

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 895**

51 Int. Cl.:

C12N 9/26 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.03.2014 PCT/US2014/023458**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.10.2014 WO14164777**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2014 E 14722824 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2970930**

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

30 Prioridad:

11.03.2013 US 201361776699 P

20.11.2013 US 201361906617 P

21.11.2013 US 201361907131 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.07.2018

73 Titular/es:

DANISCO US INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, California 94304, US

72 Inventor/es:

CASCAO-PEREIRA, LUIS G.;
FINAN, DINA;
WILDES, DAVID E.;
KOLKMAN, MARC;
BOTT, RICHARD R.;
AUGUSTINUS, PIETER;
HERMANT, ROEL;
RUIZ, MONICA OCHA y
VAN TOL, DEWY

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 676 895 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 combinatorias de alfa-amilasa

CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] Se describen composiciones y métodos relacionados con variantes de α -amilasas que contienen una pluralidad de mutaciones combinables. Las variantes de α -amilasas resultan útiles, por ejemplo, para la licuefacción y sacarificación de almidón, limpieza de manchas de almidón, desencilado textil, y elaboración de productos de panadería y cerveza.

ANTECEDENTES

10 [0002] El almidón consta de una mezcla de amilosa (15-30 % p/p) y amilopectina (70-85 % p/p). La amilosa consta de cadenas lineales de unidades de glucosa enlazada α -1,4 que presentan un peso molecular (PM) de aproximadamente 60.000 a aproximadamente 800.000. La amilopectina es un polímero ramificado que contiene puntos de ramificación α -1,6 cada 24-30 unidades de glucosa; su PM puede alcanzar 100 millones.

15 [0003] Actualmente se producen azúcares a partir de almidón en forma de jarabes de dextrosa concentrados por medio de un proceso de catalización enzimática que implica: (1) licuefacción (o reducción de viscosidad) de almidón sólido con una α -amilasa en dextrinas que presentan un grado medio de polimerización de aproximadamente 7-10, y (2) sacarificación del almidón licuado resultante (es decir, hidrolizado de almidón) con amiloglucosidasa (también denominada glucoamilasa o GA). El jarabe resultante presenta un alto contenido de glucosa. Posteriormente, gran parte del jarabe de glucosa que se produce comercialmente se isomeriza enzimáticamente a una mezcla de dextrosa/fructosa conocida como isojarabe. El jarabe resultante también puede fermentarse con microorganismos, como levadura, para producir productos comerciales que incluyen, por ejemplo, etanol, ácido cítrico, ácido láctico, ácido succínico, ácido itacónico, glutamato monosódico, gluconatos, lisina, otros ácidos orgánicos, otros aminoácidos y otras sustancias bioquímicas. La fermentación y la sacarificación se pueden llevar a cabo de forma simultánea (es decir, en un proceso de SSF) para lograr un mayor ahorro y eficiencia.

25 [0004] Las α -amilasas hidrolizan almidón, glucógeno, y polisacáridos relacionados mediante escisión aleatoria de enlaces internos α -1,4-glucosídicos, se han utilizado α -amilasas, especialmente de Bacilli, para varios fines distintos, incluidos la licuefacción y sacarificación de almidón, desencilado textil, modificación de almidón en la industria del papel y de la pasta de papel, elaboración de cerveza y productos de panadería, producción de jarabes para la industria alimentaria, producción de materias primas para procesos de fermentación, y para aumentar la digestibilidad en la alimentación animal. Estas enzimas pueden emplearse también para eliminar manchas y suciedad de almidón al lavar los platos y al lavar la ropa.

30 [0005] Se han descrito mutaciones de α -amilasas en numerosas publicaciones. No obstante, no todas las mutaciones producen el mismo efecto en distintas moléculas, y no pueden combinarse todas las mutaciones. Además, muchas mutaciones producen moléculas que presentan ciertas cualidades deseables en detrimento de otras propiedades. Existe una necesidad de obtener moléculas de α -amilasas modificadas resistentes.

SUMARIO

35 [0006] Las presentes composiciones y métodos se refieren a polipéptidos de variantes de amilasa, y métodos de uso de los mismos. En los siguientes párrafos numerados por separado se resumen aspectos y formas de realización de las presentes composiciones y métodos.

40 1. Una variante recombinante de una α -amilasa original que comprende:

i) una mutación en un residuo de aminoácido E187 empleando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y al menos una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en N126, Y150, F153, L171, T180 y 1203 utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración; donde la variante de α -amilasa presenta al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a SEQ ID N.º 1; o

45 ii) una mutación en un residuo de aminoácido E186 empleando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y al menos una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en N125, Y149, F152, L170, D179 y L202 utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; donde la variante de α -amilasa presenta al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a SEQ ID N.º 3; o

50 iii) una mutación en un residuo de aminoácido E189 empleando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y al menos una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en N128, Y152, F155, L173, T182 y L205 utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración; donde la variante de α -amilasa presenta al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a SEQ ID N.º 5;

55 donde la variante presenta un aumento de la estabilidad térmica, estabilidad detergente, actividad de licuefacción de almidón, y/o rendimiento de limpieza en comparación con la α -amilasa original o una α -

amilasa de referencia que difiere de la variante de α -amilasa únicamente por la ausencia de las mutaciones.

2. La variante de α -amilasa de la reivindicación 1(i), que comprende:

- 5 (a) al menos dos mutaciones en los residuos de aminoácido N126, Y150, F153, L171 y 1203, utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y/o
 (b) una delección de al menos un residuo de aminoácido seleccionado de entre R178, G179, T180 y G181 empleando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y/o
 (c) delecciones de los residuos de aminoácido R178 y G179, o T180 y G181 empleando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y/o
 10 (d) una mutación en el residuo de aminoácido G476 y/o G477, empleando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y/o
 (e) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en E132, Q167, T180 y A277, utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y/o
 (f) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R458, T459 y D460
 15 utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y/o
 (g) una mutación en el residuo de aminoácido T180, empleando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y/o
 (h) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en 6, 7, 8, 11, 14, 15, 20, 21, 23, 26, 27, 28, 37, 38, 39, 40, 42, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 58, 61, 62, 68, 70, 71, 72, 73, 79, 80, 81, 82, 84, 85, 87, 88, 89, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 101, 108, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 120, 122, 123, 124, 126, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 138, 140, 142, 143, 144, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 165, 167, 168, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 180, 181, 182, 187, 190, 191, 193, 199, 200, 201, 203, 206, 208, 210, 211, 212, 214, 215, 216, 219, 221, 223, 225, 226, 227, 235, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 252, 253, 254, 256, 257, 258, 260, 261, 262, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 273, 276, 277, 279, 280, 282, 284, 285, 286, 288, 296, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 307, 308, 310, 311, 312, 313, 316, 317, 318, 320, 321, 325, 327, 335, 338, 342, 348, 349, 352, 356, 357, 360, 362, 363, 368, 369, 377, 381, 382, 383, 384, 385, 388, 390, 392, 394, 395, 396, 397, 398, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 407, 408, 410, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 426, 428, 429, 430, 431, 434, 435, 436, 439, 441, 442, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 454, 455, 457, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 469, 470, 471, 473, 474, 475, 476, 477, 479, 480, 481, 482, 483 y 484 utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y/o
 30 (i) una combinación de mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en:

- E187P + I203Y + G476K,
 E187P + I203Y + G476K + R458N + T459S + D460T,
 T180D + E187P + I203Y + G476K,
 35 N126Y + T180D + E187P + I203Y + G476K,
 N126Y + T180D + E187P + I203Y + Y303D + G476T + G477E,
 N126Y + T180D + E187P + I203Y + Y303D + N475E + G477Q,
 N126Y + T180D + E187P + I203Y + Y303R + N475E + G476T + G477R,
 T038N + N088H + N126Y + T1291 + N134M + F153W + L171R + T180D + E187P + I203Y + G476K +
 40 G477E,
 N126Y + E132H + T180D + E187P + I203Y + Y303D + G476T + G477E,
 N126Y + E187P + G476K,
 N126Y + F153W + E187P + G476K,
 N126Y + F153W + E187P + G4726 + G477R,
 45 N126Y + E187P + I203Y,
 N126Y + T180H + E187P + I203Y,
 N126Y + F153W + T180H + E187P + I203Y,
 N126Y + Y150H + F153W + L171N + E187P + I203Y, y
 N126Y + Y150H + F153W + L171N + T180H + E187P + I203Y,

50 donde la variante presenta un aumento de la estabilidad térmica, estabilidad detergente, estabilidad de actividad de licuefacción de almidón, y/o rendimiento de limpieza en comparación con la original y donde se utiliza SEQ ID N.º 1 para la numeración.

3. La variante de α -amilasa de la reivindicación 1(ii), que comprende:

- 55 (a) al menos dos mutaciones en residuos de aminoácido N125, Y149, F152, L170 y L202 utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o
 (b) una delección de al menos un residuo de aminoácido seleccionado de entre R177, G178, D179 y G180, utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o
 (c) delecciones de residuos de aminoácido R177 y G178, o D179 y G180 utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o
 60 (d) una mutación en el residuo de aminoácido G472 y/o G473, empleando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o

(e) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T131, Q166, D179 y T276 utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o

(f) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R454, S455 y G456, utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o

5 (g) una mutación en el residuo de aminoácido D179, utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o

(h) una mutación en el residuo de aminoácido N205, empleando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o

(i) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T333G, A335S y Q337E, utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o

10 (j) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en 5, 6, 7, 10, 13, 14, 19, 20, 22, 25, 26, 27, 36, 37, 38, 39, 41, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 57, 60, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 78, 79, 80, 81, 83, 84, 86, 87, 88, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 100, 107, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 119, 121, 122, 123, 125, 126, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 135, 136, 137, 139, 141, 142, 143, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 157, 158, 164, 166, 167, 169, 170, 171, 174, 175, 176, 179, 180, 181, 186, 189, 190, 192, 198, 199, 200, 202, 205, 207, 209, 210, 211, 213, 214, 215, 218, 220, 222, 15 224, 225, 226, 234, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 253, 255, 256, 257, 259, 260, 261, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 272, 275, 276, 278, 279, 281, 283, 284, 285, 287, 295, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 306, 307, 309, 310, 311, 312, 315, 316, 317, 319, 320, 324, 326, 334, 337, 341, 347, 348, 351, 355, 356, 359, 361, 362, 367, 368, 373, 377, 378, 379, 380, 381, 384, 386, 388, 390, 391, 392, 393, 394, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 406, 410, 411, 412, 414, 415, 416, 417, 418, 20 419, 420, 422, 424, 425, 426, 427, 430, 431, 432, 435, 437, 438, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 450, 451, 453, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 465, 466, 467, 469, 470, 471, 472, 473, 475, 476, 477, 478, 479 y 480 utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o

(k) una combinación de mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en:

N125Y + E186P + T333G + A335S + Q337E + G472K

25 N125Y + F152W + E186P + T333G + A335S + Q337E + G472K

N125Y + F152W + E186P + N205D + T333G + A335S + Q337E + G472K utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración.

4. La variante de α -amilasa de la reivindicación 1(iii), que comprende:

30 (a) al menos dos mutaciones en los residuos de aminoácido N128, Y152, F155, L173 y L205, utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y/o

(b) una delección de al menos un residuo de aminoácido seleccionado de entre R180, S181, T182 y G183, empleando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y/o

35 (c) delecciones de los residuos de aminoácido R180 y S181, o T182 y G183 utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y/o

(d) una mutación en el residuo de aminoácido G475 y/o G476, empleando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y/o

(e) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T134, E169, T182 y T279 utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y/o

40 (f) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R457, S458 y D459, utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y/o

(g) una mutación en el residuo de aminoácido T182 empleando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y/o

45 (h) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en 8, 9, 10, 13, 16, 17, 22, 23, 25, 28, 29, 30, 39, 40, 41, 42, 44, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 60, 63, 64, 70, 72, 73, 74, 75, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 89, 90, 91, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 103, 110, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 122, 124, 125, 126, 128, 129, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 138, 139, 140, 142, 144, 145, 146, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 160, 161, 167, 169, 170, 172, 173, 174, 177, 178, 179, 182, 183, 184, 189, 192, 193, 195, 201, 202, 203, 205, 208, 210, 212, 213, 214, 216, 217, 218, 221, 223, 225, 227, 228, 229, 237, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 254, 255, 256, 258, 259, 260, 262, 263, 264, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 275, 278, 279, 281, 282, 284, 286, 287, 288, 290, 298, 50 301, 302, 303, 304, 305, 306, 309, 310, 312, 313, 314, 315, 318, 319, 320, 322, 323, 327, 329, 337, 340, 344, 350, 351, 354, 358, 359, 362, 364, 365, 370, 371, 376, 380, 381, 382, 383, 384, 387, 389, 391, 393, 394, 395, 396, 397, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 406, 407, 409, 413, 414, 415, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 425, 427, 428, 429, 430, 433, 434, 435, 438, 440, 441, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 453, 454, 456, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 468, 469, 470, 472, 473, 474, 475, 476, 478, 479, 55 480, 481, 482, 483 y 483, utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y/o

(i) una combinación de mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en:

N128Y + E189P + G475R

F155W + E189P + G475R

T134E + T182H + E189P + G475R

60 N128Y + T134E + T182H + E189P + G475R

N128Y + F155W + E189P + G475R

T134E + F155W + T182H + E189P + G475R

N128Y + T134E + F155W + T182H + E189P + G475R

N128Y + T134H + F155W + T182D + E189P + G475R

N128Y + T134E + F155W + T182G + E189P + G457R, utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración.

