureza después de almacenamiento y/o disminución de la pérdida de resiliencia después de almacenamiento.

Las propiedades de antirancidez se pueden demostrar por una reducción de la dureza después de almacenamiento del producto horneado. La alfa-amilasa de acuerdo con la invención puede dar como resultado una reducción de dureza, por ejemplo en un producto horneado que se comprime con mayor facilidad. La dureza del producto horneado se puede evaluar empíricamente mediante el panadero ensayador cualificado o medir mediante el uso de un analizador de textura (por ejemplo, TAXT Plus) como se conoce en la técnica. La dureza medida dentro de 24 horas después del horneado se denomina dureza inicial. La dureza medida 24 horas o más después del horneado se denomina dureza después de almacenamiento, y también es una medida para determinar la vida en anaquel. En el caso de que se reduzca la dureza inicial, mejora. En el caso de que se reduzca la dureza después de almacenamiento, mejora. Preferentemente, la dureza se mide como se describe en el ejemplo 9 en el presente documento.

La resiliencia del producto horneado se mide preferentemente mediante el uso de un analizador de textura (por ejemplo, TAXT Plus) como se conoce en la técnica.

La resiliencia medida dentro de 24 horas después del horneado se denomina resiliencia inicial. La resiliencia medida 24 horas o más después del horneado se denomina resiliencia después de almacenamiento, y también es una medida para determinar la vida en anaquel. Un producto horneado fresco proporciona por lo general una corteza de una elevada resiliencia inicial pero la resiliencia se pierde durante la vida en anaquel. La mejora de las propiedades de antirancidez se puede demostrar mediante una reducción de la pérdida de resiliencia durante el almacenamiento. Preferentemente, la resiliencia se mide como se describe en el ejemplo 9 en el presente documento.

La expresión "mejora del carácter crujiente" se define en el presente documento como la propiedad de un producto horneado para proporcionar una sensación más crujiente que un producto de referencia que se conoce en la técnica, así como para mantener esta percepción más crujiente durante un período de tiempo mayor que un producto de referencia. Esta propiedad se puede cuantificar midiendo una curva de fuerza frente a distancia a una velocidad fija en un experimento de compresión usando, por ejemplo, un analizador de textura TA-XT Plus (Stable Micro Systems Ltd, Surrey, UK), y obteniendo los parámetros físicos a partir de esta curva de compresión, respectivamente (i) fuerza del primer pico, (ii) distancia del primer pico, (iii) pendiente inicial, (iv) fuerza del mayor pico, (v) área bajo la gráfica y (vi) cantidad de sucesos de fractura (la fuerza cae más que un cierto valor preestablecido). Los indicativos de la mejora del carácter crujiente son una mayor fuerza del primer pico, una menor distancia del primer pico, una mayor pendiente inicial, una mayor fuerza del mayor pico, mayor área bajo la gráfica y un mayor número de sucesos de fractura. Un producto más crujiente puntuaría estadísticamente considerablemente mejor en al menos dos de estos parámetros en comparación con un producto de referencia. En la técnica, "carácter crujiente" también se denomina característica crujiente, capacidad crocante o capacidad crepitante, que significa un material con un comportamiento de fractura crujiente, crocante o crepitante.

La presente invención puede proporcionar una masa que tiene al menos una de las propiedades mejoradas seleccionadas entre el grupo que consiste en aumento de resistencia, aumento de elasticidad, aumento de estabilidad, reducción de adherencia y/o mejora de la extensibilidad de la masa.

La invención también puede proporcionar un producto horneado que tiene un aumento de volumen de la barra. La invención puede proporcionar también un producto horneado que tiene al menos una propiedad mejorada seleccionada entre el grupo que consiste en aumento de volumen, mejora del aroma, mejora de la estructura de la corteza, mejora de la blandura de la corteza, mejora del carácter crujiente, reducción de la formación de burbujas y/o mejora de la antirancidez.

La alfa-amilasa de acuerdo con la invención se puede usar para retrasar la rancidez de un producto horneado tal como pan y pasteles. El retraso de la rancidez se puede indicar mediante una reducción de la dureza, en particular una reducción de la dureza después de almacenamiento en comparación con un producto horneado, incluyendo pan y pasteles, que se produce sin la alfa-amilasa de acuerdo con la invención.

La alfa-amilasa de acuerdo con la invención tiene una termoestabilidad intermedia en comparación con otras alfa-amilasas usadas en la industria. La alfa-amilasa de la invención tiene mayor estabilidad frente a la temperatura que una alfa-amilasa fúngica o una alfa amilasa de harina de cereal. Por otra parte, tiene una menor termoestabilidad a alta temperatura, en particular una menor termoestabilidad en la temperatura de inactivación de la alfa-amilasa durante el horneado, que otras amilasas usadas en la industria, tales como alfa-amilasa bacteriana.

La alfa amilasa de acuerdo con la invención tiene una menor termoestabilidad a alta temperatura, preferentemente a una temperatura superior a 70 °C, preferentemente superior a 75 °C, preferentemente superior a 78 °C, preferentemente superior a 80 °C, preferentemente superior a 82 °C, preferentemente superior a 85 °C, en comparación con alfa-amilasas conocidas según se mide usando un método que se describe en el ejemplo 8 del presente documento. Preferentemente, la termoestabilidad se evalúa como sigue a continuación: se preincuban 25 MU/ml de solución de enzima purificada en un tampón que contiene acetato sódico 50 mM de pH 5,0, CaCl₂ 1 mM y 1 g/l de BSA en un tubo Eppendorf durante 30 minutos a diversas temperaturas (40 °C a 86 °C). La actividad enzimática residual se determina usando el ensayo de MU que se describe en el presente documento en los ejemplos con el título "Determinación de la actividad enzimática", "2) Ensayo de Maltotriosa (ensayo de MU)".

La enzima alfa-amilasa de acuerdo con la invención se activa preferentemente durante el horneado y se inactiva preferentemente antes del final del horneado.

Los beneficios de la alfa-amilasa de acuerdo con invención que tiene una termoestabilidad intermedia y/o una menor termoestabilidad a alta temperatura, pueden incluir, sin limitación, uno o más de los siguientes.

Un enzima que tiene menor termoestabilidad a alta temperatura puede dar como resultado un aumento del nivel de desnaturalización de la enzima durante el proceso de horneado. Esto puede dar como resultado una inactivación más completa de la actividad enzimática y de ese modo impartir mayor control de la función enzimática en el proceso de horneado.

Se ha observado que los productos horneados pequeños y grandes tienen diferentes tasas de transferencia de calor, diferentes tiempos de horneado y en consecuencia diferentes tratamientos térmicos. La alfa-amilasa de

acuerdo con invención puede ser beneficiosa para productos horneados que experimentan menos tratamiento térmico como consecuencia de una reducción del tiempo y/o la temperatura de horneado.

Se ha observado que el pan horneado a mayores altitudes tales como altitudes superiores a 2000 m (por ejemplo, Ciudad de México a 2240 m de altitud) puede experimentar dificultades en conseguir temperaturas de corteza eficaces para inactivar enzimas termoestables. Sin el deseo de quedar unidos a teoría alguna, se piensa que esto es debido a que el agua hierve a una temperatura inferior debido a la presión atmosférica inferior, y esto dicta la máxima temperatura alcanzada en el centro de un producto horneado. Una temperatura máxima inferior en el centro del producto horneado puede hacer más difícil inactivar (completamente) la enzima. Una alfa-amilasa que tiene menor termoestabilidad a alta temperatura podría suponer una ventaja en tales ubicaciones, tales como Ciudad de México, por ejemplo.

Las panaderías industriales se encuentran bajo una presión en aumento para reducir los tiempos de horneado y las temperaturas de horno - a menudo por debajo de 20 minutos, tanto por un beneficio de coste como por razones de sostenibilidad. Una enzima más lábil térmicamente puede ser más adecuada para un tiempo de horneado más corto en el que la enzima se desnaturaliza con mayor eficacia al final del proceso de horneado. El pan parcialmente horneado recibe un tiempo de horneado más corto - por ejemplo, habitualmente un proceso de horneado un 20 % más corto y/o una temperatura de horno 10 °C inferior que los equivalentes completamente horneados, y por lo tanto también se puede esperar que se beneficie de una enzima que tenga una menor termoestabilidad a altas temperaturas.

La enzima alfa-amilasa de la presente invención y/o las enzimas adicionales que se usan en los métodos de la presente invención pueden estar en cualquier forma adecuada para el uso en cuestión, por ejemplo en forma de un polvo seco, polvo aglomerado o granulado, en particular un granulado no pulverulento, líquido, en particular un líquido estabilizado, o enzima protegida tal como se describe en los documentos de Patente WO01/11974 y WO02/26044. Una forma líquida incluye sin limitación una emulsión, una suspensión y una solución. Los granulados y los polvos aglomerados se pueden preparar mediante métodos convencionales, por ejemplo por pulverización de la enzima alfa-amilasa de acuerdo con la invención sobre un vehículo en un granulador de lecho fluido. El vehículo puede consistir en núcleos de partículas que tienen un tamaño de partícula adecuado. El vehículo puede ser soluble o insoluble, y algunos vehículos adecuados incluyen una sal (tal como NaCl o sulfato sódico), alcohol azúcar (tal como sorbitol), almidón, harina de arroz, harina de trigo, sémola de maíz, maltodextrinas o soja.

