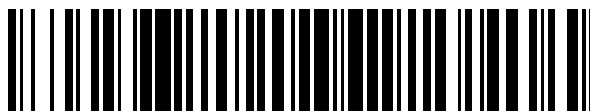


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 608**

51 Int. Cl.:

C12N 9/28 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2000 E 10181113 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2290060**

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

30 Prioridad:

30.03.1999 DK 43799

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

21.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ANDERSEN, CARSTEN;
JOERGENSEN, CHRISTEL THEA;
BISGAARD-FRANTZEN, HENRIK;
SVENDSEN, ALLAN y
KJAERULFF, SOEREN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 618 608 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de alfa-amilasa

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere, entre otras cosas, a nuevas variantes de alfa-amilasas originales de tipo Termamyl, sobre todo a variantes que presentan propiedades alteradas, en particular un patrón de escisión alterado (con respecto al original) que es ventajoso con respecto a las aplicaciones de las variantes, en particular, en el procesamiento industrial del almidón (p. ej., licuefacción o sacarificación del almidón).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las alfa-amilasas (alfa-1,4-glucan-4-glucanohidrolasas, EC 3.2.1.1) constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del almidón y otros oligosacáridos y polisacáridos 1,4-glucosídicos lineales y ramificados.

Existe un conjunto muy extenso de patentes y publicaciones científicas que se relaciona con esta clase de enzimas que son industrialmente muy importantes. Diversas alfa-amilasas, tales como las variantes de alfa-amilasas de tipo Termamyl, son conocidas a partir de, p. ej., los documentos WO 90/11352, WO 95/10603, WO 95/26397, WO 96/23873, WO 96/23874 y WO 97/41213.

15 Entre recientes descripciones relacionadas con las alfa-amilasas, el documento WO 96/23874 proporciona datos estructurales de cristales tridimensionales por rayos X, para una alfa-amilasa de tipo Termamyl, a la que se hace referencia como BA2, que consiste en los 300 residuos de aminoácidos N-terminales de la alfa-amilasa de *B. amylo-*
 20 *liquefaciens* que comprenden la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6 en la presente memoria y los aminoácidos 301-483 del extremo C-terminal de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que comprenden la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 en la presente memoria (estando esta última disponible comercialmente bajo el nombre comercial de Termamyl®) y que, por tanto, está muy relacionada con las alfa-amilasas de *Bacillus* que son industrialmente importantes (que en este contexto se incluyen dentro del significado de la expresión "alfa-amilasas de tipo Termamyl", y que incluyen, entre otras, las alfa-amilasas de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. stearothermophilus*). El documento WO 96/23874 también describe una metodología para diseñar, basándose en un análisis de la estructura de una alfa-amilasa original de tipo Termamyl, variantes de la alfa-amilasa original de tipo Termamyl que presentan propiedades alteradas respecto al original.

Los documentos WO 96/23874 y WO 97/41213 (Novo Nordisk) describen variantes de alfa-amilasas de tipo Termamyl con un patrón de escisión alterado, que contienen mutaciones en los residuos de aminoácidos V54, D53, Y56, Q333, G57 y A52 de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4 en la presente memoria.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

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

Los inventores han encontrado sorprendentemente, variantes con propiedades alteradas, en particular un patrón de escisión alterado, que tienen una capacidad reducida mejorada para escindir un sustrato cerca del punto de ramificación, y además tienen una especificidad de sustrato mejorada y/o una actividad específica mejorada, en comparación con las variantes de alfa-amilasas de tipo Termamyl descritas en los documentos WO 96/23874 y WO 97/41213 (Novo Nordisk) con un patrón de escisión alterado, que contienen mutaciones en los residuos de aminoácido V54, D53, Y56, Q333, G57 y A52 de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4 en el presente documento.

40 La invención se refiere además a estructuras artificiales de ADN que codifican alfa-amilasas de la invención, a vectores de expresión recombinantes que son portadores de las estructuras artificiales de ADN y al uso de variantes de la invención, solas o en combinación con otras enzimas alfa-amilolíticas, en diversos procesos industriales, por ejemplo, licuefacción de almidón, y en composiciones detergentes, tales como composiciones para lavandería, lavado de platos y limpieza de superficies duras; producción de etanol, tal como la producción de etanol para combustible, bebidas y etanol industrial; eliminar el apresto de tejidos, telas o prendas de vestir, etc.

45 Nomenclatura

En la presente descripción y las reivindicaciones, se utilizan los códigos convencionales de una letra y tres letras para los residuos de aminoácidos. Para facilitar la referencia, las variantes de alfa-amilasa de la invención se describen mediante el uso de la siguiente nomenclatura:

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

50 De acuerdo con esta nomenclatura, por ejemplo, la sustitución de alanina por asparagina en la posición 30 se muestra como:

Ala30Asn o A30N

una deleción de alanina en la misma posición se muestra como:

Ala30* o A30*

y una inserción de un residuo de aminoácido adicional, tal como lisina, se muestra como:

5 *30aLys o *30aK

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

Cuando una alfa-amilasa específica contiene una "deleción" en comparación con otras alfa-amilasas y se realiza una inserción en una posición tal, esto se indica como:

10 *36aAsp o *36aD

para la inserción de un ácido aspártico en la posición 36.

Las mutaciones múltiples están separadas por signos de suma, es decir:

Ala30Asp + Glu34Ser o A30N + E34S

15 que representan mutaciones en las posiciones 30 y 34 que sustituyen la alanina y el ácido glutámico por asparagina y serina, respectivamente. Las mutaciones múltiples también pueden estar separadas del modo siguiente, es decir, significando lo mismo que el signo de suma:

Ala30Asp/Glu34Ser o A30N/E34S

Cuando se pueden insertar uno o varios residuos de aminoácidos alternativos en una posición dada, se indica como A30N,E o

20 A30N o A30E

Por otra parte, cuando en la presente memoria se identifica una posición adecuada para una modificación sin que se sugiera ninguna modificación específica, o A30X, se entiende que se puede sustituir cualquier residuo de aminoácido por el residuo de aminoácido presente en la posición. Así, por ejemplo, cuando se menciona una modificación de una alanina en la posición 30, pero no se especifica, o se especifica como "X", se entiende que la alanina puede estar delecionada o sustituida por cualquier otro aminoácido, es decir, cualquiera entre: R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V.

25

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La Figura 1 muestra la SEQ ID NO: 1 del documento WO 95/26397.

La Figura 2 muestra la SEQ ID NO: 2 del documento WO 95/26397.

30 La Figura 3 muestra la secuencia de la alfa-amilasa de Bacillus Sp. nº 707 de Tsukamoto et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 151 (1988), págs. 25-31.

La alfa-amilasa de tipo Termamyl

Es bien conocido que una serie de alfa-amilasas producidas por *Bacillus* spp. son altamente homólogas a nivel de aminoácidos. Por ejemplo, se ha encontrado que la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 (comercialmente disponible como Termamyl®) tiene una homología de aproximadamente el 89% con la alfa-amilasa de *B. amyloliquefaciens* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6 y una homología de aproximadamente el 79% con la alfa-amilasa de *B. stearothermophilus* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 8. Otras alfa-amilasas homólogas incluyen una alfa-amilasa obtenida a partir de una cepa del *Bacillus* sp. NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 o DSM 9375, todas las cuales se describen detalladamente en el documento WO 95/26397, y la alfa-amilasa nº 707 descrita por Tsukamoto et al., Biochemical and Biophysical Research Communications, 151 (1988), págs. 25-31.

35

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

45

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

Por consiguiente, en el presente contexto, la expresión "alfa-amilasa de tipo Termamyl" se entiende que indica una alfa-amilasa, que a nivel de aminoácidos muestra una homología sustancial con Termamyl[®], es decir, la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4 en el presente documento. En otras palabras, una alfa-amilasa de tipo Termamyl es una alfa-amilasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4, 6 u 8 en la presente memoria, y la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o 2 del documento WO 95/26397 (véanse las Figuras 1 y 2, respectivamente o en Tsukamoto et al., 1988 (véase la Figura 3), o i) que muestra al menos 90%, incluso especialmente más preferiblemente al menos 95% de homología, más preferiblemente al menos 97%, más preferiblemente al menos 99% de homología con al menos una de dichas secuencias de aminoácidos.

En relación con la propiedad i), la "homología" se determina mediante el uso del programa GAP procedente del paquete de GCG versión 7.3 (junio de 1993), utilizando valores por defecto para las penalizaciones por GAP (hueco), que es una penalización por creación de GAP de 3,0 y una penalización por extensión de GAP de 0,1, (Genetic Computer Group (1991) Manual del Programa para el paquete de GCG, versión 7, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU. 53711).

Una alineación estructural entre Termamyl y una alfa-amilasa de tipo Termamyl se puede utilizar para identificar posiciones equivalentes/correspondientes en otras alfa-amilasas de tipo Termamyl. Un método para obtener dicha alineación estructural es el uso del programa Pile Up del paquete de GCG, usando valores por defecto de penalizaciones por hueco, es decir, una penalización por creación de hueco de 3,0 y una penalización por extensión de hueco de 0,1. Otros métodos de alineación estructural incluyen el análisis de agrupamientos hidrófobos (Gaboriaud et al., (1987), FEBS Letters 224, págs. 149-155) y el enhebrado inverso (Huber, T; Torda, AE, PROTEIN SCIENCE vol. 7, nº 1 págs. 142-149 (1998)).

En el presente contexto, "obtenido a partir de" se entiende que no indica solamente una alfa-amilasa producida o producible por una cepa del organismo en cuestión, sino también una alfa-amilasa codificada por una secuencia de ADN aislada a partir de tal cepa y producida en un organismo hospedador, transformado con dicha secuencia de ADN. Finalmente, la expresión se entiende que indica una alfa-amilasa que está codificada por una secuencia de ADN de origen sintético y/o de ADNc y que tiene las características de identificación de la alfa-amilasa en cuestión. La expresión también se entiende que indica que la alfa-amilasa original puede ser una variante de una alfa-amilasa de origen natural, es decir, una variante que es el resultado de una modificación (inserción, sustitución, delección) de uno o varios residuos de aminoácidos de la alfa-amilasa de origen natural.

Alfa-amilasas originales híbridas

La alfa-amilasa original puede ser una alfa-amilasa híbrida, es decir, una alfa-amilasa, que comprende una combinación de secuencias de aminoácidos parciales obtenidas a partir de al menos dos alfa-amilasas.

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

Por tanto, la alfa-amilasa original híbrida puede comprender una combinación de secuencias de aminoácidos parciales que se obtienen a partir de al menos dos alfa-amilasas de tipo Termamyl, o de al menos una alfa-amilasa de tipo Termamyl y al menos una alfa-amilasa bacteriana no de tipo Termamyl, o de al menos una alfa-amilasa de tipo Termamyl y al menos una alfa-amilasa fúngica. La alfa-amilasa de tipo Termamyl a partir de la cual se obtiene una secuencia de aminoácidos parcial puede ser, p. ej., cualquiera de estas alfa-amilasas específicas de tipo Termamyl a las que se hace referencia en la presente memoria.

Por ejemplo, la alfa-amilasa original puede comprender una parte C-terminal de una alfa-amilasa obtenida a partir de una cepa de *B. licheniformis*, y una parte N-terminal de una alfa-amilasa obtenida a partir de una cepa de *B. amyloliquefaciens* o de una cepa de *B. stearothersophilus*.

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

Las alfa-amilasas fúngicas mencionadas anteriormente, es decir, obtenidas a partir de *A. niger* y *A. oryzae*, son muy homólogas a nivel de aminoácidos y se consideran generalmente como pertenecientes a la misma familia de alfa-

amilasas. La alfa-amilasa fúngica obtenida a partir de *Aspergillus oryzae* está comercialmente disponible bajo el nombre comercial Fungamyl®.

Además, cuando se hace referencia a una variante particular de una alfa-amilasa de tipo Termamyl (variante de la invención) - de una manera convencional - por referencia a una modificación (p. ej., delección o sustitución) de residuos de aminoácidos específicos en la secuencia de aminoácidos de una alfa-amilasa específica de tipo Termamyl, debe entenderse que variantes de otra alfa-amilasa de tipo Termamyl modificada en la o las posiciones equivalentes (según se determina a partir de la mejor alineación posible de las secuencias de aminoácidos entre las secuencias de aminoácidos respectivas) están comprendidas en la presente memoria.

Una realización preferida de una variante de la invención, es una obtenida a partir de una alfa-amilasa de *B. licheniformis* (como alfa-amilasa original de tipo Termamyl), p. ej., una de aquellas a las que se ha hecho referencia anteriormente, tal como la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4.