- 5 En algunas formas de realización, la variante de amilasa de cualquiera de los párrafos anteriores es de una especie de *Cytophaga*.
- 6 En algunas formas de realización, la variante de amilasa de cualquiera de los párrafos anteriores es de una especie de *Paenibacillus*.
- 7 En algunas formas de realización, la variante de amilasa de cualquiera de los párrafos anteriores es de una especie de *Bacillus*.
- 10 8. En algunas formas de realización, la variante de amilasa de cualquiera de los párrafos anteriores presenta al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º 1 o SEQ ID N.º 3 o SEQ ID N.º 5
- 15 9. En algunas formas de realización, la variante de amilasa de cualquiera de los párrafos 1-7 presenta al menos un 80 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 3 o SEQ ID N.º 5.
10. En algunas formas de realización, la variante de amilasa de cualquiera de los párrafos 1-7 presenta al menos un 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 3 o SEQ ID N.º 5.
- 20 11. En otro aspecto, se proporciona una composición que comprende la variante de α -amilasa de cualquiera de los párrafos anteriores.
12. En algunas formas de realización, la composición del párrafo 11 resulta efectiva para eliminar manchas de almidón en ropa sucia, platos o tejidos.
13. En algunas formas de realización, la composición del párrafo 11 o 12 comprende además un tensioactivo.
- 25 14. En algunas formas de realización, la composición de cualquiera de los párrafos 11-13 es una composición de detergente.
15. En algunas formas de realización, la composición de cualquiera de los párrafos 11-13 es un detergente para ropa o un aditivo de detergente para ropa.
16. En algunas formas de realización, la composición de cualquiera de los párrafos 11-13 es un detergente lavavajillas manual o automático.
- 30 17. En algunas formas de realización, la composición de cualquiera de los párrafos 11-13 comprende además una o más enzimas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en proteasa, hemicelulasa, celulasa, peroxidasa, enzima lipolítica, enzima metalolipolítica, xilanasas, lipasa, fosfolipasa, esterasa, perhidrolasa, cutinasa, pectinasa, pectato liasa, mananasa, queratinasa, reductasa, oxidasa, fenoloxidasa, lipoxigenasa, ligninasa, pululanasa, tanasa, pentosanasa, malanasa, β -glucanasa, arabinosidasa, hialuronidasa, condroitinasa, lacasa, metaloproteinasas, amadoriasas, glucoamilasa, arabinofuranosidasa, fitasa, isomerasa, transferasa, y una amilasa distinta de la amilasa de cualquiera de los párrafos 1-10.
- 35 18. En algunas formas de realización, la composición del párrafo 11 es para licuar almidón.
19. En algunas formas de realización, la composición del párrafo 11 es para sacarificar una composición que comprende almidón, para el proceso de SSF posterior a la licuefacción, o para el proceso de SSF directo sin licuefacción previa.
- 40 20. En algunas formas de realización, la composición del párrafo 11 es para producir una bebida fermentada.
21. En algunas formas de realización, la composición del párrafo 11 es para elaborar un producto alimenticio de panadería.
22. En algunas formas de realización, la composición del párrafo 11 es para desencolado textil.
- 45 23. En otro aspecto, se proporciona un método para eliminar manchas de almidón o suciedad de una superficie, que comprende: poner en contacto la superficie en presencia de una composición que comprende una cantidad efectiva de la variante de amilasa de cualquiera de los párrafos 1-10, y permitir que el polipéptido hidrolice componentes de almidón presentes en la mancha de almidón para producir moléculas más pequeñas derivadas de almidón que se disuelven en la composición acuosa, eliminando así la mancha
- 50 de almidón de la superficie.
24. En algunas formas de realización del método del párrafo 23, la composición acuosa comprende además un tensioactivo.

25. En algunas formas de realización del método de cualquiera de los párrafos 23 o 24, la superficie es una superficie textil o una superficie de vajilla.
26. En algunas formas de realización del método de cualquiera de los párrafos 23-25, la composición comprende además al menos una enzima adicional seleccionada del grupo que consiste en proteasa, hemicelulasa, celulasa, peroxidasa, enzima lipolítica, enzima metalolipolítica, xilanasas, lipasa, fosfolipasa, esterasa, perhidrolasa, cutinasa, pectinasa, pectato liasa, mananasa, queratinasa, reductasa, oxidasa, fenoloxidasa, lipoxigenasa, ligninasa, pululanasa, tanasa, pentosanasa, malanasa, β -glucanasa, arabinosidasa, hialuronidasa, condroitinasa, lacasa, metaloproteinasa, amadoriasa, glucoamilasa, arabinofuranosidasa, fitasa, isomerasa, transferasa, y una amilasa distinta de la amilasa de cualquiera de los párrafos 1-10.
27. En otro aspecto, se proporciona un método para la sacarificación de una composición que comprende almidón para producir una composición que comprende glucosa, donde el método comprende:
- (i) poner en contacto la solución que comprende almidón con una cantidad efectiva de la variante de amilasa de cualquiera de los párrafos 1-10; y
- (ii) sacarificar la solución que comprende almidón para producir la composición que comprende glucosa; donde la variante de amilasa cataliza la sacarificación de la solución de almidón a glucosa o a otros jarabes de carbohidrato enriquecido.
28. En algunas formas de realización del método del párrafo 27, la composición que comprende almidón comprende almidón licuado, almidón gelatinizado, almidón granular, o almidón tratado térmicamente por debajo de su temperatura de gelatinización.
29. En algunas formas de realización del método del párrafo 27 o 28, la fermentación es una reacción de sacarificación y fermentación simultánea (SSF).
30. En algunas formas de realización del método de cualquiera de los párrafos 27-29, el método comprende además poner en contacto una pulpa y/o un mosto con una amilasa.
31. En algunas formas de realización, el método de cualquiera de los párrafos 27-30 comprende además la adición de glucoamilasa, hexoquinasa, xilanasas, glucosa isomerasa, xilosa isomerasa, fosfatasa, fitasa, pululanasa, β -amilasa, α -amilasa distinta de la variante de α -amilasa, proteasa, celulasa, hemicelulasa, lipasa, cutinasa, isoamilasa, enzima redox, esterasa, transferasa, pectinasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, o una combinación de las mismas, a la solución de almidón.
32. En algunas formas de realización del método de cualquiera de los párrafos 27-31, una célula huésped expresa y secreta la amilasa.
33. En algunas formas de realización del método del párrafo 32, la composición que comprende almidón está en contacto con la célula huésped.
34. En algunas formas de realización del método del párrafo 32 o 33, la célula huésped expresa y secreta además una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en glucoamilasa, hexoquinasa, xilanasas, glucosa isomerasa, xilosa isomerasa, fosfatasa, fitasa, pululanasa, β -amilasa, α -amilasa distinta de la variante de α -amilasa, proteasa, celulasa, hemicelulasa, lipasa, cutinasa, isoamilasa, enzima redox, esterasa, transferasa, pectinasa, alfa-glucosidasa, y beta-glucosidasa.
35. En algunas formas de realización del método de cualquiera de los párrafos 32-34, la célula huésped expresa y secreta además una glucoamilasa.
36. En algunas formas de realización del método de cualquiera de los párrafos 32-35, la célula huésped es capaz de fermentar la composición.
37. En otro aspecto, se proporciona el uso de una amilasa de cualquiera de los párrafos 1-10 para producir una composición que comprende glucosa, para producir un almidón licuado, para producir una bebida fermentada, para limpiar manchas de almidón, o para desencilado textil.
38. En otro aspecto, se proporciona un método de desencilado textil, que comprende poner en contacto una composición de desencilado con un tejido encolado durante un tiempo suficiente para desencilar el tejido, donde la composición de desencilado comprende una variante de α -amilasa de cualquiera de los párrafos 1-10.
39. En otro aspecto, se proporciona un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-10.
40. En otro aspecto, se proporciona un vector de expresión que comprende el polinucleótido del párrafo 39.
41. En otro aspecto, se proporciona una célula huésped que comprende el vector de expresión del párrafo 40.

[0007] En el presente documento se describe también un polipéptido de acuerdo con cualquiera de los párrafos 1-10 codificado por un polinucleótido que hibrida en condiciones rigurosas a un polinucleótido complementario a la longitud total del polinucleótido de SEQ ID N.º 7, SEQ ID N.º 33 o SEQ ID N.º 38.

5 **[0008]** También se describe en el presente documento una composición que comprende glucosa producida por el método de cualquiera de los párrafos 27-36.

[0009] En el presente documento se describe también un almidón licuado producido por el método de cualquiera de los párrafos 27-36.

[0010] También se describe en el presente documento una bebida fermentada producida mediante el método de cualquiera de los párrafos 27-36.

10 **[0011]** A partir de la presente descripción y de los dibujos representados, se podrán observar estos y otros aspectos y formas de realización de las composiciones y métodos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0012]

15 La Figura 1 muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos de α -amilasa CspAmy2 (SEQ ID N.º 1), α -amilasa PcuAmy1 (SEQ ID N.º 3) y α -amilasa BASE, empleando Clustal W con parámetros por defecto.

La Figura 2 es un gráfico que muestra el beneficio de limpieza de distintas dosis de CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6 en almidón de arroz CS-28 con pH 8.

La Figura 3 es un gráfico que muestra la estabilidad térmica de CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6 en tampón.

20 La Figura 4 es un gráfico que muestra la estabilidad térmica de CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6 en tampón con calcio.

La Figura 5 es un gráfico que muestra la estabilidad detergente de CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6 en detergente OMO™ Color.

La Figura 6 es un gráfico que muestra la estabilidad detergente de CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6 en detergente EPSIL™ Perfect.

25 La Figura 7 es una tabla que muestra las semividas y los índices rendimiento relativos de las variantes de C16 y de las moléculas de referencia CspAmy2-v1-E187P y CspAmy2-v1-S241Q.

La Figura 8 es un gráfico que muestra la estabilidad térmica de las variantes de C16 y de las moléculas de referencia CspAmy2-v1-E187P y CspAmy2-v1-S241Q con pH 4,5 y a 65 °C.

30 La Figura 9 es un gráfico que muestra la estabilidad térmica de las variantes de C16 y de las moléculas de referencia CspAmy2-v1-E187P y CspAmy2-v1-S241Q con pH 5,0 y a 70°C.

La Figura 10 es un gráfico que muestra la estabilidad térmica de las variantes de C16 y de las moléculas de referencia CspAmy2-v1-E187P y CspAmy2-v1-S241Q con pH 5,7 y a 85°C.

La Figura 11 es un gráfico que muestra la estabilidad detergente de CspAmy2-v5, CspAmy2-v171, CspAmy2-v172 y ACE-QK.

35 La Figura 12 es un gráfico que muestra el rendimiento de limpieza relativo de CspAmy2-v5 y STAINZYME® en una aplicación de lavavajillas manual.

La Figura 13 incluye tablas que muestran las composiciones de detergente WfK B a base de citrato (A) y de detergente WfK C a base de fosfato (B).

40 Las Figuras 14 y 15 muestran el rendimiento de limpieza de CspAmy2-v6 (cuadrados) en comparación con POWERASE® (rombos), a dosis de 0, 1, 2, 4 u 8 ppm en detergente WfK B contra la mancha de mezcla de almidón (Figura 14) y la mancha de pasta (Figura 15).

Las Figuras 16 y 17 muestran el rendimiento de limpieza de CspAmy2-v6 (cuadrados) en comparación con STAINZYME® (círculos), a dosis de 0, 1, 2, 4 u 8 ppm en detergente WfK B contra la mancha de mezcla de almidón (Figura 16) y la mancha de pasta (Figura 17).

45 Las Figuras 18 y 19 muestran el rendimiento de limpieza de CspAmy2-v6 (cuadrados) en comparación con POWERASE® (rombos), a dosis de 0, 1, 2, 4 u 8 ppm en detergente WfK C contra la mancha de mezcla de almidón (Figura 18) y la mancha de pasta (Figura 19). CspAmy2-v6 presentó de forma evidente un mejor rendimiento que POWERASE® frente a ambas manchas.

50 La Figura 20 es un gráfico que muestra ejemplos de variantes de C18P que muestran una mejor hidrólisis de almidón de maíz a altas temperaturas. CspAmy2-C18P (N126Y + F153W + T180D + I203Y + S241Q) se muestra como referencia.

La Figura 21 es un gráfico que muestra ejemplos de variantes de C18P que muestran una mejor hidrólisis de amilopectina de maíz. C18P se muestra como referencia.

La Figura 22 es un gráfico que muestra ejemplos de variantes que muestran una mejor generación de azúcares reductores de almidón. C18P se muestra como referencia.

5 La Figura 23 es un gráfico que muestra ejemplos de variantes de C18P que muestran una mejor liberación de material de tinción de yodo de almidón. C18P se muestra como referencia.

La Figura 24 es un gráfico que muestra la reducción de viscosidad de la suspensión de harina de maíz producida por tres variantes de C18P que se representan como fluidez (1/viscosidad) frente a dosis de las variantes (en µg). C18P y C16F se muestran como referencia.

10 La Figura 25 es una tabla que muestra los valores de índice de rendimiento (PI, por sus siglas en inglés) de variantes de C16F que presentan distintos pares de combinaciones de mutaciones en las posiciones G476 y G477, con respecto a un control C16F, en un análisis de micromuestras de almidón de maíz. Los valores de PI de revertidos (es decir, G476G y G477G) se determinan empíricamente.

15 La Figura 26 es una tabla que muestra los valores de PI de variantes de C16F que presentan distintos pares de combinaciones de mutaciones en las posiciones G476 y G477 con respecto a un control C16F, en un ensayo de hidrólisis de amilosa de maíz. Los valores de PI de revertidos (es decir, G476G y G477G) se determinan empíricamente.

La Figura 27 es un gráfico que muestra el rendimiento de licuefacción relativo de CspAmy2-C25F, B, y A en comparación con C16F.

20 La Figura 28 es un gráfico que muestra los resultados de ensayos de limpieza llevados a cabo en 0,015 ppm con CspAmy2-v179, v186 y v191 en comparación con STAINZYME® y ACE-QK.

La Figura 29 es un gráfico que muestra la estabilidad térmica relativa de las variantes de CspAmy2 v5, v179, v186 y v191 en comparación con STAINZYME® y ACE-QK a temperaturas que oscilan entre 77 °C y 97 °C.

25 La Figura 30 es un gráfico que muestra la estabilidad de almacenamiento relativa dentro del detergente de las variantes de CspAmy2 v5 y v179 en comparación con STAINZYME® y ACE-QK en líquidos de alta resistencia (HDL, por sus siglas en inglés) habituales de TIDE®.

La Figura 31 es un gráfico que muestra la estabilidad de almacenamiento relativa dentro del detergente de las variantes de CspAmy2 v5 y v179 en comparación con STAINZYME® y ACE-QK en TIDE® PODS™ de EE. UU.

30 La Figura 32 es un gráfico que muestra la estabilidad de almacenamiento relativa dentro del detergente de las variantes de CspAmy2 v5 y v179 en comparación con STAINZYME® y ACE-QK en el HDL europeo ARIEL™.

La Figura 33 es un gráfico que muestra la estabilidad de almacenamiento relativa dentro del detergente de las variantes de CspAmy2 v5 y v179 en comparación con STAINZYME® y ACE-QK en el HDL europeo OMO™ Color.

35 La Figura 34 es un gráfico que muestra la estabilidad de almacenamiento relativa dentro del detergente de las variantes de CspAmy2 v5 y v179 en comparación con STAINZYME® y ACE-QK en el HDL chino OMO™ Color.

La Figura 35 es un gráfico que muestra la estabilidad de almacenamiento relativa dentro del detergente de las variantes de CspAmy2 v5 y v179 en comparación con STAINZYME® y ACE-QK en el HDL chino LIBY™.

40 La Figura 36 es un gráfico que muestra el rendimiento de limpieza relativa de las variantes de PcuAmy1 v1, v6, v8 y v16 en comparación con STAINZYME® y ACE-QK en tampón con pH 8,0. Las dosis de enzimas se indican en el eje X.

45 La Figura 37 es un gráfico que muestra la estabilidad térmica relativa de las variantes de PcuAmy1 v1, v6, v8 y v16 en comparación con STAINZYME® en tampón a las temperaturas indicadas. Se emplearon 5 ppm de variantes de PcuAmy1 y 10 ppm de STAINZYME®.

La Figura 38 es un gráfico que muestra la estabilidad térmica relativa de variantes de ΔRG BASE incubadas durante la cantidad de tiempo indicada a 95 °C.

La Figura 39 muestra una porción de la estructura tridimensional de CspAmy2-vl, subrayando el potencial de interacción entre un glutamato en la posición 132 y una treonina en la posición 180.