Tal granulado o polvo aglomerado, que comprende el polipéptido de la presente invención se puede denominar aditivo de horneado. El aditivo de horneado tiene preferentemente una distribución de tamaño de partícula estrecha con más de un 95 % (en peso) de las partículas en el intervalo de 25 a 500 µm.

La enzima amilolítica de acuerdo con la invención y las enzimas adicionales pueden estar contenidas en formulaciones de liberación lenta. Los métodos para preparar formulaciones de liberación lenta se conocen bien en la técnica. La adición de estabilizantes nutricionalmente aceptables tales como azúcar, alcohol azúcar, u otro poliol, y/o ácido láctico u otro ácido orgánico de acuerdo con métodos establecidos puede, por ejemplo, estabilizar las preparaciones líquidas de enzima.

Preferentemente, la enzima de acuerdo con la invención se proporciona en una forma seca, para permitir una fácil manipulación del producto. Independientemente de la formulación de la enzima, la formulación puede comprender uno o más aditivos. Algunos ejemplos de aditivos adecuados incluyen oxidantes (incluyendo ácido ascórbico, bromato y Azodicarbonamida (ADA)), agentes reductores (incluyendo L-cisteína), emulgentes (incluyendo mono/diglicéridos tales como monoestearato de glicerol (GMS), estearoil lactilato sódico (SSL), estearoil lactilato de calcio (CSL), ésteres de poliglicerol de ácidos grasos (PGE) y DATEM), gomas (incluyendo goma de guar y goma de xantano), aromas, ácidos (incluyendo ácido cítrico, ácido propiónico), almidón, almidón modificado, gluten, humectantes (incluyendo glicerol) y conservantes.

La enzima alfa-amilasa de acuerdo con la invención también se puede incorporar en composiciones que comprenden levadura tales como las que se desvelan en los documentos de Patente EP-A-0619947, EP-A-0659344 y WO02/49441.

Para inclusión en una premezcla de harina es ventajoso que el polipéptido (aislado) de acuerdo con la invención esté en la forma de un producto seco, por ejemplo, un gránulo no pulverulento, mientras que para la inclusión junto con un líquido está ventajosamente en una forma líquida.

También se pueden incorporar una o más enzimas adicionales a la masa. Por lo tanto, la invención proporciona una composición de enzima que comprende la enzima alfa-amilasa de acuerdo con la invención y una o más enzimas adicionales. La composición de enzima puede ser una composición de enzima para horneado. Esta composición de enzima se puede usar en productos de masa y productos horneados obtenidos a partir de tal masa. Por ejemplo, se puede usar en productos de masa que contienen además huevos y en productos horneados, tal como *brioche* y *panettone*, tanto normales como con una cantidad reducida de huevos. La enzima adicional puede ser de cualquier origen, incluyendo mamíferos y plantas, y preferentemente de origen microbiano (bacteriano, de levadura o fúngico)

y se puede obtener mediante técnicas convencionales usadas en la técnica.

En una realización, la enzima adicional puede ser una amilasa, incluyendo una alfa-amilasa adicional, tal como una alfa-amilasa fúngica (que puede ser útil para proporcionar azúcares fermentables por levadura y retrasar la rancidez), beta-amilasa, una ciclodextrina glucanotransferasa, una proteasa, una peptidasa, en particular, una exopeptidasa (que puede ser útil en la potenciación de la harina), transglutaminasa, triacilglicerol lipasa (que puede ser útil para la modificación de los lípidos presentes en la masa o en los constituyentes de la masa de modo que ablande la masa), galactolipasa, fosfolipasa, celulasa, hemicelulasa, en particular una pentosanasa tal como xilanasa (que puede ser útil para la hidrólisis parcial de pentosanos, más específicamente arabinoxilano, que aumenta la extensibilidad de la masa), proteasa (que puede ser útil para la debilitación del gluten en particular cuando se usa la harina de trigo dura), proteína disulfuro isomerasa, por ejemplo, una proteína disulfuro isomerasa que se desvela el documento de Patente WO 95/00636, glicosiltransferasa, peroxidasa (que puede ser útil para mejorar la consistencia de la masa), lacasa, u oxidasa, hexosa oxidasa, por ejemplo, una glucosa oxidasa, aldosa oxidasa, piranosa oxidasa, lipoxigenasa o L-aminoácido oxidasa (que puede ser útil para mejorar la consistencia de la masa) o una proteasa.

La triacilglicerol lipasa puede ser una lipasa fúngica, preferentemente de *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium*, *Thermomyces*, o *Rhizomucor*. Se usa más preferentemente una triacilglicerol lipasa de *Rhizopus*, más preferentemente de *Rhizopus oryzae*. Opcionalmente se puede usar una combinación de dos o más triacilglicerol lipasas.

La celulosa puede provenir de *A. niger* o de *Trichoderma reesei*.

La amiloglucosidasa, puede ser una amiloglucosidasa de *Aspergillus* tal como de *A. oryzae* o *A. niger*, más preferentemente de *A. niger*.

En una realización la enzima adicional es una enzima lipolítica, preferentemente una fosfolipasa o una enzima que tiene actividad tanto de galactolipasa como de fosfolipasa.

Tales lipasas se conocen por ser activas sobre los lípidos endógenos de trigo y sobre fuentes de lípidos externas, por ejemplo como se proporciona mediante grasa de reducción añadida o de lecitinas. Preferentemente, la lipasa escinde lípidos polares y tiene actividad de fosfolipasa, actividad de galactolipasa o, lo más preferentemente, una combinación de actividad de fosfolipasa y galactolipasa para crear lisofosfolípidos, tales como lisofosfatidil colina, y lisogalactolípidos tales como digalactosilmonoglicérido. La especificidad de la lipasa se puede mostrar mediante un ensayo *in vitro* que haga uso de un sustrato apropiado, por ejemplo triacilglicerol lípido, fosfatidilcolina y digalactosildiglicérido, o más preferentemente mediante un análisis de los productos de reacción que se generan en la masa durante la mezcla y la fermentación.

Panamore[®], Lipopan[®] F, Lipopan[®] 50 y Lipopan[®] S se comercializan para estandarizar la actividad lipolítica, que usan una medida de DLU para Panamore[®] a partir de DSM y una medida de LU para la familia Lipopan[®] a partir de Novozimas. DLU se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 micromol/min de p-nitrofenol a partir de palmitato de p-nitrofenilo a pH 8,5 a 37 °C, mientras que LU se define como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 micromol/min de ácido butírico a partir de tributirina a pH 7 a 30 °C. Las lipasas se usan de forma óptima con la alfa-amilasa de la invención a 2-850 DLU/kg de harina o a 50-23500 LU/kg de harina.

En una realización de la composición de enzima de acuerdo con la invención la enzima adicional es Panamore[®] como se describe en el documento de Patente WO2009/106575.

En una realización de la composición de enzima de la invención la enzima adicional es una enzima como se describe en el documento de Patente WO9826057.

En un aspecto de la composición de enzima de acuerdo con la invención la enzima adicional es una enzima como se describe en el documento de Patente US RE38.507.

En un aspecto de la composición de enzima de acuerdo con la invención la enzima adicional es una enzima como se describe en el documento de Patente WO 9943794, en particular en el documento de Patente EP1058724B1.

Si se van a añadir una o más actividades enzimáticas adicionales de acuerdo con los métodos de la presente invención, estas actividades se pueden añadir por separado o junto con el polipéptido de acuerdo con la invención, por ejemplo como la composición de enzima de acuerdo con la invención, que incluye una composición de mejora del pan y/o una composición de mejora de la masa. Las demás actividades enzimáticas pueden ser cualquiera de las enzimas descritas anteriormente y se pueden clasificar de acuerdo con las prácticas de panaderías establecidas.

Preferentemente, la composición de enzima de acuerdo con la invención se proporciona en forma seca, para permitir una fácil adición a la masa, los ingredientes de la masa, pero también son posibles formas líquidas. Una forma líquida incluye sin limitación una emulsión, una suspensión y una solución. Independientemente de la formulación de

la composición de enzima, se puede aplicar cualquier aditivo o aditivos conocidos por ser útiles en la técnica para mejorar y/o mantener la actividad de la enzima, la calidad de la masa y/o el producto horneado. Algunos ejemplos de aditivos adecuados incluyen oxidantes (incluyendo ácido ascórbico, bromato y Azodicarbonamida (ADA)), agentes reductores (incluyendo L-cisteína), emulgentes (incluyendo mono/diglicéridos tales como monoestearato de glicerol (GMS), estearoil lactilato sódico (SSL), estearoil lactilato de calcio (CSL), ésteres de poliglicerol de ácidos grasos (PGE) y DATEM), gomas (incluyendo goma de guar y goma de xantano), aromas, ácidos (incluyendo ácido cítrico, ácido propiónico), almidón, almidón modificado, gluten, humectantes (incluyendo glicerol) y conservantes.