Construcción de variantes de la invención

La construcción de la variante de interés se puede realizar mediante el cultivo de un microorganismo que comprende una secuencia de ADN que codifica la variante en condiciones que son propicias para producir la variante. La variante se puede recuperar posteriormente a partir del caldo de cultivo resultante. Esto se describe con más detalle a continuación.

Propiedades alteradas

A continuación se describe la relación entre las mutaciones que pueden estar presentes en las variantes de la invención, y las alteraciones deseables de propiedades (en relación con las de una alfa-amilasa original de tipo Termamyl), que pueden resultar de las mismas.

En una realización preferida, una variante de la invención comprende al menos una mutación en una posición correspondiente a las siguientes mutaciones en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4:

G48A,S.

Todas las variantes de la invención mencionadas anteriormente tienen propiedades alteradas (lo que significa propiedades aumentadas o disminuidas), en particular al menos una de las siguientes propiedades con relación a la alfa-amilasa original: capacidad reducida para escindir un sustrato próximo al punto de ramificación, especificidad de sustrato mejorada y/o actividad específica mejorada, unión al sustrato alterada, termoestabilidad alterada, perfil de pH/actividad alterado, perfil de pH/estabilidad alterado, estabilidad alterada frente a la oxidación, dependencia del Ca^{2+} alterada.

Estabilidad

En el contexto de la presente invención, las mutaciones (incluyendo sustituciones y/o delecciones de aminoácidos) importantes con respecto al logro de una estabilidad alterada, en particular una estabilidad mejorada (es decir, más alta o más baja), a un pH especialmente bajo (es decir, pH 4-6) incluyen cualquiera de las mutaciones mencionadas en la sección "Propiedades alteradas", anterior y las variantes mencionadas justo debajo.

Las variantes siguientes: Q360A,K; N102A, N326A,L, N190G, N190K; Y262A,K,E (usando la numeración BAN, es decir, SEQ ID NO: 6) también se evaluaron en cuanto a la estabilidad del pH. Una alfa-amilasa original preferida puede ser BA2 descrita anteriormente. La estabilidad del pH fue determinada como se describe en la sección "Materiales y métodos".

Estabilidad del Ca^{2+}

Una estabilidad del Ca^{2+} alterada significa que la estabilidad de la enzima, bajo agotamiento del Ca^{2+} , ha sido mejorada, es decir, mayor o menor estabilidad. En el contexto de la presente invención, las mutaciones (incluso las sustituciones de aminoácidos) importantes con respecto al logro de una estabilidad del Ca^{2+} alterada, en particular, una estabilidad del Ca^{2+} mejorada, es decir, mayor o menor estabilidad, a un pH especialmente bajo (es decir, pH 4-6) incluyen cualquiera de las mutaciones mencionadas en la sección "Propiedades alteradas" más arriba.

Actividad específica

En otro aspecto de la presente invención, mutaciones importantes con respecto a la obtención de variantes que presentan una actividad específica alterada, en particular, una actividad específica aumentada o disminuida, especialmente a temperaturas entre 60-100°C, preferiblemente 70-95°C, especialmente 80-90°C, incluyen cualquiera de las mutaciones mencionadas en la sección "Propiedades alteradas" más arriba. La actividad específica de LE174 y LE429 se determinó a 16.000 NU/mg usando el ensayo Phadebas® descrito en la sección "Materiales y métodos".

Patrón de escisión alterado

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

Se ha indicado anteriormente (documento de patente de EE.UU. 5.234.823) que durante la sacarificación con glucoamilasa y pululanasa, la presencia de actividad alfa-amilasa residual que surge del proceso de licuefacción, puede llevar a rendimientos más bajos de glucosa, si la alfa-amilasa no está inactivada antes de la fase de sacarificación. Esta inactivación se puede realizar normalmente ajustando el pH por debajo de 4,7 a 95°C, antes de reducir la temperatura a 60°C para la sacarificación.

La razón de este efecto negativo sobre el rendimiento de la glucosa no se entiende totalmente, pero se asume que la alfa-amilasa licuefactante (por ejemplo Termamyl 120 L de *B. licheniformis*) genera "dextrinas límites" (que son sustratos pobres en pululanasa), mediante la hidrolización de enlaces 1,4-alfa-glucosídicos próximos y en ambos lados de los puntos de ramificación en la amilopectina. La hidrólisis de estas dextrinas límites mediante la glucoamilasa conduce a la generación del trisacárido panosa, que es hidrolizado solo lentamente por la glucoamilasa.

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

Por tanto, el objetivo de la presente invención es conseguir una alfa-amilasa mutante con características de degradación del almidón modificadas de forma apropiada, pero que conserve la termoestabilidad de la alfa-amilasa original de tipo Termamyl.

Por consiguiente, la invención se refiere a una variante de una alfa-amilasa de tipo Termamyl, que tiene una capacidad reducida mejorada para escindir un sustrato próximo al punto de ramificación, y que además tiene una especificidad de sustrato mejorada y/o una actividad específica mejorada.

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

Se puede mencionar en esta memoria que, según el documento WO 96/23874, se prevén variantes que comprenden al menos una de las siguientes mutaciones para evitar una escisión cerca del punto de ramificación:

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

D53L, I, F, Y, W;

Y56W;

Q333W;

G57, todos los residuos de aminoácidos posibles;

A52, residuos de aminoácidos más grandes que A, p. ej., A52W, Y, L, F, I.

Las mutaciones de particular interés en relación con obtener variantes de acuerdo con la invención que tienen una capacidad reducida mejorada para escindir un sustrato cerca del punto de ramificación, y que además tienen una especificidad de sustrato mejorada y/o una actividad específica mejorada, incluyen mutaciones en las siguientes posiciones en la alfa-amilasa de *B. licheniformis*, SEQ ID NO: 4:

H156, A181, N190, A209, Q264 e I201.

También, la alfa-amilasa de *B. licheniformis* mostrada en SEQ ID NO: 4 que comprende una o varias de las siguientes mutaciones, se puede utilizar como estructura principal (usando SEQ ID NO: 4 para la numeración de las mutaciones):

E119C;

S130C;

D124C;

R127C;

A52, todos los residuos de aminoácidos posibles;

5 S85, todos los residuos de aminoácidos posibles;

N96, todos los residuos de aminoácidos posibles;

V129, todos los residuos de aminoácidos posibles;

A269, todos los residuos de aminoácidos posibles;

A378, todos los residuos de aminoácidos posibles;

10 S148, todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular S148N;

E211, todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular E211Q;

N188, todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular N188S, N188P;

M197, todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular M197T, M197A, M197G, M197I, M197L, M197Y, M197F, M197I;

15 W138, todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular W138Y;

D207, todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular D207Y;

H133, todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular H133Y;

H205, todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular H205H, H205C, H205R;

S187, todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular S187D;

20 A210, todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular A210S, A210T;

H405, todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular H405D;

K176, todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular K176R;

F279, todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular F279Y;

Q298, todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular Q298H;

25 G299, todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular G299R;

L308, todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular L308F;

T412, todos los residuos de aminoácidos posibles, en particular T412A;

Además, la alfa-amilasa de *B. licheniformis* mostrada en SEQ ID NO: 4 que comprende al menos una de las siguientes mutaciones, se puede emplear como estructura principal:

30 M15, todos los residuos de aminoácidos posibles;

A33, todos los residuos de aminoácidos posibles;

En una realización preferida, una variante de la invención comprende al menos una mutación en una posición correspondiente a las siguientes mutaciones en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4:

G48A,S.

35 Mutaciones generales en variantes de la invención

Puede ser preferible que una variante de la invención comprenda una o varias modificaciones además de las indicadas anteriormente. Por ello, puede ser ventajoso que uno o varios residuos de prolina presentes en la parte de la variante de alfa-amilasa que está modificada, se sustituyan con un residuo que no sea prolina que puede ser cualquiera de los posibles residuos de origen natural que no sea prolina, y que preferiblemente sea una alanina, glicina, serina, treonina, valina o leucina.

40

Análogamente, puede ser preferible que uno o varios residuos de cisteína presentes entre los residuos de aminoácidos con los cuales se modifica la alfa-amilasa original, se sustituyan con un residuo que no sea cisteína, tal como serina, alanina, treonina, glicina, valina o leucina.

5 Además, una variante de la invención puede - en combinación con cualquiera de las modificaciones indicadas anteriormente - estar modificada de modo que una o varias Asp y/o Glu presentes en un fragmento de aminoácidos correspondiente al fragmento de aminoácidos 185-209 de SEQ ID NO: 4, se sustituyan por una Asn y/o Gln, respectivamente. También es de interés la sustitución en la alfa-amilasa de tipo Termamyl, de uno o varios de los residuos de Lys presentes en un fragmento de aminoácidos correspondiente al fragmento de aminoácidos 185-209 de SEQ ID NO: 4, por una Arg.

10 Se entenderá que la presente invención comprende variantes que incorporan dos o más de las modificaciones indicadas anteriormente.

Además, puede ser ventajoso introducir mutaciones puntuales en cualquiera de las variantes descritas en la presente memoria.

Métodos para preparar variantes de alfa-amilasa

15 En la técnica se conocen diferentes métodos para introducir mutaciones en genes. Después de una breve exposición de la clonación de secuencias de ADN que codifican alfa-amilasas, se expondrán unos métodos para generar mutaciones en sitios específicos dentro de la secuencia que codifica una alfa-amilasa.

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

20 La secuencia de ADN que codifica una alfa-amilasa original se puede aislar a partir de cualquier célula o microorganismo que produzca la alfa-amilasa en cuestión, empleando varios métodos bien conocidos en la técnica. En primer lugar, se debe construir una genoteca de ADN genómico y/o de ADNc usando ADN cromosómico o ARN mensajero procedente del organismo productor de la alfa-amilasa que se va a estudiar. Después, si la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa es conocida, se pueden sintetizar sondas de oligonucleótidos homólogas y marcadas, y utilizar para identificar clones que codifican la alfa-amilasa, procedentes de una genoteca genómica preparada a partir
25 del organismo en cuestión. De forma alternativa, una sonda de oligonucleótidos marcada que contiene secuencias homólogas a un gen de alfa-amilasa conocido, se podría emplear como sonda para identificar clones que codifican la alfa-amilasa, usando condiciones de hibridación y de lavado poco rigurosas.

Aún otro método para identificar clones que codifican la alfa-amilasa, implicaría la inserción de fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, la transformación de bacterias negativas para alfa-amilasa con la genoteca de ADN genómico resultante, y después la extensión en placas de las bacterias transformadas, en agar que contiene un sustrato para la alfa-amilasa, permitiendo de ese modo identificar los clones que expresan la alfa-amilasa.
30

De forma alternativa, la secuencia de ADN que codifica la enzima se puede preparar de forma sintética por métodos establecidos de forma convencional, p. ej., el método de la fosforamidita descrito por S.L. Beaucage y M.H. Caruthers (1981) o el método descrito por Mattes et al. (1984). En el método de la fosforamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, p. ej., en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se reasocian, se ligan y se clonan en los vectores apropiados.
35

Finalmente, la secuencia de ADN puede ser de origen mixto genómico y sintético, de origen mixto sintético y de ADNc o de origen mixto genómico y de ADNc, preparada mediante la ligación de fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (si fuera apropiado, los fragmentos correspondientes a varias partes de la secuencia completa de ADN), de acuerdo con técnicas convencionales. La secuencia de ADN también se puede preparar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando cebadores específicos, por ejemplo, como se describe en el documento de EE.UU. 4.683.202 o R.K. Saiki et al. (1988).
40

Mutagénesis dirigida al sitio

45 Una vez que se ha aislado una secuencia de ADN que codifica la alfa-amilasa, y que se han identificado los sitios deseables para la mutación, se pueden introducir mutaciones usando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios deseados para la mutación; los nucleótidos mutantes se insertan durante la síntesis de oligonucleótidos. En un método específico, se crea un hueco en el ADN monocatenario que conecta la secuencia que codifica la alfa-amilasa, en un vector que es portador del gen de la
50 alfa-amilasa. A continuación, el nucleótido sintético, que es portador de la mutación deseada, se reasocia con una porción homóloga del ADN monocatenario. El hueco restante se rellena después con la polimerasa I de ADN (fragmento Klenow) y se liga la estructura artificial, usando una ligasa de T4. Un ejemplo específico de este método está descrito en Morinaga et al. (1984). El documento de EE.UU. 4.760.025 describe la introducción de oligonucleótidos que codifican mutaciones múltiples mediante la realización de alteraciones mínimas del casete. No obstante, en cualquier momento se puede introducir una variedad incluso superior de mutaciones por el método de Morinaga, ya
55 que se puede introducir una multitud de oligonucleótidos de varias longitudes.