50 La Figura 40 muestra una porción de la estructura tridimensional de CspAmy2-vl, subrayando el potencial de interacción entre un glutamato en la posición 132 y una histidina en la posición 180.

La Figura 41 muestra una porción de la estructura tridimensional de CspAmy2-vl, subrayando el potencial de interacción entre un glutamato en la posición 132 y un aspartato en la posición 180.

La Figura 42 muestra una porción de la estructura tridimensional de CspAmy2-v1, subrayando el potencial de interacción entre una histidina en la posición 132 y un aspartato en la posición 180.

5 La Figura 43 es una imagen de un gel SDS/PAGE que muestra la escisión de PcuAmy1-v1 en presencia de cantidades crecientes de proteasa GG36. Las letras situadas a la derecha del gel indican (A) PcuAmy1-v1 intacta de longitud completa, (B) un primer producto de escisión de PcuAmy1-v1, (C) proteasa GG36, (D) un contaminante en la preparación de proteína GG36, y (E) un segundo producto de escisión de PcuAmy1-v1.

La Figura 44 es un gráfico que muestra la actividad de α -amilasa residual de PcuAmy1 y diversas variantes modificadas tras incubación con proteasa GG36.

10 La Figura 45 es una imagen de un gel SDS/PAGE que muestra la escisión proteolítica de PcuAmy1-v1 y de diversas variantes modificadas tras la incubación con proteasa GG36.

La Figura 46 es un gráfico que muestra la estabilidad de PcuAmy1-v1 y de diversas variantes modificadas tras incubación con proteasa GG36 en detergente MIFA Total durante un máximo de 14 días a 37 °C.

La Figura 47 es un gráfico que muestra la estabilidad de PcuAmy1-v1 y de diversas variantes modificadas tras incubación con proteasa GG36 en detergente MIFA Total durante 3 o 14 días a 37 °C.

15 La Figura 48 es un gráfico que muestra la estabilidad de PcuAmy1-v1 y de diversas variantes modificadas tras incubación con proteasa GG36 en detergente Unilever OMO durante un máximo de 14 días a 37 °C.

La Figura 49 es un gráfico que muestra la estabilidad de PcuAmy1-v1 y de diversas variantes modificadas tras incubación con proteasa GG36 en detergente Unilever OMO durante 3 o 14 días a 37 °C.

20 La Figura 50 es un gráfico que muestra el rendimiento de limpieza dependiente de la dosis de PcuAmyl-3B y PcuAmyl-3L en tampón con pH 8,0 en comparación con dos criterios de referencia comerciales.

La Figura 51 es un gráfico que muestra la estabilidad de PcuAmyl-3B y PcuAmyl-3L en detergente Persil Universal Gel Gold en comparación con dos criterios de referencia comerciales.

La Figura 52 es un gráfico que muestra la estabilidad de PcuAmy1-v1 y de diversas variantes modificadas tras incubación con proteasa GG36 en detergente MIFA Total durante 3 o 14 días a 37 °C.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0013] Se describen composiciones y métodos en relación con enzimas de variante de amilasa. Las variantes se descubrieron mediante una combinación de enfoques experimentales, como se detalla en los Ejemplos adjuntos. En los enfoques se incluye el uso de bibliotecas de evaluación de sitio (SEL, por sus siglas en inglés) y el análisis basado en la estructura. Ejemplos de aplicaciones de las enzimas de variante de amilasa se destinan a la licuefacción y sacarificación de almidón, limpieza de manchas de almidón en la ropa, limpieza de vajilla, y otras aplicaciones se destinan al procesamiento textil (p. ej., descolado), a la alimentación animal para mejorar la digestibilidad, y para elaborar productos de panadería y cerveza. A continuación, se describen con detalle estos y otros aspectos de las composiciones y métodos.

35 [0014] Antes de describir los diversos aspectos y formas de realización de las presentes composiciones y métodos, se describen las siguientes definiciones y abreviaturas.

1. Definiciones y Abreviaturas

[0015] De conformidad con esta descripción detallada, se aplican las siguientes abreviaturas y definiciones. Nótese que las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. En consecuencia, por ejemplo, la referencia a "una enzima" incluye una pluralidad de dichas enzimas, y la referencia a "la dosis" incluye referencias a una o más dosis y a equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la materia, etc.

45 [0016] El presente documento se organiza en una serie de secciones para facilitar la lectura; sin embargo, el lector apreciará que las afirmaciones realizadas en una sección pueden ser aplicables a otras secciones. De esta forma, los encabezamientos utilizados para las distintas secciones de la exposición no deberían interpretarse como limitativos.

[0017] A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia. Los siguientes términos se proporcionan a continuación.

1.1. Abreviaturas y Acrónimos

50 [0018] Los siguientes acrónimos/abreviaturas tienen los siguientes significados a no ser que se especifique otra cosa:

ES 2 676 895 T3

	ABTS	ácido 2,2-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico
	ADN	ácido desoxirribonucleico
	ADNc	ADN complementario
	AE o AEO	etoxilato de alcohol
5	AES o AEOS	etoxisulfato de alcohol
	AkAA	α -amilasa de <i>Aspergillus kawachii</i>
	AnGA	glucoamilasa de <i>Aspergillus niger</i>
	AOS	α -olefinsulfonato
	ARN	ácido ribonucleico
10	AS	sulfato de alquilo
	cent/kg	centavos/kg (divisa de EE. UU)
	CMC	carboximetilcelulosa
	DE	dextrosa equivalente
	DPn	grado de polimerización de sacárido con n subunidades
15	ds o DS	sólidos secos
	DTMPA	ácido dietilentriaminopentaacético
	EC	Comisión de Enzimas
	EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
	EO	óxido de etileno (fragmento de polímero)
20	EOF	fin de fermentación
	FH	dureza francesa
	GA	glucoamilasa
	GAU/g ds	unidad de actividad de glucoamilasa/gramos de sólidos secos
	GH	dureza general
25	HDL	detergente líquido de alta densidad
	HDD	detergente en polvo de alta resistencia
	HSG	detergente granulado de alta espuma
	HFCS	jarabe de maíz de alta fructosa
	HgCA	glucoamilasa de <i>Humicola grisea</i>
30	IPTG	isopropil β -D-1-tiogalactósido
	IRS	almidón residual insoluble
	kDa	kiloDalton
	LAS	sulfonato de alquilbenceno lineal
	LAT, BLA	amilasa de <i>B. licheniformis</i>
35	MWU	unidad Wohlgemuth modificada; $1,6 \times 10^{-5}$ mg/MWU = unidad de actividad
	NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
	NOBS	nonanoiloxibencenosulfonato
	NTA	ácido nitriloacético
	OxAm	Purastar HPAM 5000 I (Danisco US Inc.)
40	PAHBAH	hidracida de ácido p-hidroxibenzoico
	PEG	polietilenglicol

ES 2 676 895 T3

	pl	punto isoeléctrico
	PI	índice de rendimiento
	PM	peso molecular
	ppm	partes por millón, p. ej., µg de proteína por gramo de sólido seco
5	PVA	poli(alcohol vinílico)
	PVP	poli(vinilpirrolidona)
	RCF	fuerza centrífuga/centrípeta relativa (es decir, x gravedad)
	SAS	alcanosulfonato
	SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
10	SSF	sacarificación y fermentación simultánea
	SSU/g sólidos	unidad de almidón soluble/gramos de sólidos secos
	sp.	especie
	TAED	tetraacetiltilenodiamina
	Tm	temperatura de fusión
15	TrGA	glucoamilasa de <i>Trichoderma reesei</i>
	p/v	peso/volumen
	p/p	peso/peso
	v/v	volumen/volumen
	% en peso	porcentaje en peso
20	°C	grados centígrados
	H ₂ O	agua
	dH ₂ O o DI	agua desionizada
	dIH ₂ O	agua desionizada, filtración Milli-Q
	g or gm	gramos
25	µg	microgramos
	mg	miligramos
	kg	kilogramos
	µL y µl	microlitros
	mL y ml	mililitros
30	mm	milímetros
	µm	micrómetro
	M	molar
	mM	milimolar
	µM	micromolar
35	U	unidades
	s	segundos
	min	minuto/minutos
	h	hora/horas
	DO	oxígeno disuelto
40	Ncm	Newton centímetro
	ETOH	etanol

	eq.	equivalentes
	N	normal
	uPWA	variante de α -amilasa derivada de <i>Pyrococcus woesei</i>
	PWA	α -amilasa de <i>Pyrococcus woesei</i>
5	MWCO	límite de peso molecular
	SSRL	Fuente de luz de radiación sincrotrón de Stanford
	PDB	Base de datos de proteínas
	CAZy	Base de datos de enzimas activas en carbohidratos
	Tris-HCl	tris(hidroximetil)aminometano clorhidrato
10	HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico

1.2. Definiciones

[0019] Los términos «amilasa» o «enzima amilolítica» se refieren a una enzima que, entre otras cosas, es capaz de catalizar la degradación de almidón. Las α -amilasas son hidrolasas que escinden los enlaces α -D-(1→4) O-glucosídicos en almidón. Por lo general, las α -amilasas (EC 3.2.1.1; glucanohidrolasa α -D-(1→4)-glucano) se definen como enzimas endoactivas que escinden enlaces α -D-(1→4) O-glucosídicos en la molécula de almidón de manera aleatoria produciendo polisacáridos que contienen tres o más unidades de D-glucosa con enlaces (1-4)- α . En cambio, las enzimas amilolíticas exoactivas, como β -amilasas (EC 3.2.1.2; maltohidrolasa α -D-(1→4)-glucano) y algunas amilasas específicas del producto, como α -amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133), escinden la molécula de polisacárido desde el extremo no reductor del sustrato. Las β -amilasas, α -glucosidasas (EC 3.2.1.20; glucohidrolasa α -D-glucósido), glucoamilasa (EC 3.2.1.3; glucohidrolasa α -D-(1→4)-glucano) y amilasas específicas del producto, como las maltotetraosidasas (EC 3.2.1.60) y las maltohexaosidasas (EC 3.2.1.98) pueden producir maltooligosacáridos de una longitud concreta o jarabes enriquecidos de maltooligosacáridos concretos.

[0020] En el presente documento, el término «unidades enzimáticas» se refiere a la cantidad de producto formado por unidad de tiempo en las condiciones específicas del ensayo. Por ejemplo, una «unidad de actividad glucoamilasa» (GAU) se define como la cantidad de enzima que produce 1 g de glucosa por hora a partir de sustrato de almidón soluble (4 % DS) a 60 °C en pH 4,2. Una «unidad de almidón soluble» (SSU) es la cantidad de enzima que produce 1 mg de glucosa por minuto a partir de sustrato de almidón soluble (4 % DS) en pH 4,5 a 50 °C. DS hace referencia a «sólidos secos».

[0021] El término «almidón» se refiere a cualquier material comprendido por los carbohidratos complejos polisacáridos de plantas, comprendido por amilosa y amilopectina con la fórmula (C₆H₁₀O₅)_x, donde X puede ser cualquier número. El término incluye materiales de procedencia vegetal como granos, cereales, hierbas, tubérculos y raíces, y más concretamente materiales obtenidos a partir de trigo, cebada, maíz, centeno, arroz, sorgo, salvados, mandioca, mijo, milo, patata, boniato y tapioca. El término «almidón» incluye almidón granular. El término «almidón granular» se refiere a almidón crudo, es decir, sin cocinar, p. ej., almidón que no se ha sometido a gelatinización.

[0022] Los términos "natural", "original," o "de referencia", con respecto a un polipéptido, se refieren a un polipéptido de origen natural que no incluye una sustitución, inserción o delección artificial en una o más posiciones de aminoácidos. Del mismo modo, los términos "natural", "original," o "de referencia", con respecto a un polinucleótido, se refieren a un polinucleótido de origen natural que no incluye un cambio de nucleósidos artificial. No obstante, nótese que un polinucleótido que codifica un polipéptido natural, original o de referencia no se limita a un polinucleótido de origen natural, y abarca cualquier polinucleótido que codifica el polipéptido natural, original o de referencia.

[0023] Se entiende que las referencias al polipéptido natural incluyen la forma madura del polipéptido. Un polipéptido «maduro» o variante del mismo es uno en el cual una secuencia de señal está ausente, por ejemplo, escindida de una forma inmadura del polipéptido durante o tras la expresión del polipéptido.

[0024] El término «variante», con respecto a un polipéptido, se refiere a un polipéptido que difiere de un polipéptido concreto natural, original o de referencia en cuanto a que este incluye una o más sustituciones, inserciones o delecciones de origen natural o artificial de un aminoácido. Del mismo modo, el término «variante», con respecto a un polinucleótido, se refiere a un polinucleótido que difiere en la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido específico natural, original o de referencia. La identidad del polipéptido o polinucleótido natural, original o de referencia resultará evidente por el contexto.

[0025] En el caso de las presentes α -amilasas, la «actividad» se refiere a actividad α -amilasa, que puede medirse según se ha descrito en el presente documento.

[0026] El término «beneficio de rendimiento» se refiere a una mejora de una propiedad deseable de una molécula. Entre los ejemplos de beneficios de rendimiento se incluyen, sin carácter limitativo, un aumento de la hidrólisis de un sustrato de almidón, un aumento del rendimiento de licuefacción de un grano, cereal u otro sustrato de almidón, un aumento del rendimiento de limpieza, un aumento de la estabilidad térmica, un aumento de la estabilidad detergente, un aumento de la estabilidad de almacenamiento, un aumento de la solubilidad, una alteración del perfil de pH, una reducción de la dependencia al calcio, un aumento de la actividad específica, una modificación de la especificidad de sustrato, una modificación de la unión al sustrato, una modificación de la actividad dependiente del pH, una modificación de la estabilidad dependiente del pH, un aumento de la estabilidad oxidativa, y un aumento de la expresión. En algunos casos, el beneficio de rendimiento se lleva a cabo a una temperatura relativamente baja. En algunos casos, el beneficio de rendimiento se lleva a cabo a una temperatura relativamente alta.

[0027] Los términos «proteasa» y «proteínasa» se refieren a una proteína enzimática que posee la capacidad de llevar a cabo la «proteólisis» o «escisión proteolítica», que se refiere a la hidrólisis de enlaces peptídicos que unen aminoácidos entre sí en una cadena peptídica o polipeptídica que forma la proteína. Esta actividad de una proteasa como una enzima capaz de digerir proteínas se denomina «actividad proteolítica». Existen numerosos procedimientos conocidos para medir la actividad proteolítica (véase, p. ej., Kalisz, "Microbial Proteinases". En: Fiechter (ed.), *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, (1988)). Por ejemplo, se puede determinar la actividad proteolítica mediante ensayos comparativos que analizan la capacidad que posee la proteasa respectiva para hidrolizar un sustrato comercial. Entre los ejemplos de sustratos útiles para el análisis de actividad de proteasa o proteolítica se incluyen, sin carácter limitativo, dimetil caseína (Sigma C-9801), colágeno bovino (Sigma C-9879), elastina bovina (Sigma E-1625) y queratina bovina (ICN Biomedical 902111). Los ensayos colorimétricos que utilizan estos sustratos se conocen bien en la técnica (Véase, p. ej., WO 99/34011 y la solicitud de patente americana n.º 6,376,450). El ensayo pNA (véase, p. ej., Del Mar *et al.*, *Anal. Biochem.* 99:316-320 [1979]) también se emplea para determinar la concentración de enzimas activas por fracciones recogidas durante la elución en gradiente. Este ensayo mide el ritmo de liberación de p-nitroanilina cuando la enzima hidroliza un sustrato peptídico sintético soluble, como succinil-alanina-alanina-prolina-fenilalanina-p-nitroanilida (suc-AAPF-pNA), y la escisión ocurre entre el aminoácido C-terminal (fenilalanina) y el p-NA, provocando la producción de color amarillo a partir de la reacción de hidrólisis, que se mide a 410 nm en un espectrofotómetro y es proporcional a la concentración de enzimas activas. La medición del cambio de color permite calcular la velocidad de la reacción. Además, las mediciones de absorbancia a 280 nanómetros (nm) pueden emplearse para determinar la concentración total de proteínas. La proporción de enzimas activas/total de proteínas proporciona la pureza enzimática cuando se utiliza un estándar de referencia.