La alfa-amilasa de acuerdo con la invención se puede incorporar en una premezcla, por ejemplo en forma de una composición de harina, para masa y/o productos horneados preparados a partir de masa, en la que la premezcla comprende un polipéptido de la presente invención. El término "premezcla" se define en el presente documento para que se entienda en su significado convencional, es decir, como una mezcla de agentes de horneado, que incluye generalmente harina, que se puede usar no solo en plantas/instalaciones de horneado de pan industriales, sino también en panaderías de minoristas. La premezcla se puede preparar por mezcla de la alfa-amilasa de acuerdo con la invención o la composición de enzima de acuerdo con la invención con un vehículo adecuado tal como harina, almidón o una sal. La premezcla puede contener aditivos como se ha mencionado anteriormente.

En otro aspecto, la enzima alfa-amilasa de acuerdo con la invención se puede usar en la producción de pasteles y en la producción de una mezcla para rebozar a partir de la cual se puede preparar un pastel.

La enzima alfa-amilasa de acuerdo con la invención se puede usar en la preparación de una amplia diversidad de pasteles, incluyendo pasteles reducidos, tales como, por ejemplo, bizcocho de libra y galletas de mantequilla, e incluyendo pasteles espumosos, tales como, por ejemplo, merengue, bizcocho, galletas, *roulade*, genovesa, y pastel chifón. El bizcocho es un tipo de pastel blando basado en harina de trigo, azúcar, polvo de horneado y huevos (y opcionalmente polvo de horneado). La única grasa presente proviene de la yema de huevo, que a veces se añade por separado de la clara. A menudo se usan como base para otros tipos de pasteles y postres. Un bizcocho de libra se prepara tradicionalmente a partir de una libra de cada uno de harina, mantequilla, huevos, y azúcar, opcionalmente complementado con polvo de horneado. En el pastel chifón se reemplaza la mantequilla/margarina por aceite. El contenido de azúcar y yema de huevo disminuye en comparación con el pastel de libra y el bizcocho y el contenido de clara de huevo aumenta.

Un método para preparar una mezcla para rebozar comprende preferentemente las etapas de:

- a. preparar la masa para rebozar del pastel por adición de al menos:
 - i. azúcar;
 - ii. harina;
 - iii. la enzima alfa-amilasa de acuerdo con la invención;
 - iv. al menos un huevo; y
 - v. opcionalmente una fosfolipasa.

Un método para preparar un pastel de acuerdo con la invención comprende además la etapa de

- b. hornear la mezcla para rebozar para producir un pastel.

Los expertos en la materia conocen la forma de preparar una mezcla para rebozar o un pastel partiendo de ingredientes de masa. Opcionalmente pueden estar presentes uno o más ingredientes distintos en la composición, por ejemplo, para permitir la reducción de huevos y/o grasa en el pastel, tales como hidrocoloides, extracto de levadura, calcio.

Las aplicaciones industriales mencionadas anteriormente de la enzima alfa-amilasa de acuerdo con la invención comprenden solo unos pocos ejemplos y este listado no pretende ser restrictivo.

Otros usos de la alfa-amilasa de acuerdo con la invención pueden incluir:

- la producción de jarabes de glucosa, fructosa y maltosa;
- la producción de hidrolizados de almidón tales como maltodextrinas;
- la producción de almidones modificados;
- la modificación de componentes de almidón en alimentación animal; y/o
- el reemplazo de la malta en la elaboración de cerveza.

Ejemplos

Determinación de la actividad enzimática

1) Método AACC 22-02.01

Medida de alfa-amilasa en planta y materiales microbianos que usan el método Ceralpha®

La actividad de alfa-amilasa se cuantificó por medida de la actividad usando el kit de ensayo de alfa-amilasa CERALPHA de Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd., Co. Wicklow, Irlanda) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 2) Ensayo de Maltotriosa (ensayo de MU)

Una Unidad de Maltotriosa (MU) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de glucosa por minuto usando sustrato de maltotriosa en las siguientes condiciones de ensayo. La actividad enzimática se determinó a 37 °C y pH 5,0 usando maltotriosa como sustrato. La hidrólisis enzimática de la maltotriosa da como resultado la liberación cuantitativa de glucosa, que es una medida de la actividad enzimática. Las concentraciones de ensayos finales son: 8 mg/ml de maltotriosa, de 0,007 a 0,02 MU/ml de DSM-AM madura, tampón citrato 20 mM, 0,2 mg/ml de BSA, NaCl 2 mM. La reacción se detuvo después de 30 minutos (adición de NaOH 0,33 M en una proporción 1:10) y la glucosa liberada se convirtió en gluconato-6-P en dos etapas durante las cuales se forma NADH, usando un kit de Glucosa Hexoquinasa FS (Diagn. Syst). Los aumentos de absorbancia resultantes a una longitud de onda de 340 nm fueron una medida para la cantidad de glucosa liberada durante la incubación de 30 minutos. La actividad se calculó usando una línea de calibración de glucosa.

Ejemplo 1

20 Producción de la alfa-amilasa de la invención

Clonación y preparación de la enzima

Como se describe con mayor detalle posteriormente, se coronó el gen de alfa-amilasa y se expresó en *B. subtilis* de la siguiente forma.

Cepas y plásmidos

La cepa BS154 de *Bacillus subtilis* (CBS 363,94) (ΔaprE , ΔnprE , amyE^- , spo^-) se describe en Quax y Broekhuizen 1994 Appl Microbiol Biotechnol. 41: 425-431.

El vector transportador pBHA12 de *E. coli/B. subtilis* se describe en el documento de Patente WO2008/000632. Se describe NCIMB14276 de *Alicyclobacillus pohliae* por Imperio *et al.* (Int. J. Syst. Evol. Microbiol 58:221-225, 2008).

Se describe *Bacillus stearothermophilus* C599 (NCIMB11873) en el documento de Patente WO91/04669.

Técnicas de biología molecular

Se llevaron a cabo técnicas de biología molecular conocidas por los expertos en la materia (véase: Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3ª Ed., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001). Se llevó a cabo la reacción en cadena de polimerasa (PCR) en una termocicladora con ADN polimerasa Phusion High-Fidelity (Finnzymes OY, Aspmo, Finlandia) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Actividad de amilasa

Se cuantificó la actividad de alfa-amilasa en el caldo de los cultivos de *B. subtilis* como se ha descrito anteriormente de acuerdo con el método AACC 22-02.01.

Secuenciación del genoma de *Alicyclobacillus pohliae*

El genoma de NCIMB14276 de *Alicyclobacillus pohliae* se secuenció mediante BaseClear (Leiden, Países Bajos). El ADN se fragmentó (rompió) y se ligaron adaptadores de ADN a ambos extremos de los fragmentos de ADN. Se obtuvieron dos conjuntos de lecturas de secuencia Illumina GALLx. Un conjunto consistió en lecturas de extremos emparejados, que abarcaron una distancia de aproximadamente 250 (+/- 125) nucleótidos. El segundo conjunto consistió en lecturas de parejas de compañeros, que abarcaron una distancia de aproximadamente 4200 nucleótidos (+/- 2100). En todas las lecturas de secuencia de Illumina GALLx se aplicó un filtrado de calidad basándose en las puntuaciones de calidad Phred. Además, se recortaron los nucleótidos ambiguos y de baja calidad de las lecturas restantes. Se usaron las lecturas de extremos emparejados y parejas de compañeros para el montaje desde el inicio en CLC Genomics Workbench versión 4.6.1 o 4.7 (CLC bio, Aarhus, Dinamarca). De ese modo, se obtuvo un conjunto de *contigs* (secuencias contiguas) preensambladas. Los *contigs* se dispusieron además (andamiaje) usando SSPACE descrito por Boetzer *et al.* (Bioinformatics 27:578-579, 2011). El análisis de la secuencia reveló que el genoma de NCIMB14276 de *Alicyclobacillus pohliae* contiene un gen que codifica una enzima alfa-amilasa denominada DSM-AM en el presente documento con la secuencia de nucleótidos que se expone en SEC ID N°: 1, véase también la Figura 3.

La correspondiente proteína DSM-AM codificada por SEC ID N°: 1 tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEC ID N°: 2, véase también la Figura 4.

La secuencia de nucleótidos del gen de DSM-AM optimizado por codón se expone en SEC ID N°: 3, véase también la Figura 5.