Otro método para introducir mutaciones en las secuencias de ADN que codifican una alfa-amilasa está descrito en Nelson y Long (1989). Implica la generación en 3 fases de un fragmento de PCR que contiene la mutación deseada, introducida usando una cadena de ADN sintetizada químicamente como uno de los cebadores en las reacciones de la PCR. A partir del fragmento generado por PCR, un fragmento de ADN que es portador de la mutación se puede aislar mediante una escisión con endonucleasas de restricción y reinsertarlo en un plásmido de expresión.

Mutagénesis aleatoria

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

La mutagénesis aleatoria de una secuencia de ADN que codifica una alfa-amilasa original se puede realizar convenientemente usando cualquier método conocido en la técnica.

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

- (a) una secuencia de ADN que codifica la alfa-amilasa original se somete a una mutagénesis aleatoria,
- (b) la secuencia de ADN mutada obtenida en la fase (a) se expresa en una célula hospedadora, y
- (c) las células hospedadoras que expresan una variante de alfa-amilasa que tiene una propiedad alterada (es decir, termoestabilidad) se seleccionan con respecto a la alfa-amilasa original.

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

Ejemplos de un agente mutagenizante físico o químico adecuado para este propósito, incluyen la radiación ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), O-metil hidroxilamina, ácido nitroso, metano sulfonato de etilo (EMS), bisulfito de sodio, ácido fórmico y análogos de nucleótidos. Cuando se emplean tales agentes, la mutagénesis se realiza normalmente incubando la secuencia de ADN que codifica la enzima original que debe ser mutagenizada en presencia del agente mutagenizante seleccionado, en condiciones adecuadas para que la mutagénesis tenga lugar, y seleccionando el ADN mutado que tiene las propiedades deseadas. Cuando la mutagénesis se realiza mediante el uso de un oligonucleótido, el oligonucleótido puede estar dopado o adicionado con los tres nucleótidos no originales durante la síntesis del oligonucleótido, en las posiciones que deben ser cambiadas. El dopado o adicionado se puede realizar de modo que se eviten los codones de aminoácidos indeseados. El oligonucleótido dopado o adicionado se puede incorporar en el ADN que codifica la enzima alfa-amilasa mediante cualquier técnica publicada, usando p. ej., PCR, LCR o cualquier polimerasa y ligasa de ADN según se considere apropiado. Preferiblemente, el dopado se realiza usando un "dopado aleatorio constante", en donde el porcentaje de tipo silvestre y de mutación en cada posición, está predefinido. Además, el dopado puede estar dirigido hacia una preferencia para introducir ciertos nucleótidos y, por tanto, hacia una preferencia para introducir uno o varios residuos de aminoácidos específicos. El dopado se puede realizar, p. ej., de modo que permita la introducción del 90% de tipo silvestre y el 10% de mutaciones en cada posición. Una consideración adicional para la elección de un esquema de dopado se basa en la genética así como en las limitaciones estructurales de las proteínas. El esquema de dopado se puede realizar usando el programa DOPE, que, entre otras cosas, asegura que se evite la introducción de codones de parada. Cuando se utiliza la mutagénesis generada por PCR, bien un gen tratado o uno no tratado químicamente que codifica una alfa-amilasa original, es sometido a PCR en condiciones que aumentan la incorporación errónea de nucleótidos (Deshler 1992; Leung et al., *Technique*, vol.1, 1989, págs. 11-15). Una cepa mutágena de *E. coli* (Fowler et al., *Molec. Gen. Genet.*; 133, 1974; págs. 179-191), *S. cerevisiae* o cualquier otro organismo microbiano se puede emplear para la mutagénesis aleatoria del ADN que codifica la alfa-amilasa, p. ej., transformando un plásmido que contiene la glicosilasa original en la cepa mutágena, cultivando la cepa mutágena con el plásmido y aislando el plásmido mutado desde la cepa mutágena. El plásmido mutado se puede transformar posteriormente en el organismo de expresión. La secuencia de ADN que se va a mutagenizar puede estar presente convenientemente en una genoteca genómica o de ADNc, preparada a partir de un organismo que expresa la alfa-amilasa original. De forma alternativa, la secuencia de ADN puede estar presente en un vector adecuado, tal como un plásmido o un bacteriófago que, como tal, se puede incubar con ella o por el contrario, puede estar expuesta al agente mutagenizante. El ADN que se va a mutagenizar también puede estar presente en una célula hospedadora, integrado en el genoma de dicha célula o presente en un vector contenido en la célula. Finalmente, el ADN que se va a mutagenizar puede estar en forma aislada. Se entenderá que la secuencia de ADN que se va a someter a mutagénesis aleatoria es preferiblemente una secuencia de ADNc o de ADN genómico. En algunos casos puede ser conveniente amplifi-

car la secuencia de ADN mutada antes de realizar la fase de expresión b) o la fase de selección c). Tal amplificación se puede realizar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, siendo el método actualmente preferido la amplificación generada por PCR, usando cebadores oligonucleótidos preparados en base a la secuencia de ADN o de aminoácidos de la enzima original. Después de la incubación con el agente mutagenizante o una exposición al mismo, el ADN mutado se expresa mediante el cultivo de una célula hospedadora adecuada que es portadora de la secuencia de ADN en condiciones que permiten que tenga lugar la expresión. La célula hospedadora usada para este propósito puede ser una que se ha transformado con la secuencia de ADN mutada, opcionalmente presente en un vector, o una que es transportada por la secuencia de ADN que codifica la enzima original durante el tratamiento de mutagénesis. Ejemplos de células hospedadoras adecuadas, son los siguientes: bacterias gram positivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; y bacterias gram negativas tales como *E. coli*. La secuencia de ADN mutada puede comprender además una secuencia de ADN que codifica funciones que permiten la expresión de la secuencia de ADN mutada.

15 Mutagénesis aleatoria localizada

La mutagénesis aleatoria puede estar localizada ventajosamente en una parte de la alfa-amilasa original en cuestión. Esto puede ser ventajoso, p. ej., cuando ciertas regiones de la enzima han sido identificadas por tener una importancia particular para una propiedad dada de la enzima, y cuando se espera que modificaciones den como resultado una variante con propiedades mejoradas. Tales regiones se pueden identificar normalmente cuando la estructura terciaria de la enzima original ha sido dilucidada y está relacionada con la función de la enzima.

La mutagénesis aleatoria localizada, o específica de una región, se realiza convenientemente usando técnicas de mutagénesis generada por PCR según el modo descrito anteriormente o cualquier otra técnica adecuada conocida en la técnica. De forma alternativa, la secuencia de ADN que codifica la parte de la secuencia de ADN que se va a modificar se puede aislar, p. ej., mediante la inserción en un vector adecuado, y dicha parte se puede someter posteriormente a mutagénesis usando cualquiera de los métodos de mutagénesis mencionados anteriormente.

25 Métodos alternativos para proporcionar variantes de alfa-amilasa

Los métodos alternativos para proporcionar variantes de la invención incluyen un método de transposiciones genéticas conocido en la técnica que incluye, p. ej., los métodos descritos en los documentos WO 95/22625 (de Affymax Technologies N.V.) y WO 96/00343 (de Novo Nordisk A/S).

30 Expresión de variantes de alfa-amilasa

De acuerdo con la invención, una secuencia de ADN que codifica la variante producida por los métodos descritos anteriormente, o por cualquier método alternativo conocido en la técnica, se puede expresar en forma enzimática, usando un vector de expresión que normalmente incluye secuencias de control que codifican un promotor, un operador, un sitio de unión al ribosoma, una señal de iniciación de la traducción y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores.

El vector de expresión recombinante que es portador de la secuencia de ADN que codifica una variante de alfa-amilasa de la invención, puede ser cualquier vector que puede estar sometido de forma conveniente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá frecuentemente de la célula hospedadora en la que debe ser introducido. Por tanto, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector, que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido, un bacteriófago o un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. De forma alternativa, 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 o los cromosomas en los que se ha integrado.

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

El vector de expresión de la invención puede comprender también un terminador de la transcripción adecuado y, en eucariotas, secuencias de poliadenilación conectadas funcionalmente con la secuencia de ADN que codifica la va-

riante de alfa-amilasa de la invención. Las secuencias de terminación y de poliadenilación se pueden obtener de manera adecuada a partir de las mismas fuentes que el promotor.

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

El vector puede comprender también un marcador seleccionable, p. ej., un gen cuyo producto complementa una carencia en la célula hospedadora, tal como los genes *dal* de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, o uno que confiere resistencia a los antibióticos, tal como resistencia a la ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Además, el vector puede comprender marcadores de selección de *Aspergillus* tales como *amdS*, *argB*, *niaD* y *sC*, un marcador que proporciona resistencia a la higromicina, o la selección se puede realizar mediante cotransformación, p. ej., como se describe en el documento WO 91/17243.

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

Los procedimientos usados para ligar la estructura artificial de ADN de la invención que codifica una variante de alfa-amilasa, el promotor, el terminador y otros elementos, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor, 1989).

La célula de la invención, que comprende o bien una estructura artificial de ADN o un vector de expresión de la invención tal como se ha definido anteriormente, se utiliza ventajosamente como una célula hospedadora en la producción recombinante de una variante de alfa-amilasa de la invención. La célula se puede transformar con la estructura artificial de ADN de la invención que codifica la variante, integrando convenientemente la estructura artificial de ADN (en una o varias copias) en el cromosoma hospedador. Esta integración se considera generalmente que es una ventaja, puesto que la secuencia de ADN tiene más probabilidad de ser mantenida de manera estable en la célula. La integración de las estructuras artificiales de ADN en el cromosoma hospedador se puede realizar según métodos convencionales, p. ej., mediante recombinación homóloga o heteróloga. De forma alternativa, la célula se puede transformar con un vector de expresión según se ha descrito anteriormente en relación con los diferentes tipos de células hospedadoras.

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

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

El organismo de levadura se puede seleccionar de forma favorable a partir de una especie de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*. El hongo filamentoso puede pertenecer ventajosamente a una especie de *Aspergillus*, p. ej., *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*. Las células fúngicas se pueden transformar mediante un proceso que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguida de una regeneración de la pared celular, de una manera conocida por sí misma. Un procedimiento adecuado para la transformación de células hospedadoras de *Aspergillus* está descrito en el documento EP 238 023.

En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para producir una variante de alfa-amilasa de la invención, cuyo método comprende el cultivo de una célula hospedadora, según el modo descrito anteriormente, en condiciones propicias para la producción de la variante y la recuperación de la variante a partir de las células y/o del medio de cultivo.

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

La variante de alfa-amilasa secretada desde las células hospedadoras se puede recuperar convenientemente a partir del medio de cultivo por procedimientos bien conocidos, incluyendo la separación de las células del medio mediante centrifugación o filtración, y la precipitación de los componentes proteínicos del medio mediante una sal, tal como sulfato de amonio, seguida por el uso de procedimientos cromatográficos, tales como la cromatografía de

intercambio iónico, cromatografía de afinidad o similares.

Aplicaciones industriales

5 Las variantes de alfa-amilasa de esta invención poseen propiedades valiosas que permiten una variedad de aplicaciones industriales. En particular, las variantes enzimáticas de la invención son aplicables como un componente para composiciones detergentes para el lavado de ropa, lavavajillas y limpieza de superficies duras. Numerosas variantes son particularmente útiles en la producción de edulcorantes y etanol, p. ej., etanol para combustible, para bebidas o industrial, a partir de almidón y/o para el eliminar el apresto textil. Las condiciones para procesos convencionales de conversión del almidón, incluyendo los procesos de licuefacción y/o de sacarificación del almidón, están descritos, p. ej., en los documento de EE.UU. 3.912.590 y las publicaciones de patentes EP nº 252 730 y 63 909.

10 Producción de edulcorantes a partir de almidón:

15 Un procedimiento "tradicional" para la conversión de almidón en jarabes de fructosa consiste normalmente en tres procesos enzimáticos consecutivos, es decir, un proceso de licuefacción seguido de un proceso de sacarificación y un proceso de isomerización. Durante el proceso de licuefacción, el almidón es degradado a dextrinas por una alfa-amilasa (p. ej., Termamyl®) a valores de pH entre 5,5 y 6,2 y a temperaturas de 95-160°C, durante un periodo de aprox. 2 horas. Para asegurar una estabilidad enzimática óptima en estas condiciones, se añade 1 mM de calcio (40 ppm de iones de calcio libre).