[0028] El término «serina proteasa» se refiere a enzimas que escinden enlaces peptídicos en proteínas, donde la serina de las enzimas actúa como el aminoácido nucleófilo en el sitio activo de la enzima. Las serina proteasas se clasifican en dos categorías amplias en base a su estructura: similares a la quimotripsina (similares a la tripsina) o similares a la subtilisina. Las que se utilizan más frecuentemente en detergentes para ropa y lavavajillas son serina proteasas, especialmente subtilisinas.

[0029] El término «barril TIM» se refiere a una estructura polipeptídica tridimensional que incluye ocho hélices α y ocho láminas β paralelas que se alternan a lo largo del esqueleto peptídico.

[0030] El término «expuesto a la superficie» en relación con un residuo de aminoácido en un polipéptido se refiere a un residuo que se encuentra en la superficie exterior de un polipéptido cuando el polipéptido está intacto y plegado de forma adecuada, es decir, ni desnaturalizado ni fragmentado. En el caso de una α -amilasa, la estructura se denomina barril TIM.

[0031] El término «no canónico» en relación con un residuo de aminoácido en un polipéptido se refiere a un residuo que no se encuentra habitualmente en una posición determinada en función de alineamientos de secuencias de aminoácidos de moléculas similares empleando Clustal W con parámetro por defecto. En algunos casos, el residuo concreto se halla en una posición determinada únicamente en 1 de 10, 1 de 20, 1 de 30, 1 de 50, o incluso 1 de 100 moléculas similares.

[0032] Las «variantes combinatorias» son variantes que comprenden dos o más mutaciones, p. ej., 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sustituciones, deleciones y/o inserciones.

[0033] Las «mutaciones combinables» son mutaciones en cualquier posición de aminoácido que pueden utilizarse para realizar variantes combinatorias. Las mutaciones combinables mejoran al menos una propiedad deseada de la molécula (en este caso, una amilasa), mientras que no reducen significativamente la expresión, la actividad ni la estabilidad.

[0034] Términos como «un residuo no G restante en el lazo de unión al calcio», «un residuo de aminoácido no G restante en el lazo de unión al calcio», y términos similares, se refieren a un residuo de aminoácido en el lazo de unión al calcio de una variante de α -amilasa, que permanece en la variante tras una deleción de al menos un residuo de aminoácido en el lazo de unión al calcio de α -amilasas originales, y que no es un residuo de glicina. El residuo no G puede ser un miembro de un par «XG», de los que hay dos en la mayoría de α -amilasas, y puede

ser el residuo no G restante tras una deleción por pares de uno de los dos pares de residuo XG en el lazo de unión al calcio de una α -amilasa original.

[0035] Una «interacción estabilizante» entre el residuo en la posición 132 (utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración) y el residuo no G restante en el motivo $X_1G/S_1X_2G_2$ (correspondiente a residuos en las posiciones 178-181 de la SEQ ID N.º 1) se refiere a un enlace de hidrógeno o a un puente salino formado entre las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos objeto. La estabilización puede ser consecuencia de la compensación de cargas de los residuos que interactúan, de tal forma que si un residuo tiene carga positiva en un pH preseleccionado, el otro tiene carga negativa, y la carga total es cero.

[0036] El término "recombinante", cuando se utiliza en referencia a una célula, un ácido nucleico, una proteína o un vector objetos, indica que el objeto ha sido modificado de su estado nativo. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula, o expresan genes nativos a distintos niveles o en distintas condiciones de las que se encuentran en la naturaleza. Los ácidos nucleicos recombinantes difieren de una secuencia nativa en uno o más nucleótidos, y/o están ligados de forma operativa a secuencias heterólogas, p. ej., un promotor heterólogo en un vector de expresión. Las proteínas recombinantes se pueden distinguir de una secuencia nativa por uno o más aminoácidos, y/o están fusionados con secuencias heterólogas. Un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una amilasa es un vector recombinante.

[0037] Los términos «recuperado/a(s)», «aislado/a(s)» y «separado/a(s)» se refieren a un compuesto, proteína (polipéptidos), célula, ácido nucleico, aminoácido u otro material o componente especificado que se elimina de al menos un otro material o componente al que se asocia de forma natural como se puede encontrar en la naturaleza. Un polipéptido «aislado» incluye, sin carácter limitativo, un caldo de cultivo que contiene el polipéptido secretado expresado en una célula huésped heteróloga.

[0038] El término «purificado/a(s)» se refiere al material (p. ej., un polipéptido o polinucleótido aislado) que se encuentra en un estado relativamente puro, por ejemplo, al menos aproximadamente un 90 % puro, al menos aproximadamente un 95 % puro, al menos aproximadamente un 98 % puro, o incluso al menos aproximadamente un 99 % puro.

[0039] El término «enriquecido/a(s)» se refiere al material (p. ej., un polipéptido o polinucleótido aislado) que es al menos aproximadamente un 50 % puro, al menos aproximadamente un 60 % puro, al menos aproximadamente un 70 % puro, o incluso al menos aproximadamente un 70 % puro.

[0040] Los términos «termoestable(s)» y «estabilidad térmica», en relación con una enzima, se refieren a la capacidad de la enzima para retener actividad tras una exposición a una temperatura elevada. La estabilidad térmica de una enzima, como una enzima amilasa, se mide mediante su semivida ($t_{1/2}$) proporcionada en minutos, horas, o días, durante la cual se pierde la mitad de la actividad enzimática en condiciones definidas. La semivida se puede calcular midiendo la actividad de α -amilasa residual tras una exposición (es decir, tras hacer frente) a una temperatura elevada.

[0041] Un «intervalo de pH», en lo relativo a una enzima, se refiere al intervalo de valores de pH en los que la enzima muestra actividad catalítica.

[0042] Los términos «pH estable» y «estabilidad de pH», en lo relativo a una enzima, están relacionados con la capacidad de la enzima para retener actividad en un intervalo amplio de valores de pH para un período de tiempo predeterminado (p. ej., 15 min, 30 min, 1 h).

[0043] El término «secuencia de aminoácidos» es sinónimo de los términos «polipéptido», «proteína» y «péptido», y se utilizan indistintamente. En los casos en los que dichas secuencias de aminoácidos muestran actividad, se puede hacer referencia a los mismos como una «enzima». Se emplean los códigos convencionales de una letra o de tres letras para los residuos de aminoácidos, presentando secuencias de aminoácidos en la orientación habitual amino-carboxi terminal (es decir, N→C).

[0044] El término «ácido nucleico» abarca ADN, ARN, heterodúplexes y moléculas sintéticas capaces de codificar un polipéptido. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, y pueden ser modificaciones químicas. Los términos «ácido nucleico» y «polinucleótido» se utilizan indistintamente. Dado que el código genético es degenerado, se puede utilizar más de un codón para codificar un aminoácido concreto, y las presentes composiciones y métodos abarcan secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos concreta. A no ser que se indique lo contrario, las secuencias de ácidos nucleicos se presentan en orientación 5' a 3'.

[0045] La "hibridación" se refiere al proceso mediante el cual una cadena de ácidos nucleicos forma un dúplex, es decir, pares de bases con una cadena complementaria, como sucede durante las técnicas de hibridación *blot* y las técnicas de PCR. Como ejemplo de condiciones rigurosas de hibridación, se puede mencionar la hibridación en las siguientes condiciones: 65 °C y 0,1X SSC (donde IX SSC = 0,15 M de NaCl, 0,015 M de citrato de Na₃, pH 7,0). Los ácidos nucleicos dúplex hibridados se caracterizan por una temperatura de fusión (T_m), donde una mitad de los ácidos nucleicos hibridados están mal emparejados con la cadena complementaria. Los

nucleótidos mal emparejados en el dúplex reducen la T_m. Un ácido nucleico que codifica una variante de α-amilasa puede presentar una T_m reducida en 1 °C - 3 °C o más en comparación con un dúplex formado entre el nucleótido de SEQ ID N.º 2 y su complemento idéntico.

5 **[0046]** Una molécula «sintética» se produce mediante síntesis química o enzimática *in vitro* en lugar de mediante un organismo.

[0047] Los términos «transformado/a(s)», «transformado/a(s) de forma estable» y «transgénico/a(s)», utilizados en referencia a una célula, significan que la célula contiene una secuencia de ácidos nucleicos no nativa (p. ej., heteróloga) integrada en su genoma o portada como un episoma que se mantiene a través de múltiples generaciones.

10 **[0048]** El término "introducido/a(s)" en el contexto de la inserción de una secuencia de ácido nucleico en una célula significa "transfección", «transformación» o "transducción", como se conoce en la técnica.

15 **[0049]** Una "cepa huésped" o "célula huésped" es un organismo en el que se ha introducido un vector de expresión, fago, virus, u otro constructo de ADN, incluyendo un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés (p. ej., una amilasa). Ejemplos de cepas huésped son las células de microorganismos (p. ej., bacterias, hongos filamentosos y levaduras) capaces de expresar el polipéptido de interés y/o de fermentar sacáridos. El término "célula huésped" incluye protoplastos creados a partir de células.

[0050] El término "heterólogo/a(s)", en referencia a un polinucleótido o proteína, se refiere a un polinucleótido o proteína que no está presente de forma natural en una célula huésped.

20 **[0051]** El término "endógeno/a(s)", en referencia a un polinucleótido o proteína, se refiere a un polinucleótido o proteína que está presente de forma natural en la célula huésped.

[0052] El término "expresión" se refiere al proceso mediante el cual se produce un polipéptido basado en una secuencia de ácido nucleico. El proceso incluye tanto transcripción como traducción.

25 **[0053]** Un «marcador selectivo» o «marcador de selección» se refiere a un gen capaz de ser expresado en un huésped para facilitar la selección de células huésped que portan el gen. Entre los ejemplos de marcadores de selección se incluyen, sin carácter limitativo, sustancias antimicrobianas (p. ej., higromicina, bleomicina o cloranfenicol) y/o genes que confieren una ventaja metabólica, como una ventaja nutricional en la célula huésped.

30 **[0054]** Un «vector» se refiere a una secuencia de polinucleótidos diseñada para introducir ácidos nucleicos en uno o más tipos de células. Entre los vectores se incluyen vectores de clonación, vectores de expresión, vectores de transporte, plásmidos, partículas de fago, casetes y similares.

35 **[0055]** Un "vector de expresión" se refiere a un constructo de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés, cuya secuencia de codificación está ligada de forma operativa a una secuencia de control apropiada capaz de efectuar la expresión del ADN en un huésped adecuado. Dichas secuencias de control pueden incluir un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión al ribosoma en el ARNm, intensificadores y secuencias que controlen la conclusión de la transcripción y la traducción.

40 **[0056]** El término «ligado/a(s) de forma operativa» significa que los componentes específicos se encuentran relacionados (incluyendo, sin carácter limitativo, mediante yuxtaposición), lo cual les permite funcionar de una forma prevista. Por ejemplo, una secuencia reguladora está ligada de forma operativa a una secuencia de codificación de forma que la expresión de la secuencia de codificación está controlada por las secuencias reguladoras.

[0057] Una «secuencia de señal" es una secuencia de aminoácidos adjunta a la parte N-terminal de una proteína que facilita la secreción de la proteína fuera de la célula. La forma madura de la proteína extracelular carece de la secuencia de señal, que se escinde durante el proceso de secreción.

45 **[0058]** «Biológicamente activo/a(s)» se refiere a una secuencia que presenta una actividad biológica específica, como una actividad enzimática.

[0059] El término «actividad específica» se refiere al número de moles de sustrato que pueden convertirse en producto mediante una enzima o preparación de enzima por unidad de tiempo en condiciones específicas. La actividad específica se expresa por lo general en unidades (U)/mg de proteína.

50 **[0060]** Según se utiliza en el presente documento, la «dureza del agua» es una medida de los minerales (p. ej., calcio y magnesio) presentes en agua.

55 **[0061]** Una «muestra» es una pieza de material como un tejido al que se le ha aplicado una mancha. El material puede ser, por ejemplo, tejido hecho de algodón, poliéster o mezclas de fibras naturales y sintéticas. La muestra puede ser además papel, como papel de filtro o nitrocelulosa, o una pieza de un material duro como cerámica, metal o vidrio. En el caso de las amilasas, la mancha tiene como base almidón, pero puede incluir sangre, leche,

tinta, hierba, té, vino, espinacas, salsa, chocolate, huevo, queso, barro, pigmento, aceite, o mezclas de estos compuestos.

5 **[0062]** Una «muestra más pequeña» es una sección de la muestra que se ha cortado con un único dispositivo perforador de agujeros, o que se ha cortado con un dispositivo perforador de 96 agujeros personalizado, donde el patrón de perforación de múltiples agujeros se empareja con microplacas de 96 pocillos convencionales, o la sección se ha extraído de la muestra de otro modo. La muestra puede ser de textil, papel, metal u otro material adecuado. La mancha puede haberse aplicado a la muestra más pequeña antes o después de que se coloque en el pocillo de la microplaca de 24, 48 o 96 pocillos. La muestra más pequeña puede realizarse también aplicando una mancha a una parte pequeña de material. Por ejemplo, la muestra más pequeña puede ser una pieza de tejido manchada de 5/8" o 0,25" de diámetro. El perforador personalizado está diseñado de tal forma que reparte simultáneamente 96 muestras en todos los pocillos de la placa de 96 pocillos. El dispositivo permite el reparto de más de una muestra por pocillo simplemente cargando la misma placa de 96 pocillos varias veces. Los dispositivos perforadores de múltiples agujeros pueden estar diseñados para repartir muestras simultáneamente en una placa de cualquier formato, incluidas, sin carácter limitativo, placas de 24, 48 o 96 pocillos. En otro método posible, la plataforma de ensayo sucia puede ser una perla hecha de metal, plástico, vidrio, cerámica u otro material adecuado que se recubre con el sustrato de suciedad. La una o más perlas recubiertas se colocan entonces en placas de 96, 48 o 24 pocillos o formatos mayores, que contienen tampón y enzima adecuados.

20 **[0063]** «Un material celular cultivado que comprende una amilasa» u otras expresiones similares, se refieren a un lisado o sobrenadante celular (incluyendo medios) que incluye una amilasa como componente. El material celular puede ser de un huésped heterólogo que prolifera en cultivo con el fin de producir la amilasa.