Ejemplo 2

Expresión del gen de DSM-AM de *A. pohliae* en *Bacillus subtilis*

Se introdujeron un terminador *amyQ* y un sitio de restricción *PmeI* en el vector pBHA12 por digestión de pBHA12 con *SphI* y *HindIII* y clonación de la siguiente secuencia de ADN

5'-GCATGCGTTTAAACAAAAACACCTCCAAGCTGAGTGCGGGTATCAGCTTGGAGGTGC
GTTTATTTTTTCAGCCGTATGACAAGGTCGGCATCAGAAGCTT-3' (los sitios de restricción 5'*SphI* y 3'*HindIII* están subrayados).

El fragmento se clonó en pBHA12 lo que dio como resultado el vector pGBB09 (Figura 1).

El gen de DSM-AM se sintetizó en GeneArt (Alemania) y se añadió en el extremo 5' el sitio de restricción *PacI* y se añadió en el extremo 3' el sitio de restricción *PmeI*. El gen de DSM-AM se clonó en el vector pGBB09 digerido con *PacI* y *PmeI* lo que dio como resultado el vector pGBB09DSM-AM1 (Fig. 2). Este vector se transformó en la cepa BS154 de *B. subtilis*. La secuencia del plásmido se confirmó por secuenciación de ADN. La cepa BS154 de *B. subtilis* que contenía pGBB09DSM-AM1 se denominó DSM-AMB154-1.

Ejemplo 3

Expresión de DSM-AM con *B. subtilis* en frascos de agitación

Las cepas DSM-AMB154-1 y BS154 de *B. subtilis* se cultivaron en un frasco de agitación. Estos frascos de agitación contenían 20 ml de medio 2xTY compuesto por triptona Bacto al 1,6 % (p/v), extracto de levadura al 1 % (p/v) y NaCl al 0,5 % (p/v). Los cultivos se agitaron vigorosamente a 37 °C y 250 rpm durante 16 horas y se usaron 0,2 ml de medio de cultivo para inocular 20 ml de medio SMM. El premedio SMM contiene extracto de levadura al 1,25 % (p/p), CaCl₂ 0,05 % (p/p), MgCl₂·6 H₂O al 0,075 % (p/p), 15 µg/l de MnSO₄·4H₂O, 10 µg/l de CoCl₂·6H₂O, ácido cítrico al 0,05 % (p/p), y antiespumante 86/013 al 0,025 % (p/p) (Basildon Chemicals, Abingdon, UK). Para completar el medio SMM, se añadieron 20 ml de maltosa al 5 % (p/v) y 20 ml de una solución de reserva de tampón fosfato sódico 200 mM (pH 6,8), ambas preparadas y esterilizadas por separado, a 60 ml del premedio SMM. Estos cultivos se incubaron durante 48 horas a 37 °C y 250 rpm. Los sobrenadantes se recogieron y se analizaron para la productividad enzimática. La actividad de alfa-amilasa de la cepa DSM-AMB154-1 se midió de acuerdo con el Método AACC 22-02.01 como se ha descrito anteriormente. El sobrenadante de DSM-AMB154-1 contenía actividad de alfa-amilasa mientras que la cepa progenitora BS154 no.

Ejemplo 4

Preparación de enzima

Se cultivó la cepa DSM-AMB154-1 de *Bacillus* en condiciones aerobias en un medio de fermentación adecuado.

La enzima se creó al medio. El caldo de cultivo resultante se filtró para retirar las células bacterianas, los residuos de estas células y otros sólidos. El filtrado contenía la enzima obtenida de ese modo, que a continuación se concentró por ultrafiltración para proporcionar un concentrado que contenía DSM-AM madura.

Ejemplo 5

Purificación de la enzima

La purificación se llevó a cabo usando las siguientes etapas. El caldo de fermentación concentrado obtenido en el ejemplo 4 que contenía DSM-AM madura se mezcló con tampón HEPES 50 mM de pH 7,5 que contenía 400 mg/ml de (NH₄)₂SO₄ (proporción 1:1). La solución se agitó durante una noche a 4 °C, y a continuación se centrifugó a 3220 rcf, a 4 °C durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en tampón Tris 25 mM de pH 7,5, y se filtró a través de un filtro de 0,45 µm. La conductividad de la solución se ajustó a 2 ms/cm por adición de agua MilliQ, y a continuación por ajuste de pH a pH = 7,5. La solución se concentró mediante un Concentrador de 20 ml Vivaspin (Sartorius Stedim) hasta 10.000 MWCO, a 3220 rcf, a 4 °C durante 15 min. La solución se aplicó a una columna de Q-Sefarosa equilibrada con tampón HEPES 25 mM de pH 7,5. La proteína se recogió por flujo continuo. El flujo continuo se aplicó nuevamente a una columna de Q-Sefarosa equilibrada con HEPES 25 mM de pH 9,5. La proteína se eluyó con un gradiente de NaCl 0-1 M. La enzima DSM-AM madura purificada se desaló mediante una columna de

desalación PD-10 (GE Healthcare) usando tampón Tris 25 mM de pH 7,5.

Determinación de proteína

- 5 La concentración de proteína de la enzima DSM-AM madura purificada que se obtuvo en el ejemplo 5 se determinó mediante el kit de ensayo de proteína BCA™ (Pierce) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con la siguiente condición: la proporción de la muestra con respecto al reactivo WR fue 1:12, y la absorbancia de la mezcla se determinó a una longitud de onda de 540 nm.

Ejemplo 6

Propiedades de la enzima

- 15 Se sometió a ensayo la dependencia de la actividad enzimática de la DSM-AM madura que se obtuvo en el ejemplo 5 con el pH mediante el ensayo de MU descrito anteriormente usando una mezcla de reacción en la cual el pH se ajustó a diferentes valores (pH 4,0, 4,3, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5). Se tomaron dos medidas con dos concentraciones enzimáticas finales, 0,01 y 0,018 MU/ml. Los resultados se describieron como actividad relativa. Se descubrió que el pH óptimo para la DSM-AM madura era un pH de 5,0. Las actividades medidas en los demás valores de pH indicados se muestran en la siguiente tabla. Los valores corresponden a un valor medio de ambas medidas a diferentes concentraciones de enzima.

Tabla 6.1

pH	4,0	4,3	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
Actividad relativa	68 %	76 %	100 %	87 %	71 %	40 %	21 %	8 %

- 25 La dependencia de la actividad enzimática de la DSM-AM madura con la temperatura se terminó usando el ensayo de MU descrito anteriormente con temperaturas de reacción ajustadas a 40 °C, 50 °C, 60 °C, 65 °C, 70 °C, 75 °C, 80 °C y 90 °C. La DSM-AM madura fue más activa a 60-75 °C y la enzima perdió aproximadamente un 90 % de su actividad cuando la temperatura fue superior a 90 °C.

Ejemplo 7

Actividad de alfa-amilasa

- 35 La actividad de alfa-amilasa de la DSM-AM madura que se obtuvo en el ejemplo 5 se cuantificó por medición de la actividad usando un kit de ensayo de alfa-amilasa CERALPHA de Megazyme (Megazyme International Ireland Ltd., Co. Wicklow, Irlanda) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tabla 7.1

Muestra	Actividad	Actividad en ensayo Ceralpha @ 40 °C	Actividad en ensayo Ceralpha @ 60 °C
DSM-AM madura	1095 MU/ml	124 U/ml	191 U/ml
Control de harina de malta	Estimado 1,9 U/ml	2,8 U/ml	
	Estimado 36 U/ml		43 U/ml

Ejemplo 8

Termoestabilidad de DSM-AM madura

- 45 Para evaluar la termoestabilidad de la DSM-AM madura, que se obtuvo en el ejemplo 5, se preincubaron 25 MU/ml de solución de enzima purificada en un tampón que contenía acetato sódico 50 mM de pH 5,0, CaCl₂ 1 mM y 1 g/l de BSA en un tubo Eppendorf durante 30 minutos a diversas temperaturas (40 °C a 86 °C). La actividad enzimática residual se terminó usando el ensayo de MU descrito anteriormente. Con fines comparativos, se incluyó Novamyl®. Los resultados se expresaron como porcentaje de la actividad de una muestra que se preincubó durante 30 minutos a 4 °C.

- 50 En el intervalo de temperatura de 40 °C a 75 °C se observaron actividades de alto nivel comparables (superiores al 90 %) para la DSM-AM madura y Novamyl® (no se muestran los datos). Las actividades enzimáticas residuales del intervalo de temperatura de 76 a 86 °C se indican posteriormente en la Tabla 8.1. Estos datos demuestran claramente que la DSM-AM madura y Novamyl® son comparativamente termoestables a temperaturas hasta aproximadamente 80 °C. Sin embargo, a temperaturas de aproximadamente 80 °C y superiores la actividad

enzimática residual de la DSM-AM madura es inferior que la de Novamyl®.