20 Después del proceso de licuefacción, las dextrinas se convierten en dextrosa mediante la adición de una glucoamilasa (p. ej., AMG®) y una enzima desramificante, tal como una isoamilasa o una pululanasa (p. ej., Promozyyme®). Antes de esta fase, el pH se reduce a un valor inferior a 4,5, manteniendo la temperatura elevada (por encima de 95°C), y la actividad licuefactante de la alfa-amilasa se desnaturaliza. La temperatura se reduce a 60°C, y se añade la enzima glucoamilasa y la desramificante. El proceso de sacarificación continúa durante 24-72 horas.

Después del proceso de sacarificación, el pH se incrementa hasta un valor en el intervalo de 6-8, preferiblemente pH 7,5, y el calcio se elimina mediante intercambio iónico. El jarabe de dextrosa se convierte después en jarabe rico en fructosa usando, p. ej., una glucosaisomerasa inmovilizada (tal como Sweetzyme®).

25 Al menos se podía predecir una mejora enzimática de este proceso: la reducción de la dependencia del calcio de la alfa-amilasa licuefactante. Se requiere una adición de calcio libre para asegurar una estabilidad adecuadamente alta de la alfa-amilasa, pero el calcio libre inhibe fuertemente la actividad de la glucosaisomerasa y se tiene que eliminar mediante una operación individual costosa, hasta el punto de reducir el nivel de calcio libre por debajo de 3-5 ppm. Se podrían ahorrar costes si esta operación se pudiera evitar y el proceso de licuefacción se realizara sin la adición de iones de calcio libre.

Para conseguirlo, se requiere una alfa-amilasa de tipo Termamyl que sea menos dependiente de calcio y que sea estable y muy activa a concentraciones bajas de calcio libre (< 40 ppm). Una alfa-amilasa de tipo Termamyl de este tipo debería tener un pH óptimo en un intervalo de pH de 4,5-6,5, preferiblemente en el intervalo de 4,5-5,5.

35 Una variante de alfa-amilasa de la invención se puede utilizar en un aspecto de la invención, para la licuefacción de almidón, en una composición detergente, tal como composiciones para lavandería, lavado de platos y limpieza de superficies duras; producción de etanol, tal como la producción de etanol para combustible, bebidas y etanol industrial; eliminar el apresto de tejidos, telas o prendas de vestir, etc.

MATERIALES Y MÉTODOS

Enzimas:

40 **LE174:** variante de alfa-amilasa híbrida:

LE174 es una alfa-amilasa híbrida de tipo Termamyl que es idéntica a la secuencia de Termamyl, es decir, la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en SEQ ID NO: 4, excepto que los 35 residuos de aminoácidos N-terminales (de la proteína madura) han sido sustituidos por los 33 residuos N-terminales de BAN (proteína madura), es decir, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO: 6, que además tiene las mutaciones siguientes: H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S (SEQ ID NO: 4).

LE429: variante de alfa-amilasa híbrida:

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

Dextrozyme® E: una mezcla equilibrada de glucoamilasa (AMG) y pululanasa obtenible a partir de cepas selecciona-

das de *Aspergillus niger* y *Bacillus deramificans* (disponible en Novo Nordisk A/S)

Fermentación y purificación de variantes de alfa-amilasa

Una cepa de *B. subtilis* que alberga el plásmido de expresión pertinente se siembra sobre una placa de agar LB con 10 microg/ml de kanamicina procedente de un cultivo madre a -80°C, y se deja crecer durante una noche a 37°C.

- 5 Las colonias se transfieren a 100 ml de medio BPX complementado con 10 microg/ml de kanamicina en un matraz de agitación de 500 ml.

Composición del medio BPX:

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

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

- 10 Las células y los restos celulares se eliminan del caldo de fermentación mediante centrifugación a 4500 rpm durante 20-25 minutos. Después, el material sobrenadante se filtra para obtener una solución completamente clara. El material filtrado se concentra y se lava en un filtro UF (membrana de corte 10000) y el tampón se cambia a acetato 20 mM pH 5,5. El material filtrado UF se aplica sobre una S-sefarosa F.F. y se lleva a cabo la elución por fases con NaCl 0,2 M en el mismo tampón. El material eluido se dializa frente a Tris 10 mM, pH 9,0 y se aplica a una Q-sefarosa F.F. y se eluye con un gradiente lineal de NaCl 0-0,3M en 6 volúmenes de columna. Las fracciones que contienen la actividad (medida por el ensayo Phadebas) son agrupadas, el pH se ajusta a pH 7,5 y el color restante se elimina por un tratamiento con 0,5% p/vol de carbón activo durante 5 minutos.
- 15

Determinación de la actividad - (KNU)

- 20 Una Unidad Kilo de alfa-amilasa (1 KNU) es la cantidad de enzima que hidroliza 5,26 g de almidón (Merck, Amylum Solubile, Erg. B 6, lote 9947275) por hora en el método estándar de Novo Nordisk para la determinación de alfa-amilasa basada en las siguientes condiciones:

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

Una descripción detallada del método analítico de Novo Nordisk (AF 9) está disponible bajo petición.

Ensayo de la actividad alfa-amilasa

- 25 La actividad alfa-amilasa se determina por un método que emplea comprimidos Phadebas® como sustrato. Los comprimidos Phadebas (prueba de la amilasa Phadebas®, suministrada por Pharmacia Diagnostic) contienen un polímero de almidón reticulado insoluble de color azul, que se ha mezclado con albúmina de suero bovino y una sustancia tampón, y se forman los comprimidos.

- 30 Para cada medición individual, un comprimido se suspende en un tubo que contiene 5 ml de tampón Britton-Robinson 50 mM (ácido acético 50 mM, ácido fosfórico 50 mM, ácido bórico 50 mM, CaCl₂ 0,1 mM, pH ajustado al valor de interés con NaOH). La prueba se realiza en un baño de agua a la temperatura de interés. La alfa-amilasa que se va a someter a ensayo, se diluye en x ml de tampón Britton-Robinson 50 mM. Se añade 1 ml de esta solución de alfa-amilasa a los 5 ml de tampón Britton-Robinson 50 mM. El almidón es hidrolizado por la alfa-amilasa proporcionando fragmentos azules solubles. La absorbancia de la solución azul resultante, medida espectrofotométricamente a 620 nm, es una función de la actividad alfa-amilasa.
- 35

Es importante que la absorbancia medida a 620 nm después de 10 o 15 minutos de incubación (tiempo de la prueba) esté en el intervalo de 0,2 a 2,0 unidades de absorbancia a 620 nm. En este intervalo de absorbancia existe una

- linealidad entre la actividad y la absorbancia (ley de Lambert-Beer). Por tanto, la dilución de la enzima se debe ajustar para que se adapte a este criterio. Bajo un conjunto especificado de condiciones (temp., pH, tiempo de reacción, condiciones del tampón), 1 mg de una alfa-amilasa dada hidrolizará una cierta cantidad de sustrato y se producirá un color azul. La intensidad del color se mide a 620 nm. La absorbancia medida es directamente proporcional a la actividad específica (actividad/mg de proteína alfa-amilasa pura) de la alfa-amilasa en cuestión, bajo el conjunto de condiciones dadas.

Determinación de la actividad específica

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

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

- La variante se almacena en TRIS 20 mM pH 7,5, CaCl₂ 0,1 mM, y se somete a ensayo a 30°C, tampón Britton-Robinson 50 mM, CaCl₂ 0,1 mM. La actividad de pH se mide a pH 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 7,0, 8,0, 9,5, 10 y 10,5, usando el ensayo Phadebas descrito anteriormente.

Determinación de la actividad AGU y como AGU/mg

- Una Unidad Novo de amiloglucosidasa (AGU) se define como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto a 37°C y pH 4,3. Una descripción detallada del método analítico (AEL-SM-0131) está disponible bajo petición a Novo Nordisk.

La actividad se determina como AGU/ml por un método modificado según (AEL-SM-0131), usando el kit Glucose GOD-Perid de Boehringer Mannheim, 124036. Patrón: patrón de AMG, lote 7-1195, 195 AGU/ml.

- Se incuban 375 microL de sustrato (1% de maltosa en acetato de sodio 50 mM, pH 4,3) durante 5 minutos a 37°C. Se añaden 25 microL de enzima diluida en acetato sódico. La reacción se detiene después de 10 minutos, mediante la adición de 100 microL de NaOH 0,25 M. Se transfieren 20 microL a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se añaden 200 microL de solución GOD-Perid. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, se mide la absorbancia a 650 nm y la actividad se calcula en AGU/ml a partir del patrón de AMG.

- La actividad específica en AGU/mg se calcula entonces a partir de la actividad (AGU/ml), dividida por la concentración de proteína (mg/ml).

EJEMPLOS

EJEMPLO 1 (Ejemplo de referencia)

Construcción de variantes de Termamyl de acuerdo con la invención

- Termamyl (alfa-amilasa de *B. licheniformis* SEQ ID NO: 4) se expresa en *B. subtilis* a partir de un plásmido denominado pDN1528. Este plásmido contiene el gen completo que codifica Termamyl, *amyL*, cuya expresión está dirigida por su propio promotor. Además, el plásmido contiene el origen de replicación, *ori*, del plásmido pUB110 y el gen *cat* del plásmido pC194 que confiere resistencia frente al cloranfenicol. pDN1528 se muestra en la Fig. 9 del documento WO 96/23874. Se preparó un vector por mutagénesis específica que contenía una parte importante de la región que codificaba SEQ ID NO: 3. Las características importantes de este vector, denominado pJeEN1, incluyen un origen de replicación obtenido a partir de los plásmidos pUC, el gen *cat* que confiere resistencia frente al cloranfenicol y una versión que contiene el marco de lectura del gen *bla*, cuyo tipo silvestre confiere normalmente resistencia frente a la ampicilina (fenotipo amp^R). Esta versión mutada da como resultado un fenotipo amp^S. El plásmido pJeEN1 se muestra en la Fig. 10 del documento WO 96/23874, y el origen de replicación de *E. coli*, *ori*, *bla*, *cat*, la versión truncada en 5' del gen de la amilasa Termamyl y sitios de restricción seleccionados, se indican en el plásmido.

- Las mutaciones se introducen en *amyL* por el método descrito por Deng y Nickoloff (1992, Anal. Biochem. 200, págs. 81-88), excepto que los plásmidos con el "cebador de selección" (cebador nº 6616; véase más abajo) incorporado, se seleccionan en función del fenotipo amp de células *E. coli* transformadas que son portadoras de un plásmido con un gen *bla* reparado, en lugar de emplear la selección mediante digestión con enzimas de restricción, descrita por Deng y Nickoloff. Los productos químicos y las enzimas que se emplean para la mutagénesis se obtuvieron a partir del kit de mutagénesis Chameleons de Stratagene (número de catálogo 200509).

Después de verificar la secuencia de ADN en los plásmidos variantes, el gen truncado, que contiene la alteración deseada, se subclona en pDN1528 como un fragmento *PstI-EcoRI* y se transforma en la cepa de *Bacillus subtilis* SHA273 agotada en tanto a proteasa y amilasa (descrita en los documentos WO92/11357 y WO95/10603) para expresar la enzima variante.

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

La variante de Termamyl A52W + V54W fue construida usando el siguiente cebador de mutagénesis (escrito de 5' a

ES 2 618 608 T3

3', de izquierda a derecha):

PG GTC GTA GGC ACC GTA GCC CCA ATC CCA TTG GCT CG (SEQ ID NO: 10)

El cebador nº 6616 (escrito de 5' a 3', de izquierda a derecha; P indica un fosfato 5'):

P CTG TGA CTG GTG AGT ACT CAA CCA AGT C (SEQ ID NO: 11)

- 5 La variante de Termamyl V54E fue construida usando el siguiente cebador de mutagénesis (escrito de 5'-3', de izquierda a derecha):

PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCC TCA TCC GCT TG (SEQ ID NO: 12)

La variante de Termamyl V54M fue construida usando el siguiente cebador de mutagénesis (escrito de 5'-3', de izquierda a derecha):

- 10 PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCC ATA TCC GCT TG (SEQ ID NO: 13)

La variante de Termamyl V54I fue construida usando el siguiente cebador de mutagénesis (escrito de 5'-3', de izquierda a derecha):

PGG TCG TAG GCA CCG TAG CCA ATA TCC GCT TG (SEQ ID NO: 14)

- 15 Las variantes de Termamyl Y290E e Y290K fueron construidas usando el siguiente cebador de mutagénesis (escrito de 5'-3', de izquierda a derecha):

PGC AGC ATG GAA CTG CTY ATG AAG AGG CAC GTC AAA C (SEQ ID NO: 15)

Y representa una mezcla igual de C y T. La presencia de un codón que codifica glutamato o lisina en la posición 290 fue verificada por secuenciación del ADN.