25 **[0064]** Un «porcentaje de identidad de secuencia» significa que una secuencia concreta presenta al menos un cierto porcentaje de residuos de aminoácidos idénticos a los que se encuentran en una secuencia de referencia específica, al alinearse empleando el algoritmo CLUSTAL W con parámetros por defecto. Véase Thompson *et al.* (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-4680. Los parámetros por defecto del algoritmo CLUSTAL W son:

	Gap opening penalty [<i>penalización por apertura de hueco</i>]:	10,0
	Gap extension penalty [<i>penalización por extensión de hueco</i>]:	0,05
	Protein weight matrix [<i>matriz de peso de proteína</i>]:	BLOSUM series
	DNA weight matrix [<i>matriz de peso de ADN</i>]:	IUB
30	Delay divergent sequences % [<i>% de retraso de secuencias divergentes</i>]:	40
	Gap separation distance [<i>distancia de separación de huecos</i>]:	8
	DNA transitions weight [<i>peso de transiciones de ADN</i>]:	0,50
	List hydrophilic residues [<i>listar residuos hidrofílicos</i>]:	GPSNDQEKR
	Use negative matrix [<i>usar matriz negativa</i>]:	OFF
35	Toggle Residue specific penalties [<i>alternar penalizaciones específicas de residuos</i>]:	ON
	Toggle hydrophilic penalties [<i>alternar penalizaciones hidrofílicas</i>]:	ON
	Toggle end gap separation penalty [<i>alternar penalización por separación de hueco final</i>]:	OFF

40 **[0065]** Las deleciones se cuentan como residuos no idénticos, en comparación con una secuencia de referencia. Se incluyen las deleciones que suceden en cualquier terminal. Por ejemplo, una variante con cinco deleciones de aminoácido del C-terminal del polipéptido maduro de CspAmy2 de la SEQ ID N.º 1 presentaría un porcentaje de identidad de secuencia del 99 % (612/617 residuos idénticos x 100, redondeado al número entero más próximo) en relación con el polipéptido maduro. Dicha variante estaría abarcada por una variante que presenta «al menos un 99 % de identidad de secuencia» con un polipéptido de amilasa maduro.

45 **[0066]** Las secuencias polipeptídicas "fusionadas" están conectadas, esto es, ligadas de forma operativa, por medio de un enlace peptídico entre dos secuencias de polipéptidos objeto.

[0067] El término "hongos filamentosos" se refiere a todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycotina, especialmente la especie Pezizomycotina.

50 **[0068]** El término «grado de polimerización» (DP) se refiere al número (n) de unidades de anhidroglucopiranososa en un sacárido determinado. Ejemplos de DP1 son los monosacáridos glucosa y fructosa. Ejemplos de DP2 son los disacáridos maltosa y sacarosa. El término «DE» o «dextrosa equivalente» se define como el porcentaje de azúcar reductor, esto es, D-glucosa, como una fracción de los carbohidratos totales presentes en un jarabe.

[0069] El término «contenido de sólidos secos» (ds) se refiere a los sólidos totales de una suspensión expresados en porcentaje en peso seco. El término «suspensión» se refiere a una mezcla acuosa que contiene sólidos insolubles.

55 **[0070]** La expresión «sacarificación y fermentación simultánea (SSF)» se refiere a un proceso en la producción de sustancias bioquímicas en las que está presente un organismo microbiano, como un microorganismo etanológico, y al menos una enzima, como una amilasa, durante la misma etapa del proceso. La SSF incluye la hidrólisis simultánea de sustratos de almidón (granular, licuado o solubilizado) a sacáridos, incluida glucosa, y

la fermentación de los sacáridos en alcohol u otro compuesto bioquímico o biomaterial en el mismo recipiente de reacción.

[0071] Un «microorganismo etanológico» se refiere a un microorganismo con la capacidad de convertir un azúcar u oligosacárido a etanol.

5 **[0072]** El término «bebida fermentada» se refiere a cualquier bebida producida por un método que comprenda un proceso de fermentación, como una fermentación microbiana, p. ej., una fermentación bacteriana y/o fúngica. La «cerveza» es un ejemplo de dicha bebida fermentada, y se considera que el término «cerveza» comprende cualquier mosto fermentado que se ha producido mediante fermentación/destilación de un material vegetal que contiene almidón. A menudo, la cerveza se produce exclusivamente a partir de malta o de complemento, o
10 cualquier combinación de malta y complemento. Ejemplos de cervezas incluyen: cerveza de pura malta, cerveza elaborada de acuerdo con el *Reinheitsgebot* o ley de pureza de 1516, cerveza de fermentación alta o *ale*, *India pale ale*, cerveza de fermentación baja o *lager*, rubia o *pilsner*, cerveza amarga o *bitter*, Happoshu (segunda cerveza), tercera cerveza, cerveza seca, bebida afin a la cerveza, cerveza ligera, cerveza de bajo contenido alcohólico, cerveza baja en calorías, *porter*, *bock*, *dopplebock*, cerveza negra, *porter*, licor de malta, cerveza sin alcohol, licor de malta sin alcohol y similares, pero también bebidas a base de malta y cereales alternativas, tales como bebidas de malta con sabor a fruta, por ejemplo, bebidas de malta con sabor a cítrico, tales como con sabor a limón, naranja, lima o bayas, bebidas a base de malta con sabor a licor, por ejemplo, licor de malta con sabor a vodka, ron o tequila o bebidas de malta con sabor a café, tales como licor de malta con sabor a cafeína, y similares.

20 **[0073]** El término «malta» se refiere a cualquier grano de cereal malteado, como cebada malteada o trigo malteado.

[0074] El término «complemento» se refiere a cualquier material vegetal que contiene almidón y/o azúcar que no sea malta, como malta de cebada o de trigo. Entre los ejemplos de complementos se incluyen sémola de maíz común, sémola de maíz refinada, levadura de cerveza molida, arroz, sorgo, almidón de maíz refinado, cebada,
25 almidón de cebada, cebada descascarillada, trigo, almidón de trigo, cereal torrefacto, copos de cereal, centeno, avena, patata, tapioca, mandioca y jarabes, tales como jarabe de maíz, jarabe de caña de azúcar, jarabe de azúcar invertido, jarabes de cebada y/o de trigo y similares.

[0075] El término «pulpa» se refiere a una suspensión acuosa de cualquier material vegetal que contiene almidón y/o azúcar, como malta molida, por ejemplo, que comprende malta de cebada triturada, cebada triturada,
30 y/u otro adjunto o una combinación de los mismos, que se mezcla con agua más adelante para separarse en mosto y bagazos.

[0076] El término «mosto» se refiere al extracto de licor no fermentado tras la extracción de la malta molida durante la molienda.

[0077] El «almidón positivo al yodo» o «IPS», se refiere a (1) amilosa no hidrolizada tras la licuefacción y la sacarificación, o (2) un polímero de almidón retrogradado. Al analizar con yodo el almidón sacarificado o el licor
35 sacarificado, la amilosa con un DPn alto o el polímero de almidón retrogradado se une al yodo y produce un característico color azul. Se denomina por tanto al licor de sacárido «sacárido positivo al yodo», «sacárido azul» o «sac. azul».

[0078] Los términos «almidón retrogradado» o «retrogradación del almidón» se refieren a cambios que ocurren de forma espontánea en una pasta o gel de almidón al envejecer.

[0079] El término «aproximadamente» se refiere a $\pm 15\%$ con respecto al valor de referencia.

2. Variantes de α -amilasa

[0080] Un aspecto de las presentes composiciones y métodos es una variante de enzimas amilasas que incluye combinaciones de mutaciones que mejoran su rendimiento en aplicaciones industriales. Las variantes
45 combinatorias se descubrieron inicialmente utilizando una α -amilasa de *Cytophaga* sp. (en el presente documento, «amilasa CspAmy2»), que describió anteriormente Jeang, C-L *et al.* ((2002) Applied and Environmental Microbiology, 68:3651-54). La secuencia de aminoácidos de la forma madura del polipéptido de α -amilasa CspAmy2 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 1:

ES 2 676 895 T3

```

AATNGTMMQY FEWYVPNDGQ QWNRLRTDAP YLSSVGITAV WTPPAYKGTG
QADVGYGPYD LYDLGEFNQK GTVRTKYGTK GELKSAVNLT HSNGIQVYGD
VVMNHKAGAD YTENVTAVEV NPSNRNQETS GEYNIQAWTG FNFPGRGTTY
SNFKWQWFHF DGTDWDQSRS LSRIFKFRGT GKAWDWEVSS ENGNVDYLMY
ADIDYDHPDV VNEMKKWGVW YANEVGLDGY RLDVAVKHIF SFLKDWVDNA
RAATGKEMFT VGEYWQNDLG ALNNYLAKVN YNQLSFDAPL HYNFYAASGT
GGYYDMRNIL NNTLVASNPT KAVTLVENHD TQPGQSLEST VQPWFKPLAY
AFILTRSGGY PSVFYGDMYG TKGTTTREIP ALKSKIEPLL KARKDYAYGT
QRDYIDNPDV IGWTREGDST KAKSGLATVI TDGPGGSKRM YVGTSNAGEI
WYDLTGNRTD KITIGSDGYA TFPVNGGSVS VWVQQ
    
```

5 **[0081]** En SEQ ID N.º 1, se subrayan R178 y G179. Se ha descrito también una variante de la α -amilasa de *Cytophaga* sp. que cuenta con una delección tanto de R178 como de G179 (en el presente documento, "CspAmy2-vl") (Shiau, R-J. *et al.* (2003) *Applied and Environmental Microbiology*, 69:2383-85). La secuencia de aminoácidos de la forma madura del polipéptido de α -amilasa CspAmy2-vl se muestra a continuación como SEQ ID N.º 2:

```

AATNGTMMQY FEWYVPNDGQ QWNRLRTDAP YLSSVGITAV WTPPAYKGTG
QADVGYGPYD LYDLGEFNQK GTVRTKYGTK GELKSAVNLT HSNGIQVYGD
VVMNHKAGAD YTENVTAVEV NPSNRNQETS GEYNIQAWTG FNFPGRGTTY
SNFKWQWFHF DGTDWDQSRS LSRIFKFTGK AWDWEVSS ENGNVDYLMYAD
IDYDHPDVVN EMKKWGVWYA NEVGLDGYRL DAVKHIFSF LKDWVDNARA
ATGKEMFTVG EYWQNDLGAL NNYLAKVNYN QSLFDAPLHY NFYAASTGGG
YYDMRNILNN TLVASNPTKA VTLVENHDTQ PGQSLESTVQ PWFKPLAYAF
ILTRSGGYPS VFYGDMYGTK GTTTREIPAL KSKIEPLLKA RKDYAYGTQR
DYIDNPDVIG WTREGDSTKA KSGLATVITD GPGGSKRMYV GTSNAGEIYW
DLTGNRTDKI TIGSDGYATF PVNGGSVSVW VQQ
    
```

10

15 **[0082]** Empleando SEQ ID N.º 2 como punto de partida, inicialmente se realizó y se analizó una serie de variantes combinatorias de CspAmy2 conforme a lo descrito en la sección de Ejemplos. Las variantes con mejores rendimientos incluían por lo general una mutación estabilizadora en una posición de aminoácido correspondiente a E187 o bien a S241, pero no en ambas posiciones, y al menos una mutación adicional que mejora el rendimiento en la posición de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en N126, Y150, F153, L171, T180, y 1203 (empleando SEQ ID N.º 1 para la numeración).

20 **[0083]** Se sabe que muchas α -amilasas bacterianas (y otras) comparten el mismo pliegue, a menudo comparten identidad de secuencia de aminoácidos significativa, y a veces se benefician de las mismas mutaciones. En el presente caso, se identificaron posiciones de aminoácido correspondientes mediante el alineamiento de secuencias de aminoácidos de *Paenibacillus curdianolyticus* (esto es, PcuAmy1; SEQ ID N.º 3) y una versión de C-terminal truncado de la α -amilasa TS-23 de *Bacillus* sp. (esto es, «BASE»; SEQ ID N.º 5; véase, p. ej. US20120045817 y WO2010/115028).

[0084] La secuencia de aminoácidos de la forma madura del polipéptido de α -amilasa PcuAmy1 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 3:

ES 2 676 895 T3

ADNGTIMQYF EWYLPNDGAH WNRLNND~~QA~~N LKNVGITAVW IPPAYKGGSS
 ADVGYGVYDT YDLGEFNQKG TVRTKYGTKS ELISAVNNLH AKGIAVYGDV
 VLNHRMNADA TELVDAVEVD PNNRNVETTS TYQIQAWTQY DFPGRGNTYS
 SFKWRWYHFD GVDWDQSRGL NRIYKLRGDG KDWDWEVDSE YGNYDYLMGA
 DLDFNHPDVV NETKTWGKWF VNTVNLDGVR LDAVKHIKFD FMRDWNVNR
 STTGKNLFAV GEYWHYDVNK LNSYITKTNG TMSLFDVPLH FRFYDASNGG
 GGYDMRNLN NTLMSSNPMK AVTFVENHDT QPTQALQSTV QSWFKPLAYA
 TILTREQGYPCV CVFYGDYYGT SDGKISSYKP IMDKLLNARK VYAYGTQRDY
 FDHPDIVGWT REGDAAHAGS GLATLITDGP GGSKWMYVGT SKAGQVWTDK
 TGNRSGTVTI DANGWGNFWV NGGSVSVWAK

5 **[0085]** En SEQ ID N.º 3, R177 y R178 aparecen subrayados. A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de una forma variante de la α -amilasa PcuAmy1 que presenta una delección tanto de R177 como de R178 (en el presente documento, «PcuAmy1-vl») como SEQ ID N.º 4:

ADNGTIMQYF EWYLPNDGAH WNRLNND~~QA~~N LKNVGITAVW IPPAYKGGSS
 ADVGYGVYDT YDLGEFNQKG TVRTKYGTKS ELISAVNNLH AKGIAVYGDV
 VLNHRMNADA TELVDAVEVD PNNRNVETTS TYQIQAWTQY DFPGRGNTYS
 SFKWRWYHFD GVDWDQSRGL NRIYKLDGKD WDWEVDSEYG NYDYLMGADL
 DFNHPDVVNE TKTWGKWFVN TVNLDGVRLD AVKHIKDFDM RDWVNNVNRST
 TGKNLFAVGE YWHYDVNKLN SYITKTNGTM SLFDVPLHFR FYDASNGGGG
 YDMRNLNNT LMSSNPMKAV TFVENHDTQP TQALQSTVQS WFKPLAYATI
 LTREQGYPCV FYGDYYGTSD GKISSYKPIM DKLLNARKVY AYGTQRDYFD
 HPDIVGWTRE GDAAHAGSGL ATLITDGP GG SKWMYVGT SK AGQVWTDK TG
 NRS~~GT~~VTIDA NGWGNFWVNG GSVSVWAK

10 **[0086]** La secuencia de aminoácidos de una versión de C-terminal truncado de la α -amilasa TS-23 de *Bacillus* sp. (en el presente documento, «BASE»; véase, por ejemplo, US20120045817 y WO2010/115028 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 5:

NTAPINETMM QYFEWDLPND GTLWTKVKNE AANLSSLGIT ALWLPPAYKG
 TSQSDVGYGV YDLYDLGEFN QKGTIRTKYG TKTQYIQAIQ AAKAAGMQVY
 ADVVFNHKAG ADGTEFVDAV EVDPSNRNQE TSGTYQIQAW TKFDFPGRGN
 TYSSFKWRWY HFDGTDWDES RKLNRYKFR STGKAWDWEV DTENGNFYDYL
 MFADLDMDHP EVVTELKNWG TWYVNTTNID GFRLDAVKHI KYSFFPDWLT
 YVRNQTGKNL FAVGEFWSYD VNKLHNYITK TNGSMSLFDA PLHNNFYTAS
 KSSGYFDMRY LLNNTLMKDQ PSLAVTLVDN HDTQPGQSLQ SWVEPWFKPL
 AYAFILTRQE GYPCVfygdy YGIPKYNIPG LKSKIDPLLI ARRDYAYGTQ
 RDYIDHQDII GWTREGIDTK PNSGLAALIT DGPGGSKWMY VGKKHAGKVF
 YDLTGNRSDT VTINADGWGE FKVNGGSVSI WAK

[0087] En SEQ ID N.º 5, se subrayan R180 y S181. A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de una forma variante de la α -amilasa BASE que presenta una delección tanto de R180 como de S181 (en el presente documento, «ACE») como SEQ ID N.º 6:

```

NTAPINETMM QYFEWDLPNL GTLWTKVKNE AANLSSLGIT ALWLPPAYKG
TSQSDVGYGV YDLYDLGEFN QKGTIRTKYG TKTQYIQAIQ AAKAAGMQVY
ADVVFNHKAG ADGTEFVDAV EVDPSNRNQE TSGTYQIQAW TKFDFPGRGN
TYSSFKWRWY HFDGTDWDES RKLNRITYKFT GKAWDWEVDT ENGNYDYLMF
ADLDMDHPEV VTELKNWGTW YVNTTNIDGF RLDVAVKHIKY SFFPDWLTYV
RNQTGKNLFA VGEFWSYDVN KLNHYITKTN GSMSLFDAPL HNNFYTASKS
SGYFDMRYLL NNTLMKDQPS LAVTLVDNHD TQPGQSLQSW VEPWFKPLAY
AFILTRQEGY PCVFGDYDG IPKYNIPGLK SKIDPLLIAR RDYAYGTQRD
YIDHQDIIGW TREGIDTKPN SGLAALITDG PGGSKWMYVG KKHAGKVFYD
LTGNRSDTV T INADGWGEFK VNGGSVSIWV AK

```

5

[0088] En la Figura 1 se muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos de CspAmy2 (SEQ ID N.º 1), PcuAmy1 (SEQ ID N.º 3) y BASE (SEQ ID N.º 5), empleando Clustal W con parámetros por defecto. Las posiciones N126, Y150, F153, L171, R178, G179, T180, E187, I203 y S241 en CspAmy2 correspondan a las posiciones N125, Y149, F152, L170, R177, G178, D179, E186, L202 y D240 en PcuAmy1, respectivamente, y a las posiciones N128, Y152, F155, L173, R180, S181, T182, E189, L205 y S243, respectivamente, en BASE. La numeración de otras posiciones a lo largo de las moléculas se puede determinar empleando el alineamiento y la información expuestas en el presente documento.

[0089] A partir de los datos experimentales obtenidos utilizando las tres α -amilasas originales mencionadas anteriormente, las formas de realización de las presentes variantes de α -amilasas incluyen variantes que presentan una mutación en una posición de aminoácido correspondiente a E187 junto con al menos una mutación en una posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre N126, Y150, F153, L171, T180 y I203 (empleando SEQ ID N.º 1 para la numeración), donde las mutaciones proporcionan al menos un beneficio de rendimiento a la variante resultante. Asimismo, se describen variantes de α -amilasas que presentan una mutación en una posición de aminoácido correspondiente a S241 junto con al menos una mutación en una posición de aminoácido correspondiente a una posición seleccionada de entre N126, Y150, F153, L171, T180 y I203 (utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración).

[0090] Con respecto a SEQ ID N.º 1 para la numeración, entre los ejemplos de mutaciones en la posición de aminoácido E187 se incluyen E187V y E187P. Entre los ejemplos de mutaciones en la posición de aminoácido S241, se incluyen S241Q y S241A. En algunas formas de realización, las mutaciones se realizan únicamente en una de estas posiciones. Entre los ejemplos de mutaciones en la posición de aminoácido N126, se incluye N126Y. Entre los ejemplos de mutaciones en la posición de aminoácido Y150, se incluyen Y150F, Y150H e Y150W. Entre los ejemplos de mutaciones en la posición de aminoácido F153, se incluyen F153H, F153W y F153Y. Entre los ejemplos de mutaciones en la posición de aminoácido L171 se incluyen L171F, L171G, L171I, L171M, L171R, L171V, L171W, L171Y, L171H, L171K, L171N, L171Q y L171S. Entre los ejemplos de mutaciones en la posición de aminoácido T180 se incluyen T180D y T180H. Entre los ejemplos de mutaciones en la posición de aminoácido I203, se incluyen I203C, I203V, I203F, I203L, I203M e I203Y.

[0091] En algunas formas de realización, las variantes de α -amilasas incluyen además una mutación en los residuos de aminoácido correspondientes a F132, Q167, A277 y/o T400, empleando SEQ ID N.º 1 para la numeración. Entre los ejemplos de mutaciones en la posición de aminoácido F132 se incluyen E132A, E132C, E132D, E132F, E132G, E132H, E132I, E132K, E132L, E132M, E132N, E132P, E132Q, E132R, E132V y E132W. Entre los ejemplos de mutaciones en la posición de aminoácido Q167 se incluyen Q167A, Q167D y Q167E, Q167G, Q167H, Q167K, Q167M, Q167N, Q167P, Q167S, Q167T y Q167V. Entre los ejemplos de mutaciones en la posición de aminoácido A277 se incluyen A277C, A277D, A277E, A277F, A277G, A277I, A277K, A277L, A277M, A277N, A277Q, A277R, A277S, A277T, A277V, A277W y A277Y. Entre los ejemplos de mutaciones en la posición de aminoácido T400 se incluyen T400A, T400C, T400D, T400F, T400G, T400I, T400K, T400L, T400M, T400N, T400Q, T400R, T400W y T400Y.

[0092] En algunas formas de realización, las variantes de α -amilasas incluyen además una mutación en un residuo de aminoácido correspondiente a G476, empleando SEQ ID N.º 1 para la numeración. Entre los ejemplos

de mutaciones en la posición de aminoácido G476, se incluyen G476A, G476C, G476H, G476K, G476N, G476P, G476Q, G476R, G476S, G476T, G476V y G476Y.

[0093] En algunas formas de realización, las variantes de α -amilasas son las que incluyen además mutaciones en ambos residuos de aminoácido correspondientes a G476 y G477, empleando SEQ ID N.º 1 para la numeración. Sorprendentemente, las pruebas experimentales sugieren que cualquier combinación de residuos en estas posiciones, distinta de dos glicinas adyacentes presentes en muchas α -amilasas de origen natural, incrementa la mejora de la actividad de hidrólisis del almidón, especialmente en aplicaciones de limpieza.

[0094] En algunas formas de realización, las variantes de α -amilasa incluyen además mutaciones en los residuos de aminoácidos correspondientes a R458, T459 y/o D460. Ejemplos de mutaciones son R458N, T459S y D460T, respectivamente.

[0095] En algunas formas de realización, las variantes de α -amilasa incluyen además una deleción en el motivo $X_1G/S_1X_2G_2$ adyacente al lazo de unión al calcio correspondiente a R178, G179, T180 y G181, empleando SEQ ID N.º 1 para la numeración. En algunas formas de realización, las variantes de α -amilasa incluyen deleciones adyacentes por pares de residuos de aminoácidos correspondientes a R178 y G179, o T180 y G181. Una deleción en los residuos de aminoácidos correspondientes a R178 y G179 puede denominarse « Δ RG», mientras que una deleción en los residuos de aminoácidos correspondientes a T180 y G181 puede denominarse « Δ TG». Evidentemente, esta nomenclatura cambiará dependiendo de los residuos de aminoácidos presentes inicialmente en la molécula original.

[0096] En algunas formas de realización, las variantes de α -amilasa incluyen mutaciones en las posiciones correspondientes a E132 y/o a T180 (empleando SEQ ID N.º 1 para la numeración), junto con una deleción de RG o una deleción de TG (o una deleción equivalente basada en la secuencia de las α -amilasas originales), de forma que puede suceder una interacción estabilizadora entre el residuo no G restante en el motivo $X_1G/S_1X_2G_2$ y en el residuo en la posición 132. En algunas formas de realización, el residuo en la posición 132 tiene carga negativa (esto es, D o E) y el residuo no G restante tiene carga positiva (esto es, H, R o K). En algunas formas de realización, el residuo en la posición 132 tiene carga positiva (esto es, H, R o K) y el residuo no G restante tiene carga negativa (esto es, D o E).

[0097] A continuación se muestran ejemplos de combinaciones de mutaciones descritas en el presente documento (empleando SEQ ID N.º 1 para la numeración):

E187P + I203Y + G476K (esto es, CspAmy2-v5);
 E187P + I203Y + G476K + R458N + T459S + D460T (esto es, CspAmy2-v6);
 T180D + E187P + I203Y + G476K (esto es, CspAmy2 v171);
 N126Y + T180D + E187P + I203Y + G476K (esto es, CspAmy2 v172);
 N126Y + T180D + E187P + I203Y + Y303D + G476T + G477E (esto es, CspAmy2 v179);
 N126Y + T180D + E187P + I203Y + Y303D + N475E + G477Q (esto es, CspAmy2 v180);
 N126Y + T180D + E187P + I203Y + Y303R + N475E + G476T + G477R (esto es, CspAmy2 v181);
 T038N + N88H + N126Y + T129I + N134M + F153W + L171R + T180D + E187P + I203Y + G476K + G477E (esto es, CspAmy2 v186);
 N126Y + E132H + T180D + E187P + I203Y + Y303D + G476T + G477E (esto es, CspAmy2 v191);
 N126Y + E187P + I203Y (esto es, CspAmy2-vC16A);
 N126Y + I203Y + S241Q (esto es, CspAmy2-vC16B);
 N126Y + T180H + E187P + I203Y (esto es, CspAmy2-vC16C);
 N126Y + T180H + I203Y + S241Q (esto es, CspAmy2-vC16D);
 N126Y + F153W + T180H + E187P + I203Y (esto es, CspAmy2-vC16E);
 N126Y + F153W + T180H + I203Y + S241Q (esto es, CspAmy2-vC16F);
 N126Y + Y150H + F153W + L171N + E187P + I203Y (esto es, CspAmy2-vC16G);
 N126Y + Y150H + F153W + L171N + I203Y + S241Q (esto es, CspAmy2-vC16H);
 N126Y + Y150H + F153W + L171N + T180H + E187P + I203Y (esto es, CspAmy2-vC16I);
 N126Y + Y150H + F153W + L171N + T180H + I203Y + S241Q (esto es, CspAmy2-vC16J);
 N126Y + F153W + T180D + I203Y + S241Q (esto es, CspAmy2-vC18P);
 N126Y + E132H + F153W + T180D + I203Y + S241Q + A277F (esto es, CspAmy2-C25F);
 N126Y + E132H, + F153W + Q167E + T180D + I203Y + S241Q + A277F (esto es, CspAmy2-C25B); y
 N126Y + E132H + F153W + Q167E + T180D + I203Y + S241Q + A277F + T400K (esto es, CspAmy2-C25A).

[0098] Todas las combinaciones de mutaciones anteriores se contemplan para su uso junto con las deleciones mencionadas anteriormente en las posiciones correspondientes a R178, G179, T180, y/o G181. Dichas deleciones pueden ocurrir de forma natural, como en el caso de la α -amilasa de *Bacillus licheniformis*.

[0099] Además de las mutaciones mencionadas anteriormente, las variantes de PcuAmy1 pueden incluir además mutaciones en la posición T333, A335 y Q337E (empleando SEQ ID N.º 3 para la numeración). Estas posiciones están en un bucle expuesto en la superficie y las mutaciones en estas posiciones, especialmente en T333, aportan resistencia a la proteasa a PcuAmy1, pero no afectan al rendimiento de otro modo. Estas mutaciones también parecen ser totalmente compatibles con otras mutaciones. Otra mutación en las variantes de PcuAmy1

es N205, cuya mutación cambia el residuo natural N a D. D es el residuo que normalmente ocupa esta posición en las α -amilasas.

[0100] Por consiguiente, las α -amilasas descritas en el presente documento incluyen la totalidad de los ejemplos de combinaciones de mutaciones que se han mostrado anteriormente en el contexto de CspAmy2, así como los siguientes ejemplos de combinaciones (empleando la numeración de SEQ ID N.º 3) que se muestran a continuación:

N125Y + E186P + T333G + A335S + Q337E + G472K (esto es, PcuAmy1-v1A);
 N125Y + F152W + E186P + T333G + A335S + Q337E + G472K (esto es, PcuAmy1-v6);
 N125Y + F152W, + E186P + T333G + A335S + Q337E + G472R + G473R (esto es, PcuAmy1-v8); y
 N125Y + F152W + E186P + N205D + T333G + A335S + Q337E + G472K (esto es, PcuAmy1-v16).

[0101] Todas las combinaciones de mutaciones anteriores se contemplan para su uso junto con deleciones en las posiciones correspondientes a R177, G178, D179 y/o G180, y dichas deleciones pueden ocurrir de forma natural, como en el caso de la α -amilasa de *Bacillus licheniformis*.

[0102] Las variantes también pueden describirse en términos de numeración BASE (esto es, SEQ ID N.º 5), por ejemplo,

N128Y + E189P + G475R (esto es, BASE-V28);
 F155W + E189P + G475R (esto es, BASE-V29);
 T134E + T182H + E189P + G475R (esto es, BASE-V30);
 N128Y + T134E + T182H + E189P + G475R (esto es, BASE-V31);
 N128Y + F155W + E189P + G475R (esto es, BASE-V32);
 T134E + F155W + T182H + E189P + G475R (esto es, BASE-V33);
 N128Y + T134E + F155W + T182H + E189P + G475R (esto es, BASE-V34);
 N128Y + T134H + F155W + T182D + E189P + G475R (esto es, BASE-V35); y
 N128Y + T134E + F155W + T182G + E189P + G457R (esto es, BASE-V36).

Todas las combinaciones de mutaciones anteriores se contemplan para su uso junto con deleciones en las posiciones correspondientes a R180, S181, T182 y/o G183, y dichas deleciones pueden ocurrir de forma natural, como en el caso de la α -amilasa de *Bacillus licheniformis*.