Tabla 8.1

Actividad enzimática							
Temperatura [°C]	4	76	78	80	82	84	86
DSM-AM madura	100 %	91 %	85 %	69 %	38 %	14 %	1 %
Novamyl®	100 %	87 %	82 %	72 %	54 %	31 %	10 %

5 Novamyl® se obtuvo en Novozymes, Dinamarca.

Para evaluar además la termoestabilidad de la DSM-AM madura, que se obtuvo en el ejemplo 5, se sometió a ensayo la actividad residual de 7,5 MU/ml de la DSM-AM madura en un tubo de vidrio en un tampón de acetato sódico 50 mM de pH 4,3, CaCl₂ 1 mM. Después de incubación a 80 °C durante 15 minutos, la actividad residual se determinó como se ha descrito anteriormente. La DSM-AM madura mostró una actividad residual de un 3 % mientras que Novamyl® mostró una actividad residual de un 13 % en las mismas condiciones. Los resultados se indican en la Tabla 8.2.

Tabla 8.2

Temperatura [°C]	Actividad residual	
	4	80
DSM-AM madura	100 %	3 %
Novamyl®	100 %	13 %

15 Novamyl® se obtuvo en Novozymes, Dinamarca.

Listado de secuencias

20 <110> DSM IP Assets B.V.

<120> ALFA-AMILASA

<130> 27892-EP-EPA

25 <160> 3

<170> PatentIn versión 3,5

30 <210> 1

< 211> 2160

< 212> ADN

< 213> *Alicyclobacillus pohliae*

35 <400> 1

```

atgaaaaaga aaacgctttc attattttgtg ggactgatgc tgctcctcgg tcttctgttc      60
agcgggttctc ttccgtacaa tccaaacgcc gctgaagcca gcagttccgc aagcgtcaaa      120
ggggacgtga tttaccagat tatcattgac cggttttacg atggggacac gacgaacaac      180
aatcctgcca aaagtatatg actttacgat cccaccaaat cgaagtggaa aatgtattgg      240
ggcgggggac tggagggggg tcgtcaaaaa cttccttata ttaaacagct gggcgtaacg      300
acgatctggt tgtccccggg tttggacaat ctggatacac ttgcaggtag cgataaact      360
ggctatcacg gatactggac gcgcgatttt aaacagattg aggaacattt cgggaattgg      420
accacatttg acacgttggt caatgatgct caccaaaacg gaatcaaggt gattgtcgac      480
tttgtgcccc atcattcaac tccttttaag gcaaacgatt ccacctttgc ggaaggcggc      540
gccctctacg acaacgggaa ctatatgggc aattattttg atgacgcaac aaaagggtac      600
tttcaccata atggggacat cagcaactgg gacgaccggg acgaggcgca atggaaaaac      660
ttcacgggac cagccgggtt ctgcgttgcc gatttgcgc aggaaaatgg cacgattgct      720
caatacctga ccgatgcggc ggttcaatta gtagcacatg gagcggatgg tttgcggatt      780
gatgcggtga agcattttta ttctgggttc tccaaatcgt tggctgataa actgtaccaa      840
aagaaaagaca ttttcctagt gggggaatgg tacggagatg accccgggagc agccaatcat      900
ttggaaaagg tccggtacgc caacaacagc ggtgtcaatg tgctggattt tgatctcaac      960
acggtgattc gaaatgtgtt cggtagattt acgcaaacga tgtacgatct taacaatatg     1020
gtgaacaaaa cggggaacga gtacaaatac aaagaaaatc taatcacatt tategataac     1080
catgatattg cgagatttct tacggtaaat tcgaacaagg cgaatttgca ccaggcgctt     1140
gctttcattc tcacttcgcg gggaaacgcc tccatctatt acggaaccga acaatacatg     1200
gcaggcgcca atgaccgcta caacaggggg atgatgccgg cgtttgatac gacaaccacc     1260
gccttttaag aggtgtcaac tctggcgggg ttgcgcagga acaatgcagc gatecagtag     1320
ggcaccacca ccaacggtg gatcaacaat gatgtttaca tttatgagcg gaaatttttc     1380
aacgatgtcg tattggtggc catcaatga aacacgcaat cctcctactc gatttcgggt     1440

ttgcagactg ccttgccaaa tggcaactat gcggattatc tgtcagggct gttggggggg     1500
aacgggattt ccgtttccaa tggaaagtgc gcttcgttca cgcttgccc tggagccgtg     1560
tctgtttggc agtacagcac atccgcttca gcgccgcaaa tcggatcggg tgcctcgaat     1620
atgggaattc cgggtaattg ggtcacgac gacgggaaa gttttggaac gacgcaggga     1680
accgtgacat ttggcggagt gacagcgact gtaaaatcct ggacatcaa ccggattgaa     1740
gtgtacgtgc ccaacatggc cgccggtctg accgatgaa aagtcaccgc ggggtggagt     1800
tccagcaatc tgtattctta caatattttg agtggaaacg agacatcggg tgtgtttact     1860
gtgaaaagtg ctccctcgac caacctgggg gataagattt acctgacggg caacataccg     1920
gaattgggaa attggagcac ggatacgagc ggagccgtta acaatgcgca agggccctg     1980
ctcgcgcccc attatccgga ttggttttat gtattcagcg ttccggcagg aaagacgatt     2040
caattcaagt ttttcatcaa gcgtgcggat ggaacgattc aatgggagaa tggttcgaac     2100
cacgtggcca caactccac ggggtgcaac ggtaacatca ctgtcacgtg gcaaaactag     2160

```

5 <210> 2
 <211> 719
 <212> PRT
 <213> *Alicyclobacillus pohliae*

10 <400> 2

ES 2 546 630 T3

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

ES 2 546 630 T3

Asp Phe Lys Gln Ile Glu Glu His Phe Gly Asn Trp Thr Thr Phe Asp
 130 135 140
 Thr Leu Val Asn Asp Ala His Gln Asn Gly Ile Lys Val Ile Val Asp
 145 150 155 160
 Phe Val Pro Asn His Ser Thr Pro Phe Lys Ala Asn Asp Ser Thr Phe
 165 170 175
 Ala Glu Gly Gly Ala Leu Tyr Asp Asn Gly Thr Tyr Met Gly Asn Tyr
 180 185 190
 Phe Asp Asp Ala Thr Lys Gly Tyr Phe His His Asn Gly Asp Ile Ser
 195 200 205
 Asn Trp Asp Asp Arg Tyr Glu Ala Gln Trp Lys Asn Phe Thr Asp Pro
 210 215 220
 Ala Gly Phe Ser Leu Ala Asp Leu Ser Gln Glu Asn Gly Thr Ile Ala
 225 230 235 240
 Gln Tyr Leu Thr Asp Ala Ala Val Gln Leu Val Ala His Gly Ala Asp
 245 250 255
 Gly Leu Arg Ile Asp Ala Val Lys His Phe Asn Ser Gly Phe Ser Lys
 260 265 270
 Ser Leu Ala Asp Lys Leu Tyr Gln Lys Lys Asp Ile Phe Leu Val Gly
 275 280 285
 Glu Trp Tyr Gly Asp Asp Pro Gly Ala Ala Asn His Leu Glu Lys Val
 290 295 300
 Arg Tyr Ala Asn Asn Ser Gly Val Asn Val Leu Asp Phe Asp Leu Asn
 305 310 315 320
 Thr Val Ile Arg Asn Val Phe Gly Thr Phe Thr Gln Thr Met Tyr Asp
 325 330 335
 Leu Asn Asn Met Val Asn Gln Thr Gly Asn Glu Tyr Lys Tyr Lys Glu
 340 345 350
 Asn Leu Ile Thr Phe Ile Asp Asn His Asp Met Ser Arg Phe Leu Thr
 355 360 365
 Val Asn Ser Asn Lys Ala Asn Leu His Gln Ala Leu Ala Phe Ile Leu
 370 375 380
 Thr Ser Arg Gly Thr Pro Ser Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Met