- 20 La variante de Termamyl N190F fue construida usando el siguiente cebador de mutagénesis (escrito de 5'-3', de izquierda a derecha):

PCA TAG TTG CCG AAT TCA TTG GAA ACT TCC C (SEQ ID NO: 16)

La variante de Termamyl N188P + N190F fue construida usando el siguiente cebador de mutagénesis (escrito de 5'-3', de izquierda a derecha):

PCA TAG TTG CCG AAT TCA GGG GAA ACT TCC CAA TC (SEQ ID NO: 17)

- 25 La variante de Termamyl H140K + H142D fue construida usando el siguiente cebador de mutagénesis (escrito de 5'-3', de izquierda a derecha):

PCC GCG CCC CGG GAA ATC AAA TTT TGT CCA GGC TTT AAT TAG (SEQ ID NO: 18)

La variante de Termamyl H156Y fue construida usando el siguiente cebador de mutagénesis (escrito de 5'-3', de izquierda a derecha):

- 30 PCA AAA TGG TAC CAA TAC CAC TTA AAA TCG CTG (SEQ ID NO: 19)

La variante de Termamyl A181T fue construida usando el siguiente cebador de mutagénesis (escrito de 5'-3', de izquierda a derecha):

PCT TCC CAA TCC CAA GTC TTC CCT TGA AAC (SEQ ID NO: 20)

- 35 La variante de Termamyl A209V fue construida usando el siguiente cebador de mutagénesis (escrito de 5'-3', de izquierda a derecha):

PCTT AAT TTC TGC TAC GAC GTC AGG ATG GTC ATA ATC (SEQ ID NO: 21)

La variante de Termamyl Q264S fue construida usando el siguiente cebador de mutagénesis (escrito de 5'-3', de izquierda a derecha):

PCG CCC AAG TCA TTC GAC CAG TAC TCA GCT ACC GTA AAC (SEQ ID NO: 22)

- 40 La variante de Termamyl S187D fue construida usando el siguiente cebador de mutagénesis (escrito de 5'-3', de izquierda a derecha):

PGC CGT TTT CAT TGT CGA CTT CCC AAT CCC (SEQ ID NO: 23)

ES 2 618 608 T3

La variante de Termamyl DELTA(K370-G371-D372) (es decir, delección de los residuos de aminoácidos nº 370, 371 y 372) fue construida usando el siguiente cebador de mutagénesis (escrito de 5'-3', de izquierda a derecha):

PGG AAT TTC GCG CTG ACT AGT CCC GTA CAT ATC CCC (SEQ ID NO: 24)

5 La variante de Termamyl DELTA(D372-S373-Q374) fue construida usando el siguiente cebador de mutagénesis (escrito de 5'-3', de izquierda a derecha):

PGG CAG GAA TTT CGC GAC CTT TCG TCC CGT ACA TAT C (SEQ ID NO: 25)

10 Las variantes de Termamyl A181T y A209V se combinaron en A181T + A209V mediante digestión del plásmido similar a pDN1528 que contenía A181T (es decir, pDN1528 que contenía dentro de *amyL* la mutación, dando como resultado la alteración A181T) y el plásmido similar a pDN1528 que contenía A209V (es decir, pDN1528 que contenía dentro de *amyL* la mutación, dando como resultado la alteración A209V) con la enzima de restricción ClaI que corta los plásmidos similares a pDN1528 dos veces, dando como resultado un fragmento de 1116 pb y la parte del vector (es decir, que contiene el origen de replicación del plásmido) de 3850 pb. El fragmento que contenía la mutación A209V y la parte del vector que contenía la mutación A181T se purificaron con el kit de extracción en gel QIAquick (adquirido en QIAGEN) después de la separación en un gel de agarosa. El fragmento y el vector se ligaron y se transformaron en la cepa de *Bacillus subtilis* agotada en tanto a proteasa y amilasa, mencionada anteriormente. El plásmido procedente de *amy+* (zonas aclaradas sobre placas de agar que contienen almidón) y los transformantes resistentes al cloranfenicol, fueron analizados en busca de una presencia de ambas mutaciones en el plásmido.

De un modo similar al descrito anteriormente, H156Y y A209V se combinaron empleando las endonucleasas de restricción Acc65I y EcoRI, proporcionando H156Y + A209V.

20 H156Y + A209V y A181T + A209V se combinaron en H156Y + A181T + A209V mediante el uso de las endonucleasas de restricción Acc65I y HindIII.

25 Los 35 residuos N-terminales de la parte madura de la variante de Termamyl H156Y + A181T + A209V fueron sustituidos por los 33 residuos N-terminales de la alfa-amilasa de *B. amyloliquefaciens* (SEQ ID NO: 4) (que en el presente contexto se denomina BAN) mediante una metodología SOE-PCR (Higuchi et al. 1988, Nucleic Acids Research 16:7351) del modo siguiente:

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

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

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

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

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

35 Un fragmento de aproximadamente 130 pb se amplificó en una primera PCR denominada PCR1 con los cebadores 19364 y 19362 sobre un fragmento de ADN que contenía el gen que codificaba la alfa-amilasa de *B. amyloliquefaciens*.

Un fragmento de aproximadamente 400 pb se amplificó en otra PCR denominada PCR2 con los cebadores 19363 y 1C sobre el molde pDN1528.

40 La PCR1 y la PCR2 fueron purificadas a partir de un gel de agarosa y se utilizaron como moldes en la PCR3 con los cebadores 19364 y 1C, lo que dio como resultado un fragmento de aproximadamente 520 pb. Este fragmento contiene por tanto una parte del ADN que codifica el extremo N-terminal de BAN, fusionado a una parte del ADN que codifica Termamyl a partir del aminoácido 35.

45 El fragmento de 520 pb se subclonó en un plásmido similar a pDN1528 (que contenía el gen que codificaba la variante de Termamyl H156Y + A181T + A209V) mediante digestión con las endonucleasas de restricción *Pst*I y *Sac*II, ligación y transformación de la cepa de *B. subtilis* como se ha descrito anteriormente. La secuencia de ADN entre los sitios de restricción *Pst*I y *Sac*II fue verificada mediante secuenciación del ADN en plásmidos extraídos a partir de *amy+* y transformantes resistentes al cloranfenicol.

La estructura artificial final que contenía el extremo N-terminal correcto de BAN y H156Y + A181T + A209V, se denominó BAN(1-35) + H156Y + A181T + A209V.

50 N190F se combinó con BAN(1-35) + H156Y + A181T + A209V proporcionando BAN(1-35) + H156Y + A181T + N190F + A209V mediante la realización de una mutagénesis como se ha descrito anteriormente, excepto que la secuencia de *amyL* en pJeEN1 estaba sustituida por la secuencia de ADN que codificaba la variante de Termamyl BAN(1-35) + H156Y + A181T + A209V.

Q264S se combinó con BAN(1-35) + H156Y + A181T + A209V proporcionando BAN(1-35) + H156Y + A181T + A209V + Q264S realizando una mutagénesis como se ha descrito anteriormente, excepto que la secuencia de amyL en pJeEN estaba sustituida por la secuencia de ADN que codificaba la variante de Termamyl BAN(1-35) + H156Y + A181T + A209V.

- 5 BAN(1-35) + H156Y + A181T + A209V + Q264S y BAN(1-35) + H156Y + A181T + N190F + A209V se combinaron en BAN(1-35) + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S utilizando las endonucleasas de restricción BsaHI (el sitio de BsaHI se introdujo cerca de la mutación A209V) y PstI.

- 10 I201F se combinó con BAN(1-35) + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S proporcionando BAN(1-35) + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + I201F (SEQ ID NO: 2) realizando una mutagénesis tal y como se ha descrito anteriormente. Se utilizó el cebador de mutagénesis AM100, se introdujo la sustitución I201F y se eliminó al mismo tiempo un sitio de restricción ClaI, que facilitaba la localización puntual de mutantes.

Cebador AM100:

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

EJEMPLO 2 (Ejemplo de referencia)

- 15 **Construcción de variantes de alfa-amilasa de tipo Termamyl con un patrón de escisión alterado de acuerdo con la invención**

- 20 La variante de la alfa-amilasa termoestable de *B. licheniformis* que comprende los 445 residuos de aminoácidos C-terminales de la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que se muestra en SEQ ID NO: 4 y los 37 residuos de aminoácidos N-terminales de la alfa-amilasa obtenida a partir de *B. amyloliquefaciens* mostrada en SEQ ID NO: 6, y que comprende además las siguientes mutaciones: H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + I201F (la construcción de esta variante se describe en el Ejemplo 1, y la secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 2) tiene una capacidad reducida para escindir un sustrato cerca del punto de ramificación.

- 25 En un intento de mejorar aún más la capacidad reducida de escindir un sustrato cerca del punto de ramificación, de dicha variante de alfa-amilasa, se llevó a cabo una mutagénesis dirigida al sitio usando el método de Mega-cebador como está descrito por Sarkar y Sommer, 1990 (BioTechniques 8: 404-407):

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

- 30 El cebador 27274 específico de gen y el cebador mutagénico AM115 se utilizan para amplificar mediante PCR un fragmento de ADN de aproximadamente 440 pb procedente de un plásmido similar a pDN1528 (que alberga las mutaciones BAN(1-35) + H156Y + A181T + N190F + I201F + A209V + Q264S en el gen que codifica la amilasa procedente de SEQ ID NO: 4).

El fragmento de 440 pb se purifica a partir de un gel de agarosa y se utiliza como un Mega-cebador junto con el cebador 113711 en una segunda PCR llevada a cabo sobre el mismo molde.

- 35 El fragmento resultante de aproximadamente 630 pb se digiere con las enzimas de restricción EcoRV y Acc65I y el fragmento de ADN resultante de aproximadamente 370 pb se purifica y se liga con el plásmido similar a pDN1528, digerido con las mismas enzimas.

Células competentes de *Bacillus subtilis* SHA273 (bajas en amilasa y proteasa) se transforman con la ligación y los transformantes resistentes a cloranfenicol son comprobados mediante una secuenciación del ADN para verificar la presencia de las mutaciones correctas en el plásmido.

Cebador 27274:

- 40 5' CATAGTTGCCGAATTCATTGGAAACTTCCC 3' (SEQ ID NO: 31)

Cebador 1B:

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

Cebador AM115:

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

- 45 La construcción de LE314: híbrido BAN/Termamyl + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + A52S se realiza de una forma similar, excepto que se utiliza el cebador mutagénico AM116.

AM116:

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

La construcción de LE315: híbrido BAN/Termamyl + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + A52S + V54N se realiza de una forma similar, excepto que se utiliza el cebador mutagénico AM117.

AM117:

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

5 La construcción de LE316: híbrido BAN/Termamyl + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + T49L se realiza de una forma similar, excepto que se utiliza el cebador mutagénico AM118.

AM118:

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

10 La construcción de LE317: híbrido BAN/Termamyl + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + T49L + G107A se realiza de una forma similar, excepto que se utilizan simultáneamente el cebador mutagénico AM118 y el cebador mutagénico AM119.

AM119:

5' CAACCACAAAGCCGGCGCTGATGCG 3' (SEQ ID NO: 37)

15 La construcción de LE318: híbrido BAN/Termamyl + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + A52S + V54N + T49L + G107A se realiza de una forma similar, excepto que se utilizan simultáneamente el cebador mutagénico AM120 y el cebador mutagénico AM119.

AM120:

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

20 La construcción de LE319: híbrido BAN/Termamyl + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + A52S + V54N + T49L se realiza de una forma similar, excepto que se utiliza el cebador mutagénico AM120.

La construcción de LE320: híbrido BAN/Termamyl + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + G107A se realiza de una forma similar, excepto que se utiliza el cebador mutagénico AM119.

La construcción de LE322: híbrido BAN/Termamyl + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + Q51R + A52S se realiza de una forma similar, excepto que se utiliza el cebador mutagénico AM121.

25 AM121:

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

La construcción de LE323: híbrido BAN/Termamyl + H156Y + A181T + N190F + A209V + Q264S + A52N se realiza de una forma similar, excepto que se utiliza el cebador mutagénico AM122.

AM122:

30 5' GAACGAGCCAAAACGACGTGGGCTACGG 3' (SEQ ID NO: 40)

EJEMPLO 3 (Ejemplo de referencia)

Prueba de las variantes de LE429 (sacarificación)

Las condiciones de reacción estándar eran:

Concentración del sustrato	30% p/p
Temperatura	60°C
pH inicial (a 60°C)	5,5

35

Dosificación de la enzima

Glucoamilasa	0,18 AGU/g de DS
Pululanasa	0,06 PUN/g de DS
Alfa-amilasa	10 micro g enzima/g de DS

La Dextrozyme® E se utilizó para proporcionar actividades glucoami-

 lasa y pululanasa

Los sustratos para la sacarificación se prepararon disolviendo almidón de maíz común en agua desionizada y ajustando la sustancia seca a aproximadamente 30% p/p. El pH se ajustó a 5,5 (medido a 60°C), y partes alícuotas de sustrato, correspondientes a 10 g de peso en seco, se transfirieron a frascos de vidrio con tapón azul.