[0103] Las posiciones de aminoácidos correspondientes en otras α -amilasas se identifican mediante alineamiento de secuencias de aminoácidos empleando CspAmy2 (SEQ ID N.º 1), PcuAmy1 (SEQ ID N.º 3) o BASE (SEQ ID N.º 5), utilizando Clustal W con parámetros por defecto. Entre las α -amilasas en las que es posible que las mutaciones expuestas anteriormente produzcan un beneficio de rendimiento se incluyen aquellas que presentan un pliegue similar y/o que presentan un 60 % o más de identidad de secuencia de aminoácidos con cualquiera de las amilasas conocidas de *Bacillus* (p. ej., de *B. licheniformis* (esto es, BLA y LAT), *B. stearothermophilus* (esto es, BSG), y *B. amyloliquifaciens* (esto es, P00692, BACAM y BAA)), amilasas de la familia 13 de la base de datos de enzimas activas en carbohidratos (CAZy), o cualquier amilasa a la que se haya hecho referencia hasta el momento con el término descriptivo «de tipo Termamyl». Entre los ejemplos de α -amilasas se incluyen sin carácter limitativo SG-1 de *Bacillus* sp., 707 de *Bacillus* sp., DSM12368 de *Bacillus* sp. (esto es, A7-7), DSM 12649 de *Bacillus* sp. (esto es, AA560), SP722 de *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium* (DSM90 14), y KSM AP1378.

[0104] El lector podrá apreciar que donde una α -amilasa presenta una mutación de forma natural listada anteriormente (es decir, donde la α -amilasa natural ya comprende un residuo identificado como una mutación), esta mutación concreta no se aplica por tanto a esa α -amilasa. No obstante, otras mutaciones descritas pueden funcionar en combinación con el residuo producido de forma natural en esa posición.

[0105] En algunas formas de realización, las presentes variantes de α -amilasa cuentan con las combinaciones de mutaciones indicadas según se expone en las reivindicaciones, y con un grado definido de homología/identidad de secuencias de aminoácidos con SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 3, o SEQ ID N.º 5, en concreto al menos un 70 %,

opcionalmente al menos un 75 %, al menos un 76 %, al menos un 77 %, al menos un 78 %, al menos un 79 %, al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o incluso al menos un 99 % de homología/identidad de secuencia de aminoácidos.

[0106] En el presente documento, se describen también variantes de α -amilasa que presentan las combinaciones de mutaciones indicadas y que derivan de una amilasa original que presenta un grado definido de homología/identidad de secuencias de aminoácidos con SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 3, o SEQ ID N.º 5, por ejemplo, de al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 76 %, al menos un 77 %, al menos un 78 %, al menos un 79 %, al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un

94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o incluso al menos un 99 % de homología/identidad de secuencia de aminoácidos.

[0107] En algunas formas de realización, además de las mutaciones descritas anteriormente, las presentes α -amilasas incluyen además una o más mutaciones que proporcionan un beneficio de rendimiento adicional. Entre las mutaciones adicionales que, de forma experimental, se ha determinado que proporcionan al menos una ventaja de rendimiento al combinarse con las variantes combinatorias mencionadas anteriormente se incluyen mutaciones en las posiciones correspondientes a 6, 7, 8, 11, 14, 15, 20, 21, 23, 26, 27, 28, 37, 38, 39, 40, 42, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 58, 61, 62, 68, 70, 71, 72, 73, 79, 80, 81, 82, 84, 85, 87, 88, 89, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 101, 108, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 120, 122, 123, 124, 126, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 138, 140, 142, 143, 144, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 165, 167, 168, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 180, 181, 182, 187, 190, 191, 193, 199, 200, 201, 203, 206, 208, 210, 211, 212, 214, 215, 216, 219, 221, 223, 225, 226, 227, 235, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 252, 253, 254, 256, 257, 258, 260, 261, 262, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 273, 276, 277, 279, 280, 282, 284, 285, 286, 288, 296, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 307, 308, 310, 311, 312, 313, 316, 317, 318, 320, 321, 325, 327, 335, 338, 342, 348, 349, 352, 356, 357, 360, 362, 363, 368, 369, 377, 381, 382, 383, 384, 385, 388, 390, 392, 394, 395, 396, 397, 398, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 407, 408, 410, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 426, 428, 429, 430, 431, 434, 435, 436, 439, 441, 442, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 454, 455, 457, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 469, 470, 471, 473, 474, 475, 476, 477, 479, 480, 481, 482, 483, y 484, utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración. Las mutaciones específicas son T6A, T6D, T6E, T6G, T6K, T6M, T6N, T6Q, T6S, M7A, M7V, M8C, M8F, M8I, M8L, M8Y, F11V, Y14A, Y14I, Y14Q, Y14T, Y14V, V15C, V15D, V15I, V15N, V15T, Q20A, Q20C, Q20D, Q20H, Q20K, Q20M, Q20N, Q20R, Q20S, Q20Y, Q21F, Q21W, N23A, N23C, N23D, N23E, N23H, N23K, N23Q, N23R, N23S, N23T, N23V, R26C, R26E, R26G, R26K, R26M, R26S, R26T, T27A, T27C, T27D, T27E, T27F, T27H, T27I, T27K, T27L, T27M, T27N, T27Q, T27R, T27S, T27V, T27Y, D28A, D28C, D28T, I37F, I37V, T38D, T38N, A39L, V40A, V40C, V40D, V40G, V40H, V40I, V40K, V40M, V40P, V40Q, V40R, V40S, V40T, V40W, V40Y, T42A, T42C, T42I, T42M, T42V, A45C, A45G, Y46F, G48A, T49I, S50A, S50C, S50E, S50G, S50K, S50M, S50N, S50Q, S50R, S50T, S50Y, Q51C, Q51D, Q51E, Q51S, Q51V, A52C, A52D, A52E, A52F, A52G, A52H, A52K, A52L, A52M, A52R, A52S, A52T, A52V, A52Y, D53E, V54N, V54T, P58A, P58C, P58H, P58I, P58S, P58T, P58V, L61M, L61V, Y62A, Y62C, Y62D, Y62F, Y62G, Y62H, Y62I, Y62K, Y62L, Y62M, Y62N, Y62P, Y62Q, Y62R, Y62S, Y62V, N68C, N68D, N68E, N68F, N68H, N68L, N68P, N68Q, N68R, N68S, N68V, N68W, N68Y, K70R, G71A, G71C, G71D, G71E, G71K, G71R, G71S, T72G, T72S, V73S, T79F, T79I, T79L, T79M, T79N, T79S, T79Y, K80A, K80C, K80D, K80F, K80H, K80I, K80M, K80N, K80Q, K80R, K80S, K80T, K80V, K80Y, G81A, G81D, G81E, G81F, G81H, G81I, G81K, G81N, G81P, G81R, G81S, G81T, E82A, E82D, E82M, E82Q, K84A, K84C, K84E, K84I, K84Q, K84R, K84S, K84T, K84Y, S85A, S85C, S85D, S85E, S85G, S85H, S85I, S85L, S85M, S85N, S85Q, S85R, S85T, S85V, S85Y, V87I, V87T, N88C, N88D, N88E, N88G, N88H, N88I, N88K, N88L, N88M, N88Q, N88R, N88S, N88T, N88V, N88W, N88Y, T89A, T89D, T89E, T89F, T89H, T89I, T89K, T89L, T89M, T89N, T89Q, T89R, T89S, T89Y, S92A, S92C, S92D, S92E, S92F, S92G, S92H, S92L, S92M, S92N, S92Q, S92R, S92T, S92W, S92Y, N93A, N93C, N93E, N93F, N93H, N93I, N93K, N93L, N93Q, N93S, N93T, N93Y, G94A, G94C, G94N, I95M, I95Q, Q96A, Q96E, Q96H, Q96I, Q96K, Q96L, Q96M, Q96N, Q96R, Q96V, Q96Y, V97I, V97T, Y98F, Y98I, Y98L, Y98V, V101C, V101T, G108A, G108S, Y111D, Y111E, Y111L, Y111N, Y111S, Y111T, Y111V, T112A, T112F, T112H, T112I, T112K, T112L, T112M, T112N, T112P, T112R, T112V, T112W, E113D, E113N, E113Q, E113T, N114A, N114C, N114D, N114E, N114F, N114G, N114H, N114I, N114L, N114P, N114Q, N114R, N114S, N114T, N114V, N114W, N114Y, V115A, V115I, T116A, T116C, T116D, T116G, T116H, T116I, T116K, T116N, T116P, T116Q, T116R, T116S, A117C, A117I, A117S, A117V, V118A, V118C, V118E, V118F, V118H, V118I, V118L, V118M, V118N, V118Q, V118R, V118S, V118W, V118Y, V120A, V120C, V120I, V120M, V120T, P122A, P122D, P122E, P122G, P122H, P122N, P122R, P122S, P122T, P122W, S123A, S123C, S123G, S123K, S123L, N124A, N124D, N124F, N124G, N124L, N124R, N124S, N124V, Y126A, Y126C, Y126D, Y126E, Y126G, Y126H, Y126I, Y126K, Y126L, Y126M, Y126N, Y126Q, Y126R, Y126S, Y126T, Y126V, Y126W, Q127A, Q127C, Q127D, Q127E, Q127F, Q127H, Q127I, Q127K, Q127L, Q127M, Q127N, Q127R, Q127S, Q127T, Q127V, Q127W, Q127Y, T129A, T129C, T129D, T129E, T129F, T129G, T129I, T129K, T129L, T129M, T129N, T129Q, T129R, T129S, T129V, T129W, T129Y, S130A, S130G, S130I, S130K, S130L, S130M, S130N, S130P, S130R, S130T, S130V, S130W, G131A, G131C, G131D, G131F, G131H, G131I, G131K, G131L, G131M, G131P, G131Q, G131V, G131W, G131Y, E132A, E132C, E132D, E132F, E132G, E132H, E132I, E132K, E132L, E132M, E132N, E132P, E132Q, E132R, E132V, E132W, Y133A, Y133D, Y133E, Y133G, Y133K, Y133L, Y133M, Y133R, Y133S, Y133T, Y133W, N134A, N134D, N134F, N134G, N134H, N134I, N134K, N134L, N134M, N134R, N134S, N134V, N134W, N134Y, Q136A, Q136C, Q136D, Q136E, Q136F, Q136H, Q136K, Q136L, Q136M, Q136N, Q136R, Q136S, Q136T, Q136V, Q136W, Q136Y, A137S, A137T, A137V, W138F, W138Y, G140A, G140M, N142F, N142K, N142L, N142M, N142P, N142V, N142W, N142Y, F143H, F143Y, P144C, P144D, P144E, P144G, P144H, P144I, P144K, P144L, P144M, P144N, P144Q, P144S, P144T, P144Y, G147A, G147C, G147H, G147K, G147L, G147M, G147N, G147Q, G147R, T148A, T148D, T148E, T148F, T148I, T148K, T148L, T148R, T148S, T148V, T148W, T149A, T149C, T149D, T149E, T149F, T149H, T149K, T149L, T149M, T149N, T149Q, T149V, T149W, T149Y, Y150H, S151A, S151E, S151F, S151H, S151I, S151K, S151L, S151M, S151Q, S151R, S151V, N152A, N152C, N152D, N152E, N152G, N152H, N152K, N152M, N152P, N152Q, N152R, N152S, N152T, W153F, W153H, W153Q, W153R, W153T, W153Y, K154A, K154C, K154D, K154E, K154G, K154I, K154L,