ES 2 546 630 T3

385		390		395		400
Ala Gly Gly Asn Asp Pro Tyr Asn Arg Gly Met Met Pro Ala Phe Asp						
		405		410		415
Thr Thr Thr Thr Ala Phe Lys Glu Val Ser Thr Leu Ala Gly Leu Arg						
		420		425		430
Arg Asn Asn Ala Ala Ile Gln Tyr Gly Thr Thr Thr Gln Arg Trp Ile						
		435		440		445
Asn Asn Asp Val Tyr Ile Tyr Glu Arg Lys Phe Phe Asn Asp Val Val						
		450		455		460
Leu Val Ala Ile Asn Arg Asn Thr Gln Ser Ser Tyr Ser Ile Ser Gly						
		465		470		475
Leu Gln Thr Ala Leu Pro Asn Gly Asn Tyr Ala Asp Tyr Leu Ser Gly						
		485		490		495
Leu Leu Gly Gly Asn Gly Ile Ser Val Ser Asn Gly Ser Val Ala Ser						
		500		505		510
Phe Thr Leu Ala Pro Gly Ala Val Ser Val Trp Gln Tyr Ser Thr Ser						
		515		520		525
Ala Ser Ala Pro Gln Ile Gly Ser Val Ala Pro Asn Met Gly Ile Pro						
		530		535		540
Gly Asn Val Val Thr Ile Asp Gly Lys Gly Phe Gly Thr Thr Gln Gly						
		545		550		555
Thr Val Thr Phe Gly Gly Val Thr Ala Thr Val Lys Ser Trp Thr Ser						
		565		570		575
Asn Arg Ile Glu Val Tyr Val Pro Asn Met Ala Ala Gly Leu Thr Asp						
		580		585		590
Val Lys Val Thr Ala Gly Gly Val Ser Ser Asn Leu Tyr Ser Tyr Asn						
		595		600		605
Ile Leu Ser Gly Thr Gln Thr Ser Val Val Phe Thr Val Lys Ser Ala						
		610		615		620
Pro Pro Thr Asn Leu Gly Asp Lys Ile Tyr Leu Thr Gly Asn Ile Pro						
		625		630		635
Glu Leu Gly Asn Trp Ser Thr Asp Thr Ser Gly Ala Val Asn Asn Ala						
		645		650		655

Gln Gly Pro Leu Leu Ala Pro Asn Tyr Pro Asp Trp Phe Tyr Val Phe
660 665 670

Ser Val Pro Ala Gly Lys Thr Ile Gln Phe Lys Phe Phe Ile Lys Arg
675 680 685

Ala Asp Gly Thr Ile Gln Trp Glu Asn Gly Ser Asn His Val Ala Thr
690 695 700

Thr Pro Thr Gly Ala Thr Gly Asn Ile Thr Val Thr Trp Gln Asn
705 710 715

<210> 3

<211> 2160

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Expone la secuencia de polinucleótido optimizada por pareja de codones artificial de NCIMB14276 de *Alicyclobacillus pohliae* que codifica la alfa-amilasa de acuerdo con la invención.

<400> 3

atgaagaaga aaacactttc tctatttgtc ggtttgatgc tgctgcttgg tttgctgttc	60
tctgggttcac ttccttacaa cccgaatgca gctgaggctt cttcaagtgc aagtgtgaag	120
ggagatgtga tttaccaa atcatcgac cgtttctatg acggtgacac aacaacaac	180
aatcggcaa aatcatacgg cctgtatgat cgcacaaaaa gcaaatggaa aatgtactgg	240
ggcggagatc ttgaaggcgt tcgccaaaag ctgccatatt tgaagcagct tgggtgaacg	300
acgatttggc ttctgcctgt tcttgacaat ctgtatacgc tggcaggtac tgacaataca	360
ggttatcacg gctactggac aagagatttc aaacaaatcg aagagcattt cggaaactgg	420
acgacatttg acacacttgt gaatgatgct caccacaaacg gcatcaaagt gatcgttgat	480
ttcgttccga atcacagcac gccattcaaa gcaaacgaca gcacgtttgc agaaggcgg	540
gctttgtacg ataacggtac ttacatggga aattattttg atgatgcaac aaaaggctat	600
ttccatcata acggagatat cagcaactgg gatgaccgtt atgaagcaca atggaaaaac	660
ttcacagatc ctgctggett cagccttget gatttatcac aagaaaacgg aacgatcgct	720
caatatTTaa ctgacgctgc tgttcagctt gttgctcacg gtgctgacgg ccttcgcatt	780
gatgcagtga agcacttcaa cagcggcttc agcaaaagcc ttgctgacaa gctgtatcaa	840
aagaaggata ttttccttgt cgggtgaatgg tatggagatg acccaggtgc tgctaatac	900
cttgaaaaag tgcgttatgc aaacaactct ggtgtaaatg tgcttgattt tgatttgaat	960
acggttatcc gcaatgtatt cggaacattt acacaaacga tgtacgattt aaacaacatg	1020
gtgaacaaaa caggaaatga atacaaatat aaagaaaacc tgattacatt tattgacaac	1080

ES 2 546 630 T3

catgatatga gccgcttccct gactgtaaac agcaacaaag caaaccttca tcaggcactt	1140
gcttttattt taacttcaag aggaacaccg tcaatttact acggaacaga acaatatatg	1200
gcaggcggaa atgatccata caaccgcggc atgatgcctg cttttgatac aacaacaact	1260
gcattcaaag aagtatcaac gcttgccagg ctgcgtcgta ataatgcagc aattcaatac	1320
ggcacaacaa ctcagcgctg gatcaacaat gatgtataca tatatgaaag aaaattcttt	1380
aatgatgttg tgcttggtgc aatcaaccga aatacacaat cttcttattc catcagcggc	1440
cttcaaacgg cactgccaaa cggaaactac gctgattacc tttccggcct gcttgccgga	1500
aacggaattt ctgtcagcaa cggttctgtt gcatcattta cgttgctcc tgggtgctgtt	1560
tctgtttggc aatattcaac ttcagcttct gctectcaa tccggttctgt tgcaccgaat	1620
atgggtatcc cgggaaacgt tgtgacgatt gacggaaaag gcttcggaac gacacaaggt	1680
actgtaacat tcggcgcgct tactgcaact gtaaaaagct ggacatcaa ccgtattgaa	1740
gtgtatgtgc cgaatatggc tgctggcctg actgatgtaa aagtgcagc tggcgggtgtt	1800
tcttcaaacc tatactctta caacatttta tcaggcacac aaacatctgt tgtattcact	1860
gtaaaatcag caccgccgac aaacctaggt gacaagattt acttaacagg aaacatccct	1920
gagcttgaa actggagcac tgatacaagc ggagctgtta acaatgcaca aggcccgctt	1980
cttgaccga attatccgga ctggttttat gtattctctg ttcctgctgg aaaaacgatt	2040
caattcaaat tctttatcaa acgcgctgac ggaacgattc aatgggaaaa cggttcaaac	2100
catgtggcaa caactccaac tggtgcaaca ggaaatatca ctgttacttg gcagaattaa	2160

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene actividad de alfa-amilasa que comprende:
 - (a) una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 34 a 719 de SEC ID N°: 2; o
 - (b) una secuencia de polinucleótido como se expone en los nucleótidos 100 a 2157 de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3; o
 - (c) una secuencia de polinucleótido como se expone en SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.
2. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polinucleótido se produce mediante NCIMB14276 de *Alicyclobacillus pohliae*.
3. Un vector que comprende la secuencia de polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.
4. El vector de acuerdo con la reivindicación 3 que es un vector de expresión, en el que la secuencia de polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 está unida operativamente al menos a una secuencia reguladora que permite la expresión de la secuencia de polinucleótido en una célula hospedadora adecuada.
5. El vector de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la célula hospedadora adecuada es una especie de *Aspergillus*, *Bacillus*, *Chrysosporium*, *Escherichia*, *Kluyveromyces*, *Penicillium*, *Pseudomonas*, *Saccharomyces*, *Streptomyces* o *Talaromyces*, preferentemente una especie de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus Niger* o *Aspergillus oryzae*.
6. Una célula hospedadora recombinante que comprende el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o que comprende el vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
7. La célula hospedadora recombinante de acuerdo con la reivindicación 6 capaz de expresar o sobreexpresar dicho polinucleótido o dicho vector.
8. Un método para fabricar el polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o el vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 que comprende las etapas de cultivar una célula hospedadora transformada con dicho polinucleótido o dicho vector y aislar dicho polinucleótido o dicho vector de dicha célula hospedadora.
9. Un polipéptido alfa-amilasa que comprende:
 - (a) una secuencia de aminoácidos como se expone en los aminoácidos 34 a 719 de SEC ID N°: 2; o
 - (b) una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido como se expone en los nucleótidos 100 a 2157 de SEC ID N°: 1 o SEC ID N°: 3.
10. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 9 obtenible por expresión del polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o el vector de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 en una célula hospedadora apropiada.
11. Un método para fabricar el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 que comprende cultivar una célula hospedadora recombinante de acuerdo con la reivindicación 6 o 7 en condiciones que permitan la expresión del polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o el vector de acuerdo con la reivindicación 3 a 5 y, opcionalmente, recuperar el polipéptido codificado de la célula o el medio de cultivo.
12. Uso del polipéptido de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 en la fabricación de alimentos.
13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12 en la fabricación de un producto horneado, preferentemente pan o pasteles.
14. Composición de enzima que comprende el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 y uno o más componentes seleccionados entre el grupo que consiste en polvo de leche, gluten, grasa granulada, una enzima adicional, un aminoácido, una sal, un oxidante tal como ácido ascórbico, bromato y azodicarbonamida, un agente reductor tal como L-cisteína, un emulgente tal como monoglicéridos, diglicéridos, monoestearato de glicerol, estearoil lactilato sódico, estearoil lactilato de calcio, ésteres de poliglicerol de ácidos grasos y DATEM, gomas tales como goma de guar y goma de xantano, aromas, ácidos tales como ácido cítrico y ácido propiónico, almidón, almidón modificado, gluten, humectantes tales como glicerol, y conservantes.
15. Composición de enzima de acuerdo con la reivindicación 14, en la que la enzima adicional es una enzima lipolítica, preferentemente una fosfolipasa.
16. Método para preparar una masa que comprende la etapa de combinar el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 o la composición de acuerdo con la reivindicación 14 o 15 y al menos un ingrediente de masa.