- 5 Los frascos se colocaron a continuación en un baño de agua con agitación, equilibrado a 60°C, y se añadieron las enzimas. El pH se ajustó de nuevo a 5,5 cuando fue necesario. Las muestras se tomaron después de 48 horas de sacarificación; el pH se ajustó a aproximadamente 3,0, y después se calentó en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos para inactivar las enzimas. Después de enfriar, las muestras se trataron con aproximadamente 0,1 g de resina de intercambio iónico con lecho mixto (BIO-RAD 501 X8 (D)) durante 30 minutos en un mezclador giratorio para eliminar las sales y el N soluble. Después de la filtración, la composición de carbohidratos se determinó mediante HPLC. Se obtuvieron los siguientes resultados:

La alfa-amilasa original para las variantes es LE429.

Variantes de alfa-amilasa añadidas	DP ₁	DP ₂	DP ₃	ACT. ESPEC. (NU/mg)
V54N	96,1	1,75	1,18	8200
A52S	95,9	1,80	1,11	18800
A52S + V54N	96,3	1,84	1,08	10000
T49L	96,3	1,77	1,11	12300
T49L + G107A	96,4	1,87	0,72	13600
A52S + V54N + T49L + G107A	80,5	2,55	0,43	10000
A52S + V54N + T49L	95,8	1,76	0,84	8400
G107A	94,4	1,89	1,04	19600
Q51R + A52S	95,9	1,77	1,27	16500
A52N	95,5	1,89	1,56	17600
LE174 (CONTROL)	95,9/ 95,8	1,87/ 1,83	1,17/ 1,35	16000

- 15 En comparación con el control, la presencia de una variante de alfa-amilasa activa de la invención durante la licuefacción, producía una disminución de los niveles de panosa (DP₃).

Especialmente la variante T49L + G107A de LE429 y la variante A52S + V54N + T49L de LE429, respectivamente, daban como resultado una disminución drástica del nivel de panosa (DP₃). Si estas variantes de alfa-amilasa se emplean para una licuefacción del almidón, no será necesario inactivar la enzima antes del inicio de la sacarificación.

20 **EJEMPLO 4 (Ejemplo de referencia)**

Licuefacción y sacarificación de variantes de LE429

El experimento en el Ejemplo 3 se repitió para una serie de otras variantes de LE429 con las mismas condiciones.

El resultado se muestra a continuación:

Variante/perfil de azúcar	DP1	DP2	DP3	DP4+
T49V + G107A	95,9%	1,72%	1,27%	1,11%
T49Y + G107A	95,3%	1,73%	1,29%	1,65%
T49N + G107A	95,7%	1,64%	1,51%	1,18%
T49L + A52S + G107A	95,7%	1,73%	0,95%	1,67%
T49L + A52T + G107A	95,8%	1,66%	1,03%	1,48%
T49L + A52F + G107A	95,7%	1,69%	1,16%	1,42%
T49L + A52L + G107A	95,5%	1,70%	1,40%	1,38%
T49L + A52I + G107A	95,9%	1,72%	1,31%	1,07%

Variante/perfil de azúcar	DP1	DP2	DP3	DP4+
T49L + A52V + G107A	94,7%	1,69%	1,16%	2,44%
T49L + A52V + G107A + A111V	94,5%	1,75%	0,72%	2,99%
LE429	94,9%	1,71%	1,85%	1,51%

EJEMPLO 5 (Ejemplo de referencia)

5 El experimento en el Ejemplo 3 se repitió para una serie de variantes de LE429, excepto que la licuefacción se llevó a cabo a 95°C, pH 6,0 y la sacarificación a 60°C, pH 4,5, 40 ppm de CaCl₂, seguida de inactivación. A continuación, se hace referencia a la variante LE429. Los resultados encontrados son los siguientes:

Variante/perfil de azúcar	DP4+	DP3	DP2	DP1
T49F	1,15	0,92	1,83	96,12
T49D + G107A	0,84	1,03	1,82	96,3
T49I + G107A	0,97	0,64	1,84	96,55
T49L + G107A	0,96	0,81	1,82	96,42
T49L + A52S + G107A	1,37	0,75	1,88	96,01
T49L + A52T + G107A	0,87	0,81	1,8	96,52
T49L + A52F + G107A	0,98	0,83	1,87	96,31
T49V + G107A	0,65	0,8	2,13	96,43
T49Y + G107A	0,83	0,94	1,89	96,35
LE429	1,16	1,21	1,77	95,87

REFERENCIAS CITADAS

- 10 Klein, C., et al., *Biochemistry* 1992, 31, 8740-8746,
 Mizuno, H., et al., *J. Mol. Biol.* (1993) 234, 1282-1283,
 Chang, C., et al., *J. Mol. Biol.* (1993) 229, 235-238,
 Larson, S.B., *J. Mol. Biol.* (1994) 235, 1560-1584,
 Lawson, C.L., *J. Mol. Biol.* (1994) 236, 590-600,
 Qian, M., et al., *J. Mol. Biol.* (1993) 231, 785-799,
 15 Brady, R.L., et al., *Acta Crystallogr. secc. B*, 47, 527-535,
 Swift, H.J., et al., *Acta Crystallogr. secc. B*, 47, 535-544,
 A. Kadziola, Tesis del doctorado: "An alpha-amylase from Barley and its Complex with a Substrate Analogue Inhibitor Studied by X-ray Crystallography", Department of Chemistry University of Copenhagen 1993,
 MacGregor, E.A., *Food Hydrocolloids*, 1987, vol.1, n° 5-6, p.
 20 B. Diderichsen y L. Christiansen, Cloning of a maltogenic amylase from *Bacillus stearothermophilus*, *FEMS Microbiol. letters*: 56: págs. 53-60 (1988)
 Hudson et al., *Practical Immunology*, tercera edición (1989), Blackwell Scientific Publications,
 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor, 1989
 S.L. Beaucage y M.H. Caruthers, *Tetrahedron Letters* 22, 1981, págs. 1859-1869
 Matthes et al., *The EMBO J.* 3, 1984, págs. 801-805.
 25 R.K. Saiki et al., *Science* 239, 1988, págs. 487-491.
 Morinaga et al., (1984, *Biotechnology* 2:646-639)
 Nelson y Long, *Analytical Biochemistry* 180, 1989, págs. 147-151
 Hunkapiller et al., 1984, *Nature* 310:105-111
 R. Higuchi, B. Krummel y R.K. Saiki (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of
 30 DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucl. Acids Res.* 16:7351-7367.
 Dubnau et al., 1971, *J. Mol. Biol.* 56, págs. 209-221.
 Gryczan et al., 1978, *J. Bacteriol.* 134, págs. 318-329.
 S.D. Erlich, 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, págs. 1680-1682.
 Boel et al., 1990, *Biochemistry* 29, págs. 6244-6249.
 35 Sarkar y Sommer, 1990, *BioTechniques* 8, págs. 404-407.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S

ES 2 618 608 T3

<120>

<130>

<160> 40

<170> PatentIn Ver. 2.1

5

<210> 1

<211> 1443

<212> ADN

<213> *Bacillus amyloliquefaciens*

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1443)

<400> 1

```

gta aat ggc acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tat acg ccg aac gac 48
Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
  1                    5                10                15

ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat gcg gaa cat tta tcg gat 96
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
                20                25                30

atc ggt att act gcc gtc tgg att ccc ccg gca tat aag gga acg agc 144
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Thr Ser
                35                40                45

caa gcg gat gtg ggc tac ggt gct tac gac ctt tat gat tta ggg gag 192
Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
                50                55                60

ttt cat caa aaa ggg acg gtt cgg aca aag tac ggc aca aaa gga gag 240
Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gly Glu
  65                70                75                80

ctg caa tct gcg atc aaa agt ctt cat tcc cgc gac att aac gtt tac 288
Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn Val Tyr
                85                90                95

ggg gat gtg gtc atc aac cac aaa ggc ggc gct gat gcg acc gaa gat 336
Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp
                100                105                110

gta acc gcg gtt gaa gtc gat ccc gct gac cgc aac cgc gta att tca 384
Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val Ile Ser
                115                120                125

gga gaa cac cta att aaa gcc tgg aca cat ttt cat ttt ccg ggg cgc 432
Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro Gly Arg
  130                135                140

ggc agc aca tac agc gat ttt aag tgg tat tgg tac cat ttt gac gga 480
Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Tyr Trp Tyr His Phe Asp Gly
  145                150                155                160

```

ES 2 618 608 T3

acc gat tgg gac gag tcc cga aag ctg aac cgc atc tat aag ttt caa	528
Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys Phe Gln	
165 170 175	
ggg aag act tgg gat tgg gaa gtt tcc aat gaa ttc ggc aac tat gat	576
Gly Lys Thr Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Phe Gly Asn Tyr Asp	
180 185 190	
tat ttg atg tat gcc gac ttt gat tat gac cat cct gat gtc gta gca	624
Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Phe Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Val Ala	
195 200 205	
gag att aag aga tgg ggc act tgg tat gcc aat gaa ctg caa ttg gac	672
Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln Leu Asp	
210 215 220	
ggt ttc cgt ctt gat gct gtc aaa cac att aaa ttt tct ttt ttg cgg	720
Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg	
225 230 235 240	
gat tgg gtt aat cat gtc agg gaa aaa acg ggg aag gaa atg ttt acg	768
Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr	
245 250 255	
gta gct gag tac tgg tcg aat gac ttg ggc gcg ctg gaa aac tat ttg	816
Val Ala Glu Tyr Trp Ser Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu	
260 265 270	
aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt cat tat	864
Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr	
275 280 285	
cag ttc cat gct gca tcg aca cag gga ggc ggc tat gat atg agg aaa	912
Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys	
290 295 300	
ttg ctg aac ggt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa tcg gtt aca	960
Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser Val Thr	
305 310 315 320	
ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tcg ctt gag tcg act	1008
Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr	
325 330 335	
gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct ttt att ctc aca agg	1056
Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg	
340 345 350	
gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg acg aaa	1104
Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys	
355 360 365	
gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att gaa ccg	1152
Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro	
370 375 380	
atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat gat tat	1200
Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr	
385 390 395 400	
ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac agc tcg	1248
Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser	
405 410 415	

ES 2 618 608 T3

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

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

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

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

aga 1443
 Arg

<210> 2
 <211> 481
 <212> PRT
 <213> *Bacillus amyloliquefaciens*

5

<400> 2
 Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 618 608 T3

Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Phe Asp Tyr Asp His Pro Asp Val Val Ala
 195 200 205
 Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln Leu Asp
 210 215 220
 Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg
 225 230 235 240
 Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr
 245 250 255
 Val Ala Glu Tyr Trp Ser Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu
 260 265 270
 Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu His Tyr
 275 280 285
 Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Lys
 290 295 300
 Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser Val Thr
 305 310 315 320
 Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr
 325 330 335
 Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg
 340 345 350
 Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys
 355 360 365
 Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro
 370 375 380
 Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr
 385 390 395 400
 Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser
 405 410 415
 Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly
 420 425 430
 Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His
 435 440 445
 Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly
 450 455 460
 Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln
 465 470 475 480

Arg

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

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

ES 2 618 608 T3

```

<400> 3
cggaagattg gaagtacaaa aataagcaaa agattgtcaa tcatgtcatg agccatgagg 60
gagacggaaa aatcgtotta atgcacgata tttatgcaac gttcgcagat gctgctgaag 120
agattattaa aaagctgaaa gcaaaaggct atcaattggt aactgtatct cagcttgaag 180
aagtgaagaa gcagagaggc tattgaataa atgagtagaa gcgcatatc ggcgcttttc 240
ttttggaaga aaatataggg aaaatggtac ttgttaaaaa ttcggaatat ttatacaaca 300
tcatatgttt cacattgaaa ggggaggaga atcatgaaac aacaaaaacg gctttacgcc 360
cgattgctga cgctgttatt tgcgctcatc ttcttgctgc ctcattctgc agcagcgggg 420

gca aat ctt aat ggg acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tac atg ccc 468
Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
  1                    5                    10                    15

aat gac ggc caa cat tgg agg cgt ttg caa aac gac tcg gca tat ttg 516
Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu
          20                    25                    30

gct gaa cac ggt att act gcc gtc tgg att ccc ccg gca tat aag gga 564
Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
          35                    40                    45

acg agc caa gcg gat gtg ggc tac ggt gct tac gac ctt tat gat tta 612
Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
          50                    55                    60

ggg gag ttt cat caa aaa ggg acg gtt cgg aca aag tac ggc aca aaa 660
Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
  65                    70                    75                    80

gga gag ctg caa tct gcg atc aaa agt ctt cat tcc cgc gac att aac 708
Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn
          85                    90                    95

ggt tac ggg gat gtg gtc atc aac cac aaa ggc ggc gct gat gcg acc 756
Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr
          100                    105                    110

gaa gat gta acc gcg gtt gaa gtc gat ccc gct gac cgc aac cgc gta 804
Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val
          115                    120                    125

att tca gga gaa cac cta att aaa gcc tgg aca cat ttt cat ttt ccg 852
Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro
          130                    135                    140

ggg cgc ggc agc aca tac agc gat ttt aaa tgg cat tgg tac cat ttt 900
Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe
          145                    150                    155                    160

gac gga acc gat tgg gac gag tcc cga aag ctg aac cgc atc tat aag 948
Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys
          165                    170                    175