17. Una masa que comprende el polipéptido de acuerdo con la reivindicación 9 o 10 o la composición de acuerdo con la reivindicación 14 o 15.

5 18. Método para preparar un producto horneado que comprende la etapa de hornear la masa de acuerdo con la reivindicación 17.

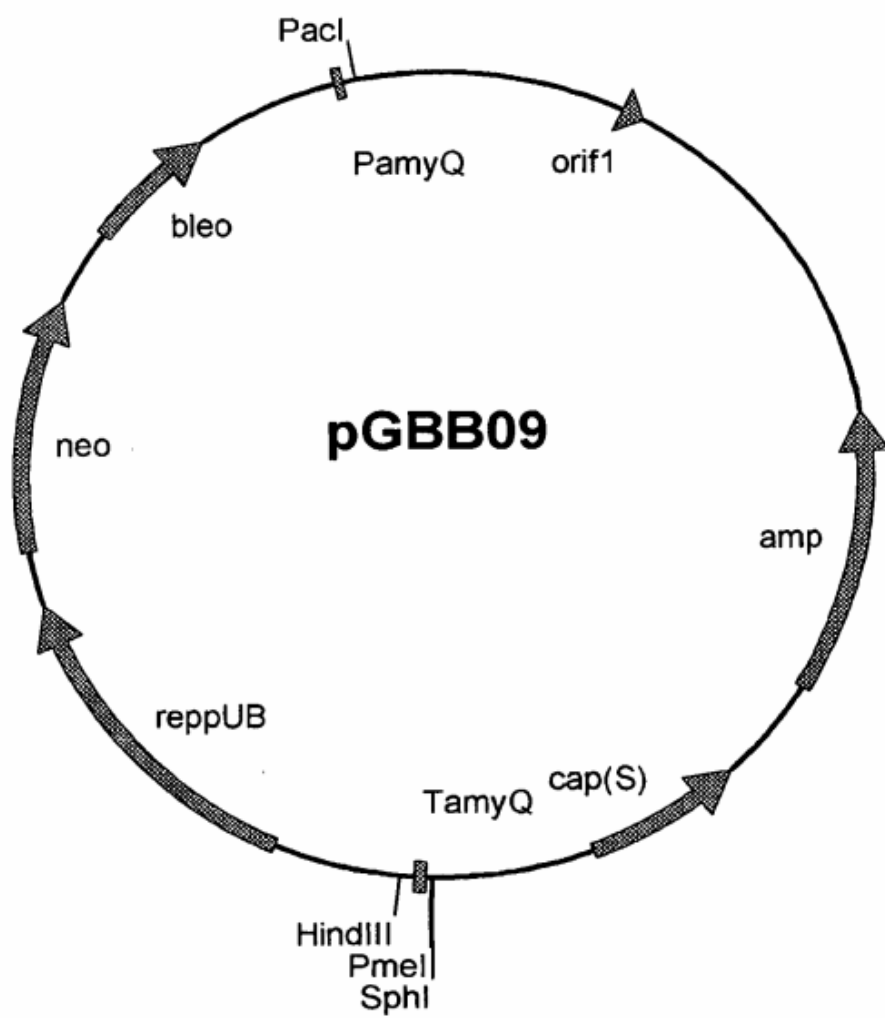


Fig. 1

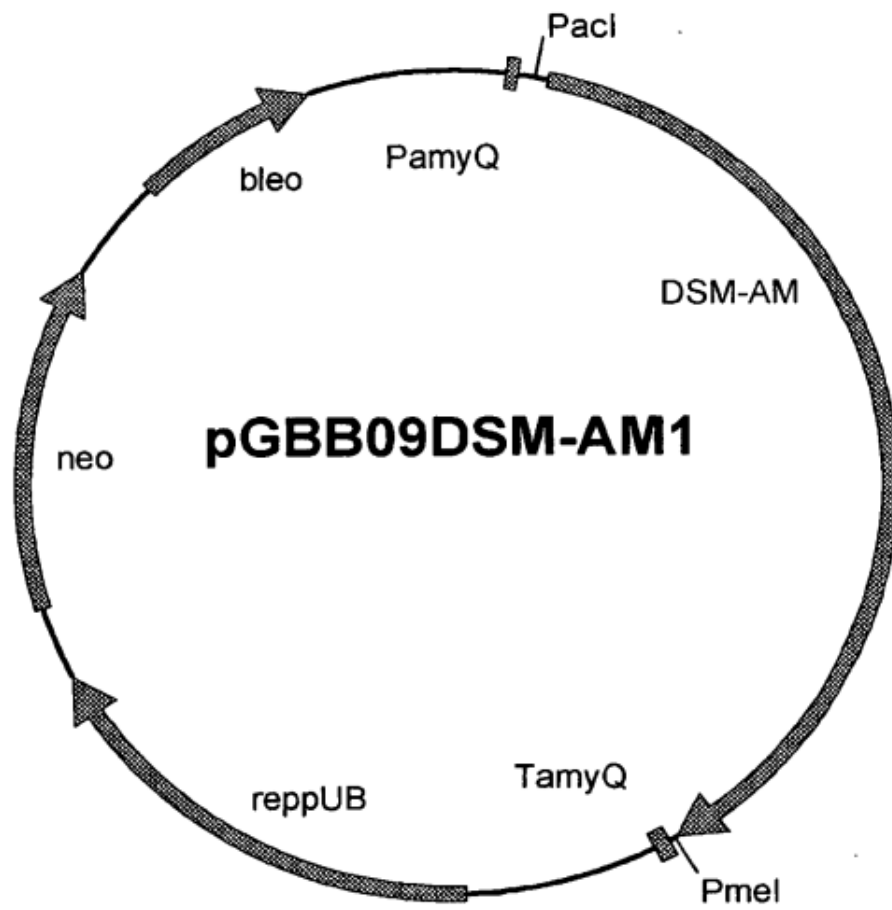


Fig. 2

5'-

ATGAAAAAGAAAACGCTTTCATTATTTGTGGGACTGATGCTGCTCCTCGGTCTTCTG
 TTCAGCGGTTCTCTTCCGTACAATCCAAACGCCGCTGAAGCCAGCAGTTCCGCAAG
 CGTCAAAGGGGACGTGATTTACCAGATTATCATTGACCGGTTTTACGATGGGGACA
 CGACGAACAACAATCCTGCCAAAAGTTATGGACTTTACGATCCCACCAAATCGAAG
 TGGAAAATGTATTGGGGCGGGGATCTGGAGGGGGTTCGTCAAAAACCTTCCTTATCT
 TAAACAGCTGGGCGTAACGACGATCTGGTTGTCCCCGGTTTTGGACAATCTGGATA
 CACTTGCAGGTACCGATAACACTGGCTATCACGGATACTGGACGCGCGATTTTAAA
 CAGATTGAGGAACATTTTCGGGAATTGGACCACATTTGACACGTTGGTCAATGATGC
 TCACCAAAACGGAATCAAGGTGATTGTGCGACTTTGTGCCCAATCATTCAACTCCTTT
 TAAGGCCAAACGATTCCACCTTTGCGGAAGGCGGCGCCCTCTACGACAACGGAACC
 TATATGGGCAATTATTTTGATGACGCAACAAAAGGGTACTTTACCATAATGGGGAC
 ATCAGCAACTGGGACGACCGGTACGAGGCGCAATGGAAAACTTCACGGATCCAG
 CCGGTTTTCTCGCTTGCCGATTTGTGCGCAGGAAAATGGCACGATTGCTCAATACCTG
 ACCGATGCGGCGGTTCAATTAGTAGCACATGGAGCGGATGGTTTGCGGATTGATG
 CGGTGAAGCATTTTAATTCTGGGTTCTCCAAATCGTTGGCTGATAAACTGTACCAA
 AGAAAGACATTTTCCTAGTGGGGGAATGGTACGGAGATGACCCCGGAGCAGCCAA
 TCATTTGGAAAAGGTCCGGTACGCCAACAACAGCGGTGTCAATGTGCTGGATTTTG
 ATCTCAACACGGTGATTCGAAATGTGTTCCGTACATTTACGCAAACGATGTACGATC
 TTAACAATATGGTGAACCAACGGGGGAACGAGTACAAATACAAAGAAAATCTAATCA
 CATTTATCGATAACCATGATATGTCGAGATTTCTTACGGTAAATTCGAACAAGGCGA
 ATTTGCACCAGGCGCTTGCTTTCACTTCGCGGGGAACGCCCTCCATCTAT
 TACGGAACCGAACAATACATGGCAGGCGGCAATGACCCGTACAACAGGGGGATGA
 TGCCGGCGTTTGATACGACAACCACCGCCTTTAAAGAGGTGTCAACTCTGGCGGG
 GTTGCGCAGGAACAATGCAGCGATCCAGTACGGCACCACCACCCAACGTTGGATC
 AACAATGATGTTTACATTTATGAGCGGAAATTTTTCAACGATGTCGTATTGGTGGCC
 ATCAATCGAAACACGCAATCCTCCTACTCGATTTCCGGTTTGCGAGACTGCCTTGCCA
 AATGGCAACTATGCGGATTATCTGTCAGGGCTGTTGGGGGGGAACGGGATTTCCG
 TTTCCAATGGAAGTGTGCTTCGTTACGCTTGCGCCTGGAGCCGTGTCTGTTTGG
 CAGTACAGCACATCCGCTTCAGCGCCGCAAATCGGATCGGTTGCTCCGAATATGG
 GAATTCGGGTAATGTGGTCACGATCGACGGGAAAGGTTTTGGAACGACGCAGGG
 AACCGTGACATTTGGCGGAGTGACAGCGACTGTAAATCCTGGACATCAAACCGGA
 TTGAAGTGTACGTGCCCAACATGGCCGCCGGTCTGACCGATGTAAAAGTCACCGC
 GGGTGGAGTTTCCAGCAATCTGTATTCTTACAATATTTTGAGTGGAACGCAGACATC
 GGTTGTGTTTACTGTGAAAAGTGCTCCTCCGACCAACCTGGGGGATAAGATTTACC
 TGACGGGCAACATACCGGAATTGGGAAATTGGAGCACGGATACGAGCGGAGCCGT
 TAACAATGCGCAAGGGCCCCTGCTCGCGCCCAATTATCCGGATTGGTTTTATGTAT
 TCAGCGTTCCGGCAGGAAAGACGATTCAATTCAAGTTTTTCATCAAGCGTGCGGAT
 GGAACGATTCAATGGGAGAATGGTTCGAACCACGTGGCCACAACCTCCACGGGTG
 CAACCGGTAACATCACTGTCACGTGGCAAAACTAG