```

ES 2 618 608 T3

ttt caa gga aag gct tgg gat tgg gaa gtt tcc aat gaa aac ggc aac	996
Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn	
180 185 190	
tat gat tat ttg atg tat gcc gac atc gat tat gac cat cct gat gtc	1044
Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val	
195 200 205	
gca gca gaa att aag aga tgg ggc act tgg tat gcc aat gaa ctg caa	1092
Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln	
210 215 220	
ttg gac ggt ttc cgt ctt gat gct gtc aaa cac att aaa ttt tct ttt	1140
Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe	
225 230 235 240	
ttg cgg gat tgg gtt aat cat gtc agg gaa aaa acg ggg aag gaa atg	1188
Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met	
245 250 255	
ttt acg gta gct gaa tat tgg cag aat gac ttg ggc gcg ctg gaa aac	1236
Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn	
260 265 270	
tat ttg aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt	1284
Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu	
275 280 285	
cat tat cag ttc cat gct gca tcg aca cag gga ggc ggc tat gat atg	1332
His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met	
290 295 300	
agg aaa ttg ctg aac ggt acg gtc gtt tcc aag cat ccg ttg aaa tcg	1380
Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser	
305 310 315 320	
gtt aca ttt gtc gat aac cat gat aca cag ccg ggg caa tcg ctt gag	1428
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu	
325 330 335	
tcg act gtc caa aca tgg ttt aag ccg ctt gct tac gct ttt att ctc	1476
Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu	
340 345 350	
aca agg gaa tct gga tac cct cag gtt ttc tac ggg gat atg tac ggg	1524
Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly	
355 360 365	
acg aaa gga gac tcc cag cgc gaa att cct gcc ttg aaa cac aaa att	1572
Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile	
370 375 380	
gaa ccg atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat	1620
Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His	
385 390 395 400	
gat tat ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac	1668
Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp	
405 410 415	
agc tcg gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc	1716
Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro	

ES 2 618 608 T3

	420		425		430		
ggt ggg gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca						1764	
Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr							
	435		440		445		
tgg cat gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc aat tcg						1812	
Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser							
	450		455		460		
gaa ggc tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca att tat						1860	
Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr							
	465		470		475		480
gtt caa aga tag aagagcagag aggacggatt tctctgaagga aatccgtttt						1912	
Val Gln Arg							
tttatttt						1920	

<210> 4
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> *Bacillus licheniformis*

5

<400> 4	
Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro	
1	5 10 15
Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu	
	20 25 30
Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly	
	35 40 45
Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu	
	50 55 60
Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys	
	65 70 75 80
Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn	
	85 90 95
Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr	
	100 105 110
Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val	
	115 120 125
Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro	
	130 135 140
Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe	
	145 150 155 160
Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys	
	165 170 175
Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn	
	180 185 190
Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val	

ES 2 618 608 T3

	195		200		205														
Ala	Ala	Glu	Ile	Lys	Arg	Trp	Gly	Thr	Trp	Tyr	Ala	Asn	Glu	Leu	Gln				
	210					215					220								
Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys	Phe	Ser	Phe				
	225				230					235					240				
Leu	Arg	Asp	Trp	Val	Asn	His	Val	Arg	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Glu	Met				
				245					250					255					
Phe	Thr	Val	Ala	Glu	Tyr	Trp	Gln	Asn	Asp	Leu	Gly	Ala	Leu	Glu	Asn				
			260					265					270						
Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Asn	Phe	Asn	His	Ser	Val	Phe	Asp	Val	Pro	Leu				
		275					280					285							
His	Tyr	Gln	Phe	His	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asp	Met				
		290				295					300								
Arg	Lys	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Val	Ser	Lys	His	Pro	Leu	Lys	Ser				
	305				310					315					320				
Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Thr	Gln	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu				
				325					330					335					
Ser	Thr	Val	Gln	Thr	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	Tyr	Ala	Phe	Ile	Leu				
			340					345					350						
Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Tyr	Pro	Gln	Val	Phe	Tyr	Gly	Asp	Met	Tyr	Gly				
		355					360					365							
Thr	Lys	Gly	Asp	Ser	Gln	Arg	Glu	Ile	Pro	Ala	Leu	Lys	His	Lys	Ile				
		370				375					380								
Glu	Pro	Ile	Leu	Lys	Ala	Arg	Lys	Gln	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Ala	Gln	His				
	385				390					395					400				
Asp	Tyr	Phe	Asp	His	His	Asp	Ile	Val	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu	Gly	Asp				
				405					410					415					
Ser	Ser	Val	Ala	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Thr	Asp	Gly	Pro				
			420					425					430						
Gly	Gly	Ala	Lys	Arg	Met	Tyr	Val	Gly	Arg	Gln	Asn	Ala	Gly	Glu	Thr				
		435					440					445							
Trp	His	Asp	Ile	Thr	Gly	Asn	Arg	Ser	Glu	Pro	Val	Val	Ile	Asn	Ser				
		450				455					460								
Glu	Gly	Trp	Gly	Glu	Phe	His	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Ile	Tyr				
				470						475					480				

Val Gln Arg

<210> 5
 < 211> 2604
 < 212> ADN
 < 213> *Bacillus amyloliquefaciens*

<220>
 < 221> -10_signal
 < 222> (707)..(712)

<220>
 < 221> -35_signal
 < 222> (729)..(734)

5

10

ES 2 618 608 T3

<220>
 < 221> RBS
 < 222> (759)..(762)

5 <220>
 < 221> sig_peptide
 < 222> (770)..(862)

<220>
 < 221> mat_peptide
 < 222> (863)..(2314)

10 <220>
 < 221> terminador
 < 222> (2321) .. (2376)

15 <220>
 < 221> CDS
 < 222> (863)..(2314)

<400> 5
 aagcttcaag cgtcaatcg gaatgtgcat ctcgcttcat acttaggttt tcacccgcat 60
 attaagcagg cgtttttgaa ccgtgtgaca gaagctgttc gaaaccccgg cgggacggttt 120
 gattttaagg ggggacagta tgctgcctct tcacattaat ctacagcgaa aaagaatcat 180
 cattgctggc gggggcaatg ttgcattaag aaggctgaaa cgggtgttcc ggaaggcgc 240
 gatattaccg tgatcagtct gagcctgcct gaaattaaaa agctggcggg tgaaggacgc 300
 atccgctgga ttccccggag aattgaaatg aaagatctca agcccgcttt tttcattatt 360
 gccgcgacaa atgaccgagg cgtgaatcag gagatagccg caaacgcttc tgaaacgcag 420
 ctggctcaact gtgtaagcaa ggctgaacaa ggcagcgtat atatgccgaa gatcatccgc 480
 aaagggcgca ttcaagtatc agtatcaaca agcggggcaa gccccgcaca tacgaaaaga 540
 ctggctgaaa acattgagcc tttgatgact gatgatttgg ctgaagaagt ggatcgattg 600
 tttgagaaaa gaagaagacc ataaaaatac cttgtctgtc atcagacagg gtatttttta 660
 tgctgtccag actgtccgct gtgtaaaaaa taggaataaa ggggggttgt tattatttta 720
 ctgatatgta aaatataatt tgtataagaa aatgagaggg agaggaaaca tgattcaaaa 780
 acgaaagcgg acagtttctg tcagacttgt gcttatgtgc acgctgttat ttgtcagttt 840
 gccgattaca aaaacatcag cc gta aat ggc acg ctg atg cag tat ttt gaa 892
 Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu
 1 5 10
 tgg tat acg ccg aac gac ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat 940
 Trp Tyr Thr Pro Asn Asp Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp
 15 20 25

ES 2 618 608 T3

gcg gaa cat tta tcg gat atc gga atc act gcc gtc tgg att cct ccc	988
Ala Glu His Leu Ser Asp Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro	
30 35 40	
gca tac aaa gga ttg agc caa tcc gat aac gga tac gga cct tat gat	1036
Ala Tyr Lys Gly Leu Ser Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp	
45 50 55	
ttg tat gat tta gga gaa ttc cag caa aaa ggg acg gtc aga acg aaa	1084
Leu Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys	
60 65 70	
tac gcc aca aaa tca gag ctt caa gat gcg atc gcc tca ctg cat tcc	1132
Tyr Gly Thr Lys Ser Glu Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser	
75 80 85 90	
cgg aac gtc caa gta tac gga gat gtg gtt ttg aat cat aag gct ggt	1180
Arg Asn Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly	
95 100 105	
gct gat gca aca gaa gat gta act gcc gtc gaa gtc aat ccg gcc aat	1228
Ala Asp Ala Thr Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn	
110 115 120	
aga aat cag gaa act tcg gag gaa tat caa atc aaa gcg tgg acg gat	1276
Arg Asn Gln Glu Thr Ser Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp	
125 130 135	
ttt cgt ttt ccg gcc cgt gga aac acg tac agt gat ttt aaa tgg cat	1324
Phe Arg Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His	
140 145 150	
tgg tat cat ttc gac gga gcg gac tgg gat gaa tcc ccg aag atc agc	1372
Trp Tyr His Phe Asp Gly Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser	
155 160 165 170	
cgc atc ttt aag ttt cgt ggg gaa gga aaa gcg tgg gat tgg gaa gta	1420
Arg Ile Phe Lys Phe Arg Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val	
175 180 185	
tca agt gaa aac gcc aac tat gac tat tta atg tat gct gat gtt gac	1468
Ser Ser Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp	
190 195 200	
tac gac cac cct gat gtc gtg gca gag aca aaa aaa tgg ggt atc tgg	1516
Tyr Asp His Pro Asp Val Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp	
205 210 215	
tat gcg aat gaa ctg tca tta gac gcc ttc cgt att gat gcc gcc aaa	1564
Tyr Ala Asn Glu Leu Ser Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys	
220 225 230	
cat att aaa ttt tca ttt ctg cgt gat tgg gtt cag gcg gtc aga cag	1612
His Ile Lys Phe Ser Phe Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln	
235 240 245 250	
gcg acg gga aaa gaa atg ttt acg gtt gcg gag tat tgg cag aat aat	1660
Ala Thr Gly Lys Glu Met Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn	
255 260 265	
gcc ggg aaa ctc gaa aac tac ttg aat aaa aca agc ttt aat caa tcc	1708
Ala Gly Lys Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser	

ES 2 618 608 T3

270	275	280	
gtg ttt gat gtt ccg ctt cat ttc aat tta cag gcg gct tcc tca caa			1756
Val Phe Asp Val Pro Leu His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln			
285	290	295	
gga ggc gga tat gat atg agg cgt ttg ctg gac ggt acc gtt gtg tcc			1804
Gly Gly Gly Tyr Asp Met Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser			
300	305	310	
agg cat ccg gaa aag gcg gtt aca ttt gtt gaa aat cat gac aca cag			1852
Arg His Pro Glu Lys Ala Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln			
315	320	325	330
ccg gga cag tca ttg gaa tcg aca gtc caa act tgg ttt aaa ccg ctt			1900
Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu			
335	340	345	
gca tac gcc ttt att ttg aca aga gaa tcc ggt tat cct cag gtg ttc			1948
Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe			
350	355	360	
tat ggg gat atg tac ggg aca aaa ggg aca tcg cca aag gaa att ccc			1996
Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro			
365	370	375	
tca ctg aaa gat aat ata gag ccg att tta aaa gcg cgt aag gag tac			2044
Ser Leu Lys Asp Asn Ile Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr			
380	385	390	
gca tac ggg ccc cag cac gat tat att gac cac ccg gat gtg atc gga			2092
Ala Tyr Gly Pro Gln His Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly			
395	400	405	410
tgg acg agg gaa ggt gac agc tcc gcc gcc aaa tca ggt ttg gcc gct			2140
Trp Thr Arg Glu Asp Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala			
415	420	425	
tta atc acg gac gga ccc ggc gga tca aag cgg atg tat gcc ggc ctg			2188
Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu			
430	435	440	
aaa aat gcc ggc gag aca tgg tat gac ata acg ggc aac cgt tca gat			2236
Lys Asn Ala Gly Glu Thr Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp			
445	450	455	
act gta aaa atc gga tct gac ggc tgg gga gag ttt cat gta aac gat			2284
Thr Val Lys Ile Gly Ser Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp			
460	465	470	
ggg tcc gtc tcc att tat gtt cag aaa taa ggtaataaaa aaacacctcc			2334
Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Gln Lys			
475	480		
aagctgagtg cgggtatcag cttggagggtg cgtttatattt ttcagccgta tgacaaggtc			2394
ggcatcagggt gtgacaaata cgggtatgctg gctgtcatag gtgacaaatc cgggttttgc			2454
gccgtttggc tttttcacat gtctgatattt tgtataatca acaggcacgg agccggaatc			2514
tttcgccttg gaaaaataag cgggcatcgt agctgcttcc aatatggatt gttcatcggg			2574
atcgtctgctt ttaatcacia cgtgggatcc			2604
<210> 6			
<211> 483			
<212> PRT			
<213> <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>			

ES 2 618 608 T3

<400> 6

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

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

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

Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg Ile Phe Lys Phe Arg
 165 170 175

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

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

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

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

Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met
 245 250 255

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

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

His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met

ES 2 618 608 T3

290 295 300

Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser Arg His Pro Glu Lys Ala
 305 310 315 320

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

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

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

Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp Asn Ile
 370 375 380

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

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

Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
 420 425 430

Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys Asn Ala Gly Glu Thr
 435 440 445

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

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

Val Gln Lys

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

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1548)

10

<400> 7

gcc gca ccg ttt aac ggc acc atg atg cag tat ttt gaa tgg tac ttg 48
 Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu
 1 5 10 15

ccg gat gat ggc acg tta tgg acc aaa gtg gcc aat gaa gcc aac aac 96
 Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn
 20 25 30

tta tcc agc ctt ggc atc acc gct ctt tgg ctg ccg ccc gct tac aaa 144
 Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys
 35 40 45

gga aca agc cgc agc gac gta ggg tac gga gta tac gac ttg tat gac 192
 Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp

ES 2 618 608 T3

50	55	60	
ctc ggc gaa ttc aat caa aaa ggg acc gtc cgc aca aaa tac gga aca			240
Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr			
65	70	75	80
aaa gct caa tat ctt caa gcc att caa gcc gcc cac gcc gct gga atg			288
Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met			
	85	90	95
caa gtg tac gcc gat gtc gtg ttc gac cat aaa ggc ggc gct gac ggc			336
Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly			
	100	105	110
acg gaa tgg gtg gac gcc gtc gaa gtc aat ccg tcc gac cgc aac caa			384
Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln			
	115	120	125
gaa atc tcg ggc acc tat caa atc caa gca tgg acg aaa ttt gat ttt			432
Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe			
	130	135	140
ccc ggg cgg ggc aac acc tac tcc agc ttt aag tgg cgc tgg tac cat			480
Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His			
	145	150	155
ttt gac ggc gtt gat tgg gac gaa agc cga aaa ttg agc cgc att tac			528
Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr			
	165	170	175
aaa ttc cgc ggc atc gcc aaa gcg tgg gat tgg gaa gta gac acg gaa			576
Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu			
	180	185	190
aac gga aac tat gac tac tta atg tat gcc gac ctt gat atg gat cat			624
Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His			
	195	200	205
ccc gaa gtc gtg acc gag ctg aaa aac tgg ggg aaa tgg tat gtc aac			672
Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn			
	210	215	220
aca acg aac att gat ggg ttc cgg ctt gat gcc gtc aag cat att aag			720
Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys			
	225	230	235
ttc agt ttt ttt cct gat tgg ttg tcg tat gtg cgt tct cag act ggc			768
Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly			
	245	250	255
aag ccg cta ttt acc gtc ggg gaa tat tgg agc tat gac atc aac aag			816
Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys			
	260	265	270
ttg cac aat tac att acg aaa aca gac gga acg atg tct ttg ttt gat			864
Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp			
	275	280	285
gcc ccg tta cac aac aaa ttt tat acc gct tcc aaa tca ggg ggc gca			912
Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala			
	290	295	300
ttt gat atg cgc acg tta atg acc aat act ctc atg aaa gat caa ccg			960

ES 2 618 608 T3

Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro
 305 310 315 320

aca ttg gcc gtc acc ttc gtt gat aat cat gac acc gaa ccc ggc caa 1008
 Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln
 325 330 335

gcg ctg cag tca tgg gtc gac cca tgg ttc aaa ccg ttg gct tac gcc 1056
 Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala
 340 345 350

ttt att cta act cgg cag gaa gga tac ccg tgc gtc ttt tat ggt gac 1104
 Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp
 355 360 365

tat tat ggc att cca caa tat aac att cct tcg ctg aaa agc aaa atc 1152
 Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile
 370 375 380

gat ccg ctc ctc atc gcg cgc agg gat tat gct tac gga acg caa cat 1200
 Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His
 385 390 395 400

gat tat ctt gat cac tcc gac atc atc ggg tgg aca agg gaa ggg ggc 1248
 Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly
 405 410 415

act gaa aaa cca gga tcc gga ctg gcc gca ctg atc acc gat ggg ccg 1296
 Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
 420 425 430

gga gga agc aaa tgg atg tac gtt ggc aaa caa cac gct gga aaa gtg 1344
 Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val
 435 440 445

ttc tat gac ctt acc ggc aac cgg agt gac acc gtc acc atc aac agt 1392
 Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser
 450 455 460

gat gga tgg ggg gaa ttc aaa gtc aat ggc ggt tcg gtt tcg gtt tgg 1440
 Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp
 465 470 475 480

gtt cct aga aaa acg acc gtt tct acc atc gct cgg ccg atc aca acc 1488
 Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr
 485 490 495

cga ccg tgg act ggt gaa ttc gtc cgt tgg acc gaa cca cgg ttg gtg 1536
 Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val
 500 505 510

gca tgg cct tga 1548
 Ala Trp Pro
 515

<210> 8
 <211> 515
 <212> PRT
 <213> *Bacillus stearothermophilus*

5

<400> 8
 Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu

ES 2 618 608 T3

1	5	10	15
Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn 20 25 30			
Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys 35 40 45			
Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp 50 55 60			
Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr 65 70 75 80			
Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met 85 90 95			
Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly 100 105 110			
Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln 115 120 125			
Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe 130 135 140			
Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His 145 150 155 160			
Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr 165 170 175			
Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu 180 185 190			
Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His 195 200 205			
Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn 210 215 220			
Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys 225 230 235 240			
Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly 245 250 255			
Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys 260 265 270			
Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp 275 280 285			
Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala 290 295 300			
Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro 305 310 315 320			
Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln 325 330 335			
Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala			

ES 2 618 608 T3

<400> 11
ctgtgactgg tgagtactca accaagtc 28

5
<210> 12
< 211> 31
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

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

10
<400> 12
ggtcgtaggc accgtagccc tcatccgctt g 31

<210> 13
< 211> 31
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

15
<220>
< 223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 13
ggtcgtaggc accgtagccc atatccgctt g 31

20
<210> 14
< 211> 31
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

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

25
<400> 14
ggtcgtaggc accgtagcca atatccgctt g 31

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

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

<400> 15
gcagcatgga actgctyatg aagaggcacg tcaaac 36

35
<210> 16
< 211> 30
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

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

<400> 16
catagttgcc gaattcattg gaaactccc 30

<210> 17
< 211> 34

< 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial

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

5 <400> 17
 catagtgcc gaattcaggg gaaactccc aatc 34

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

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

<400> 18
 ccgcgccccg ggaaatcaaa tttgtccag gctttaatta g 41

15 <210> 19
 < 211> 32
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial

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

<400> 19
 caaatggta ccaataccac ttaaatacgc tg 32

<210> 20
 < 211> 29
 25 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial

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

<400> 20
 30 cttccaatc ccaagtctc ccttgaac 29

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

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

<400> 21
 35 cttaattct gctacgacgt caggatggtc ataac 36

<210> 22
 < 211> 38
 < 212> ADN
 40 < 213> Secuencia artificial

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

ES 2 618 608 T3

<400> 22
cgcccaagtc attcgaccag tactcagcta ccgtaaac 38

5 <210> 23
< 211> 29
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

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

10 <400> 23
gccgtttca ttgtcgactt cccaatccc 29

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

15 <220>
< 223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 24
ggaattcgc gctgactagt cccgtacata tcccc 35

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

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

25 <400> 25
ggcaggaatt tcgcgacctt tcgtcccgta catatc 36

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

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

<400> 26
cctcattctg cagcagcagc cgtaaattggc acgctg 36

35 <210> 27
< 211> 38
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

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

40 <400> 27
ccagacggca gtaataccga tatccgataa atgttccg 38

<210> 28
< 211> 30

< 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial

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

5 <400> 28
 cggatatcgg tattactgcc gtctggattc 30

<210> 29
 < 211> 21
 < 212> ADN
 10 < 213> Secuencia artificial

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

<400> 29
 ctcgtcccaa tcggtccgt c 21

15 <210> 30
 < 211> 26
 < 212> ADN
 < 213> Secuencia artificial

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

<400> 30
 gatgtatgcc gacttcgatt atgacc 26

<210> 31
 < 211> 30
 < 212> ADN
 25 < 213> Secuencia artificial

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

<400> 31
 30 catagttgcc gaattcattg gaaactccc 30

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

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

<400> 32
 ccgattgctg acgctgttat ttgc 24

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

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

ES 2 618 608 T3

<400> 33
gccaagcgga taacggctac ggtgc 25

5 <210> 34
< 211> 28
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

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

10 <400> 34
gaacgagcca atcggacgtg ggctacgg 28

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

15 <220>
< 223> Descripción de la secuencia artificial: cebador

<400> 35
ggaacgagcc aatcggataa cggctacggt gc 32

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

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

25 <400> 36
gcatataagg gactgagcca agcgg 25

<210> 37
< 211> 25
< 212> ADN
30 < 213> Secuencia artificial

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

<400> 37
caaccacaaa gccggcgctg atgcg 25

35 <210> 38
< 211> 41
< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

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

<400> 38
gcatataagg gactgagcca atcggataac ggctacggtg c 41

<210> 39
< 211> 28

< 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

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

5 <400> 39
gaacgagccg atcggacgtg ggctacgg 28

<210> 40
< 211> 28
10 < 212> ADN
< 213> Secuencia artificial

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

<400> 40
gaacgagcca aaacgacgtg ggctacgg 28

REIVINDICACIONES

1. Una alfa-amilasa

i) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la presente en SEQ ID NO: 4, 6 u 8, o

ii) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 1 o la Figura 2, o

5 iii) que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 3, o

iv) una alfa-amilasa que muestra al menos 90% de homología con las alfa-amilasas de i), ii) o iii),

en donde la alfa-amilasa comprende una de las siguientes alteraciones:

G48A o G48S, y en donde la posición 48 se corresponde a la posición 48 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.

10 2. Una estructura artificial de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica una variante de alfa-amilasa según la reivindicación 1.

3. Un vector de expresión recombinante que es portador de una estructura artificial de ADN según la reivindicación 2.

15 4. Una célula que se transforma con una estructura artificial de ADN según la reivindicación 2 o un vector según la reivindicación 3.

5. Uso de una variante de alfa-amilasa según la reivindicación 1, para la licuefacción de almidón; en una composición detergente, tal como composiciones para lavandería, lavado de platos y limpieza de superficies duras; producción de etanol, tal como producción de etanol para combustible, bebidas y etanol industrial; eliminar el apresto de tejidos, telas o prendas de vestir.

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

Fig. 1

Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly
 85 90 95
 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
 100 105 110
 Gly Thr Glu Ile Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn
 115 120 125
 Gln Glu Thr Ser Gly Glu Tyr Ala Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
 130 135 140
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Asn His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
 145 150 155 160
 His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys
 165 170 175
 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp
 180 185 190
 Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met
 195 200 205
 Asp His Pro Glu Val Ile His Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr
 210 215 220
 Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His
 225 230 235 240
 Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr
 245 250 255
 Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu
 260 265 270
 Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val
 275 280 285
 Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly
 290 295 300
 Gly Tyr Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys
 305 310 315 320
 His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro
 325 330 335
 Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala
 340 345 350
 Tyr Ala Leu Val Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr
 355 360 365
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser

Fig. 1 (cont.)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Asn Phe Ala Tyr Gly Thr

Fig. 2 (cont.)

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

Fig. 2 (cont.)

ES 2 618 608 T3

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

Fig. 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Trp Val Asn Lys
 485

Fig. 3 (cont.)