-3'

Fig. 3

MKKKTLSLFVGLMLLLGLLFSGSLPYNPNAAEASSSASVKGDVIYQIIIDRFYDGDTTNN
 NPAKSYGLYDPTKSKWKMYWGGDLEGVRQKLPYLKQLGVTTIWLSPLVDNLDLAGT
 DNTGYHGYWTRDFKQIEEHFGNWTTFDLTVNDAHQNGIKVIVDFVPNHSTPFKANDST
 FAEGGALYDNGTYMGNYFDDATKGYFHHNGDISNWDDRYEAQWKNFTDPAGFSLAD
 LSQENGITIAQYLTDAAVQLVAHGADGLRIDAVKHFNSGFSKSLADKLYQKKDIFLVGEW
 YGDDPGAANHLEKVRYANNSGVNVLDLNTVIRNVFGTFTQTMYDLNNMVNQTGNE
 YKYKENLITFIDNHDMRSRLTVNSNKANLHQALAFILTSRGTPSIYYGTEQYMAGGNDPY
 NRGMMPAFDTTTTAFKEVSTLAGLRRNNAIQYGTTTQRWINNDVYIERKFFNDVVLV
 AINRNTQSSYSISGLQTALPNGNYADYLSGLLGNGISVSNGSVASFTLAPGAVSVWQY
 STSASAPQIGSVAPNMGIPGNVVTIDGKGFGTTQGTVTFGGVTATVKSWSNRIEVYVP
 NMAAGLTDVKVTAGGVSSNLYSYNLSGTQTSVFTVKSAPPTNLGDKIYLTGNIPELGN
 WSTDTSGAVNNAQGPELLAPNYPDFYVFSVPAGKTIQFKFFIKRADGTIQWENGSNHV
 ATTPTGATGNITVTWQN

Fig. 4

5'-

ATGAAGAAGAAAACACTTTCTCTATTTGTCGGTTTGATGCTGCTGCTTGGTTTGCTG
 TTCTCTGGTTCACTTCCTTACAACCCGAATGCAGCTGAGGCTTCTTCAAGTGCAAGT
 GTGAAGGGAGATGTGATTTACCAAATCATCATCGACCGTTTCTATGACGGTGACAC
 AACAAACAACAATCCGGCAAAATCATACGGCCTGTATGATCCGACAAAAAGCAAAT
 GGAAAATGTACTGGGGCGGAGATCTTGAAGGCGTTCGCCAAAAGCTGCCATATTTG
 AAGCAGCTTGGTGTAAACGACGATTTGGCTTTGCCTGTTCTTGACAATCTTGATACG
 CTGGCAGGTACTGACAATACAGGTTATCACGGCTACTGGACAAGAGATTTCAAACA
 AATCGAAGAGCATTTTCGGAACTGGACGACATTTGACACACTTGTGAATGATGCTC
 ACCAAAACGGCATCAAAGTGATCGTTGATTTCTGTTCCGAATCACAGCACGCCATTC
 AAAGCAAACGACAGCACGTTTGCAGAAGGCGGTGCTTTGTACGATAACGGTACTTA
 CATGGGAAATTATTTTGATGATGCAACAAAAGGCTATTTCCATCATAACGGAGATAT
 CAGCAACTGGGATGACCGTTATGAAGCACAATGGAAAACTTCACAGATCCTGCTG
 GCTTCAGCCTTGCTGATTTATCACAAGAAAACGGAACGATCGCTCAATATTTAACTG
 ACGCTGCTGTTGAGCTTGTGCTCACGGTGCTGACGGCCTTCGCATTGATGCAGTG
 AAGCACTTCAACAGCGGCTTCAGCAAAAGCCTTGCTGACAAGCTGTATCAAAAGAA
 GGATATTTTCTTGTCTGGTGAATGGTATGGAGATGACCCAGGTGCTGCTAATCACC
 TTGAAAAAGTGCGTTATGCAAACAACCTCTGGTGTAATGTGCTTGATTTTGATTTGA
 ATACGGTTATCCGCAATGTATTCGGAACATTTACACAAACGATGTACGATTTAAACA
 ACATGGTGAACCAAACAGGAAATGAATACAAATATAAAGAAAACCTGATTACATTTA
 TTGACAACCATGATATGAGCCGCTTCCTGACTGTAAACAGCAACAAAGCAAACCTTC
 ATCAGGCACTTGCTTTTATTTTAACTTCAAGAGGAACACCGTCAATTTACTACGGAA
 CAGAACAATATATGGCAGGCGGAAATGATCCATACAACCGCGGCATGATGCCTGCT
 TTTGATACAACAACAACCTGCATTCAAAGAAGTATCAACGCTTGACGGGCTGCGTCG
 TAATAATGCAGCAATTCAATACGGCACAACAACCTCAGCGCTGGATCAACAATGATGT
 ATACATATATGAAAGAAAATTCTTTAATGATGTTGTGCTTGTTGCAATCAACCGAAAT
 ACACAATCTTCTTATTCCATCAGCGGCCTTCAAACGGCACTGCCAAACGGAAACTA
 CGCTGATTACCTTTCCGGCCTGCTTGGCGGAAACGGAATTTCTGTGACGAACGGTT
 CTGTTGCATCATTTACGCTTGCTCCTGGTGCTGTTTCTGTTTGGCAATATTCAACTT
 CAGCTTCTGCTCCTCAAATCGGTTCTGTTGCACCGAATATGGGTATCCCGGGAAAC
 GTTGTGACGATTGACGGAAAAGGCTTCGGAACGACACAAGGTACTGTAACATTCGG
 CGGCGTTACTGCAACTGTAAAAAGCTGGACATCAAACCGTATTGAAGTGTATGTGC
 CGAATATGGCTGCTGGCCTGACTGATGTAAAAGTGACAGCTGGCGGTGTTTCTTCA
 AACCTATACTCTTACAACATTTTATCAGGACACACAACATCTGTTGTATTCACTGTAA
 AATCAGCACCGCCGACAAACCTAGGTGACAAGATTTACTTAACAGGAAACATCCCT
 GAGCTTGGAACCTGGAGCACTGATACAAGCGGAGCTGTTAACAATGCACAAGGCC
 CGCTTCTTGACCGAATTATCCGGACTGGTTTTATGTATTCTCTGTTCTGCTGGAA
 AACGATTCAATTCAAATTTCTTTATCAAACGCGCTGACGGAACGATTCAATGGGAAA
 ACGGTTCAAACCATGTGGCAACAACCTCAAACCTGGTGAACAGGAAATATCACTGTT
 ACTTGGCAGAATTAA

-3'

Fig. 5