T400M, T400N, T400Q, T400R, T400W, T400Y, Q401A, Q401C, Q401F, Q401H, Q401I, Q401L, Q401M, Q401N, R402C, R402D, R402F, R402K, R402L, R402M, R402N, R402Q, R402S, R402W, D403E, D403N, D403S, Y404E, Y404G, Y404K, Y404M, Y404N, Y404R, Y404W, I405C, I405F, I405L, I405M, I405V, N407A, N407C, N407D, N407E, N407G, N407K, N407M, N407Q, N407R, P408A, P408C, P408D, P408I, P408K, P408L, P408M, P408N, P408Q, P408V, P408W, V410A, V410C, V410D, V410E, V410F, V410H, V410I, V410L, V410M, V410N, V410Q, V410S, V410T, T414A, T414I, T414S, T414V, R415M, E416C, E416D, E416F, E416H, E416I, E416K, E416L, E416M, E416N, E416Q, E416R, E416T, E416V, E416W, E416Y, D418A, D418E, D418G, D418H, D418I, D418K, D418L, D418M, D418N, D418Q, D418S, D418T, D418V, D418W, S419A, S419C, S419E, S419G, S419L, S419M, S419N, S419R, S419V, S419W, S419Y, T420A, T420C, T420D, T420E, T420G, T420H, T420I, T420K, T420M, T420P, T420S, T420V, T420W, T420Y, K421A, K421D, K421E, K421H, K421I, K421L, K421M, K421N, K421P, K421Q, K421R, K421T, K421V, K421W, K421Y, A422C, A422D, A422E, A422F, A422G, A422I, A422L, A422N, A422P, A422Q, A422R, A422S, A422Y, K423A, K423D, K423E, K423F, K423H, K423I, K423L, K423M, K423N, K423Q, K423R, K423S, K423T, K423V, K423W, K423Y, S424A, S424C, S424G, S424K, S424N, S424Q, S424R, S424T, L426S, L426T, L426V, L426W, T428G, T428V, V429A, V429C, V429I, V429L, I430C, I430G, I430L, I430M, I430Q, I430V, T431A, T431C, T431S, P434A, P434C, P434D, P434E, P434F, P434H, P434I, P434K, P434L, P434M, P434N, P434Q, P434R, P434S, P434V, P434Y, G435A, G435C, G435D, G435E, G435F, G435H, G435I, G435K, G435M, G435N, G435P, G435Q, G435R, G435S, G435T, G435W, G436F, G436I, G436M, G436N, G436Q, G436S, G436V, R439A, R439D, R439G, R439H, R439K, R439M, R439N, R439P, R439Q, R439S, R439V, R439W, R439Y, Y441A, Y441C, Y441D, Y441F, Y441G, Y441H, Y441K, Y441L, Y441M, Y441N, Y441P, Y441R, Y441S, Y441T, Y441W, V442A, V442C, V442I, V442T, T444C, T444D, T444E, T444F, T444G, T444H, T444I, T444K, T444L, T444M, T444N, T444P, T444R, T444S, T444W, S445A, S445C, S445E, S445G, S445H, S445I, S445K, S445L, S445M, S445N, S445T, S445V, N446A, N446C, N446D, N446E, N446F, N446G, N446H, N446I, N446J, N446K, N446L, N446M, N446N, N446O, N446P, N446Q, N446R, N446S, N446T, N446U, N446V, N446W, N446X, N446Y, A447A, A447B, A447C, A447D, A447E, A447F, A447G, A447H, A447I, A447J, A447K, A447L, A447M, A447N, A447O, A447P, A447Q, A447R, A447S, A447T, A447U, A447V, A447W, A447X, A447Y, G448A, G448B, G448C, G448D, G448E, G448F, G448G, G448H, G448I, G448J, G448K, G448L, G448M, G448N, G448O, G448P, G448Q, G448R, G448S, G448T, G448U, G448V, G448W, G448X, G448Y, E449A, E449B, E449C, E449D, E449E, E449F, E449G, E449H, E449I, E449J, E449K, E449L, E449M, E449N, E449O, E449P, E449Q, E449R, E449S, E449T, E449U, E449V, E449W, E449X, E449Y, I450A, I450B, I450C, I450D, I450E, I450F, I450G, I450H, I450I, I450J, I450K, I450L, I450M, I450N, I450O, I450P, I450Q, I450R, I450S, I450T, I450U, I450V, I450W, I450X, I450Y, W451A, W451B, W451C, W451D, W451E, W451F, W451G, W451H, W451I, W451J, W451K, W451L, W451M, W451N, W451O, W451P, W451Q, W451R, W451S, W451T, W451U, W451V, W451W, W451X, W451Y, L454A, L454B, L454C, L454D, L454E, L454F, L454G, L454H, L454I, L454J, L454K, L454L, L454M, L454N, L454O, L454P, L454Q, L454R, L454S, L454T, L454U, L454V, L454W, L454X, L454Y, T455A, T455B, T455C, T455D, T455E, T455F, T455G, T455H, T455I, T455J, T455K, T455L, T455M, T455N, T455O, T455P, T455Q, T455R, T455S, T455T, T455U, T455V, T455W, T455X, T455Y, N457A, N457B, N457C, N457D, N457E, N457F, N457G, N457H, N457I, N457J, N457K, N457L, N457M, N457N, N457O, N457P, N457Q, N457R, N457S, N457T, N457U, N457V, N457W, N457X, N457Y, D460A, D460B, D460C, D460D, D460E, D460F, D460G, D460H, D460I, D460J, D460K, D460L, D460M, D460N, D460O, D460P, D460Q, D460R, D460S, D460T, D460U, D460V, D460W, D460X, D460Y, K461A, K461B, K461C, K461D, K461E, K461F, K461G, K461H, K461I, K461J, K461K, K461L, K461M, K461N, K461O, K461P, K461Q, K461R, K461S, K461T, K461U, K461V, K461W, K461X, K461Y, I462A, I462B, I462C, I462D, I462E, I462F, I462G, I462H, I462I, I462J, I462K, I462L, I462M, I462N, I462O, I462P, I462Q, I462R, I462S, I462T, I462U, I462V, I462W, I462X, I462Y, T463A, T463B, T463C, T463D, T463E, T463F, T463G, T463H, T463I, T463J, T463K, T463L, T463M, T463N, T463O, T463P, T463Q, T463R, T463S, T463T, T463U, T463V, T463W, T463X, T463Y, T463Z, T463AA, T463AB, T463AC, T463AD, T463AE, T463AF, T463AG, T463AH, T463AI, T463AJ, T463AK, T463AL, T463AM, T463AN, T463AO, T463AP, T463AQ, T463AR, T463AS, T463AT, T463AU, T463AV, T463AW, T463AX, T463AY, T463AZ, G465A, G465B, G465C, G465D, G465E, G465F, G465G, G465H, G465I, G465J, G465K, G465L, G465M, G465N, G465O, G465P, G465Q, G465R, G465S, G465T, G465U, G465V, G465W, G465X, G465Y, S466A, S466B, S466C, S466D, S466E, S466F, S466G, S466H, S466I, S466J, S466K, S466L, S466M, S466N, S466O, S466P, S466Q, S466R, S466S, S466T, S466U, S466V, S466W, S466X, S466Y, D467A, D467B, D467C, D467D, D467E, D467F, D467G, D467H, D467I, D467J, D467K, D467L, D467M, D467N, D467O, D467P, D467Q, D467R, D467S, D467T, D467U, D467V, D467W, D467X, D467Y, Y469A, Y469B, Y469C, Y469D, Y469E, Y469F, Y469G, Y469H, Y469I, Y469J, Y469K, Y469L, Y469M, Y469N, Y469O, Y469P, Y469Q, Y469R, Y469S, Y469T, Y469U, Y469V, Y469W, Y469X, Y469Y, A470A, A470B, A470C, A470D, A470E, A470F, A470G, A470H, A470I, A470J, A470K, A470L, A470M, A470N, A470O, A470P, A470Q, A470R, A470S, A470T, A470U, A470V, A470W, A470X, A470Y, T471A, T471B, T471C, T471D, T471E, T471F, T471G, T471H, T471I, T471J, T471K, T471L, T471M, T471N, T471O, T471P, T471Q, T471R, T471S, T471T, T471U, T471V, T471W, T471X, T471Y, T471Z, P473A, P473B, P473C, P473D, P473E, P473F, P473G, P473H, P473I, P473J, P473K, P473L, P473M, P473N, P473O, P473P, P473Q, P473R, P473S, P473T, P473U, P473V, P473W, P473X, P473Y, P473Z, V474A, V474B, V474C, V474D, V474E, V474F, V474G, V474H, V474I, V474J, V474K, V474L, V474M, V474N, V474O, V474P, V474Q, V474R, V474S, V474T, V474U, V474V, V474W, V474X, V474Y, N475A, N475B, N475C, N475D, N475E, N475F, N475G, N475H, N475I, N475J, N475K, N475L, N475M, N475N, N475O, N475P, N475Q, N475R, N475S, N475T, N475U, N475V, N475W, N475X, N475Y, G476A, G476B, G476C, G476D, G476E, G476F, G476G, G476H, G476I, G476J, G476K, G476L, G476M, G476N, G476O, G476P, G476Q, G476R, G476S, G476T, G476U, G476V, G476W, G476X, G476Y, G477A, G477B, G477C, G477D, G477E, G477F, G477G, G477H, G477I, G477J, G477K, G477L, G477M, G477N, G477O, G477P, G477Q, G477R, G477S, G477T, G477U, G477V, G477W, G477X, G477Y, V479A, V479B, V479C, V479D, V479E, V479F, V479G, V479H, V479I, V479J, V479K, V479L, V479M, V479N, V479O, V479P, V479Q, V479R, V479S, V479T, V479U, V479V, V479W, V479X, V479Y, S480A, S480B, S480C, S480D, S480E, S480F, S480G, S480H, S480I, S480J, S480K, S480L, S480M, S480N, S480O, S480P, S480Q, S480R, S480S, S480T, S480U, S480V, S480W, S480X, S480Y, V481A, V481B, V481C, V481D, V481E, V481F, V481G, V481H, V481I, V481J, V481K, V481L, V481M, V481N, V481O, V481P, V481Q, V481R, V481S, V481T, V481U, V481V, V481W, V481X, V481Y, W482A, W482B, W482C, W482D, W482E, W482F, W482G, W482H, W482I, W482J, W482K, W482L, W482M, W482N, W482O, W482P, W482Q, W482R, W482S, W482T, W482U, W482V, W482W, W482X, W482Y, V483A, V483B, V483C, V483D, V483E, V483F, V483G, V483H, V483I, V483J, V483K, V483L, V483M, V483N, V483O, V483P, V483Q, V483R, V483S, V483T, V483U, V483V, V483W, V483X, V483Y, Q484A, Q484B, Q484C, Q484D, Q484E, Q484F, Q484G, Q484H, Q484I, Q484J, Q484K, Q484L, Q484M, Q484N, Q484O, Q484P, Q484R, Q484S, Q484T, Q484U, Q484V, Q484W, Q484X, Q484Y.

[0108] Además, las presentes amilasas pueden incluir cualquier cantidad de sustituciones de aminoácidos conservadoras. Los ejemplos de sustituciones de aminoácidos conservadoras se listan en la Tabla 1.

Tabla 1. Sustituciones conservadoras de aminoácidos

[0109]

<i>Para el aminoácido</i>	<i>Código</i>	<i>Reemplazar con</i>
Alanina	A	D-Ala, Gly, beta-Ala, L-Cys, D-Cys
Arginina	R	D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Orn, D-Orn
Asparagina	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Ácido aspártico	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Cisteína	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Glutamina	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp

Ácido glutámico	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Glicina	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, b-Ala, Acp
Isoleucina	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Leucina	L	D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Lisina	K	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Orn, D-Orn
Metionina	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Fenilalanina	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4, o 5-fenilprolina, cis-3,4, o 5-fenilprolina
Prolina	P	D-Pro, ácido L-l-tiazolidin-4-carboxílico, ácido D- o L-1-oxazolidin-4-carboxílico
Serina	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Treonina	T	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Tirosina	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Valina	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

[0110] Como podrá observar el lector, algunas de las mutaciones conservadoras mencionadas anteriormente se pueden producir mediante manipulación genética, mientras que otros se producen mediante la introducción de aminoácidos sintéticos en un polipéptido por medios genéticos o de otro tipo.

5 **[0111]** La presente amilasa puede ser "precursora", "inmadura", o "de longitud completa", en cuyo caso incluye una secuencia de señal, o «madura», en cuyo caso carece de una secuencia de señal. Por lo general, las formas maduras de los polipéptidos son las más útiles. A menos que se indique lo contrario, la numeración de residuos de aminoácidos empleada en el presente documento se refiere a las formas maduras de los respectivos polipéptidos de amilasa. Los presentes polipéptidos de amilasa también pueden estar truncados para eliminar los N- o C-terminales, siempre que los polipéptidos resultantes retengan actividad amilasa.

10 **[0112]** La presente amilasa puede ser un polipéptido «quimérico» o «híbrido», en cuanto a que incluye al menos una porción de un primer polipéptido de amilasa, y al menos una porción de un segundo polipéptido de amilasa (tales amilasas quiméricas se han «redescubierto» recientemente como amilasas de dominio *swap*). Las presentes amilasas pueden incluir además secuencias de señal heterólogas, un epítipo para permitir el seguimiento o la purificación, o similares. Los ejemplos de secuencias de señal heterólogas son de amilasa de *B. licheniformis* (LAT), *B. subtilis* (AmyE o AprE), y CelA de *Streptomyces*.

2.5 Nucleótidos que codifican polipéptidos de variante de amilasa

15 **[0113]** En otro aspecto, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican una variante de amilasa. El ácido nucleico puede codificar un polipéptido de amilasa concreto, o una amilasa que presenta un grado específico de identidad de secuencias de aminoácidos con la amilasa concreta.

20 **[0114]** En un ejemplo, el ácido nucleico codifica una amilasa de acuerdo con las reivindicaciones que presenta al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 76 %, al menos un 77 %, al menos un 78 %, al menos un 79 %, al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o incluso al menos un 99 % de homología/identidad con SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 3 o SEQ ID N.º 5 (excluyendo la porción del ácido nucleico que codifica la secuencia de señal). Se podrá apreciar que, debido a la degeneración del código genético, una pluralidad de ácidos nucleicos puede codificar el mismo polipéptido.

[0115] En el presente documento se describe también un ácido nucleico que hibrida en condiciones rigurosas o muy rigurosas a un ácido nucleico que codifica (o complementario a un ácido nucleico que codifica) una amilasa que presenta al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 76 %, al menos un 77 %, al menos un 78 %, al menos un 79 %, al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o incluso al menos un 99 % de homología/identidad con SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 3 o SEQ ID N.º 5 (excluyendo la porción del ácido nucleico que codifica la secuencia de señal).

[0116] En algunas formas de realización, el ácido nucleico hibrida en condiciones rigurosas o muy rigurosas al ácido nucleico de la SEQ ID N.º 7, SEQ ID N.º 33 o SEQ ID N.º 38, o a un ácido nucleico complementario a estos ácidos nucleicos.

[0117] Los ácidos nucleicos pueden codificar una amilasa «de longitud completa» («fl» o «FL»), que incluye una secuencia de señal, únicamente la forma madura de una amilasa, que carece de la secuencia de señal, o una forma truncada de una amilasa, que carece del N o C-término de la forma madura.

[0118] Un ácido nucleico que codifica una α -amilasa puede estar ligado de forma operativa a varios promotores y reguladores en un vector adecuado para la expresión de la α -amilasa en células huésped. Entre los ejemplos de promotores se incluyen la amilasa de *B. licheniformis* (LAT), *B. subtilis* (AmyE o AprE), y CelA de *Streptomyces*. Dicho ácido nucleico también puede encontrarse ligado a otras secuencias de codificación, por ejemplo, para codificar un polipéptido quimérico.

3. Producción de variantes de amilasas

[0119] Las presentes variantes de amilasa pueden producirse en células huésped, por ejemplo, mediante la secreción o la expresión intracelular. Se puede obtener un material de células cultivadas (por ejemplo, un caldo de cultivo de células enteras) que comprende una variante de amilasa tras la secreción de la variante de amilasa en el medio celular. Opcionalmente, la variante de amilasa puede aislarse de las células huésped, o incluso aislarse del caldo celular, dependiendo de la pureza deseada de la variante de amilasa final. Se puede clonar un gen que codifica una variante de amilasa y expresarse conforme a métodos que se conocen en la técnica. Entre las células huésped adecuadas se incluyen células bacterianas, fúngicas (incluidas levaduras y hongos filamentosos) y vegetales (incluidas algas). Entre las células huésped especialmente útiles se incluyen las de *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* o *Trichoderma reesei*. Otras células huésped incluyen células bacterianas, por ejemplo, *Bacillus subtilis* o *B. licheniformis*, así como *Streptomyces*.

[0120] La célula huésped puede expresar además un ácido nucleico que codifica una glucoamilasa homóloga o heteróloga, esto es, una glucoamilasa que no pertenece a la misma especie que la célula huésped, o una o más enzimas distintas. La glucoamilasa puede ser una variante de glucoamilasa, tal como una de las variantes de glucoamilasa expuestas en la solicitud de patente americana N.º 8,058,033 (Danisco US Inc.), por ejemplo. Asimismo, el huésped puede expresar una o más enzimas, péptidos o proteínas accesorias. Estos pueden favorecer los procesos de licuefacción, sacarificación, fermentación, SSF, etc. Además, la célula huésped puede producir sustancias bioquímicas, además de enzimas utilizadas para digerir la(s) diversa(s) materia(s) prima(s). Dichas células huésped pueden resultar útiles para la fermentación o los procesos simultáneos de sacarificación y fermentación, con el fin de reducir o eliminar la necesidad de añadir enzimas.

3.1. Vectores

[0121] Se puede construir un constructo de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica variantes de amilasa para que se exprese en una célula huésped. Los ácidos nucleicos representativos que codifican variantes de amilasa incluyen la SEQ ID N.º 4. Debido a la conocida degeneración del código genético, las variantes de polinucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos idéntica pueden diseñarse y realizarse mediante técnica rutinaria. La optimización del uso de codones para una célula huésped concreta también se conoce en la técnica. Los ácidos nucleicos que codifican variantes de amilasas pueden incorporarse en un vector. Los vectores pueden transferirse a una célula huésped empleando técnicas de transformación conocidas, como las que se exponen más adelante.

[0122] El vector puede ser cualquier vector que pueda transformarse y replicarse en una célula huésped. Por ejemplo, un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una variante de amilasa puede transformarse y replicarse en una célula huésped bacteriana como medio de propagación y amplificación del vector. El vector también puede transformarse en un huésped de expresión, de forma que los ácidos nucleicos codificantes pueden expresarse como una amilasa funcional. Las células huésped que actúan como huéspedes de expresión pueden incluir, por ejemplo, hongos filamentosos. El catálogo de cepas del Fungal Genetics Stock Center (FGSC) incluye vectores adecuados para la expresión en células huésped fúngicas. Véase FGSC, Catalogue of Strains, Universidad de Missouri, en www.fgsc.net (última modificación, 17 de enero de 2007). Un vector representativo es pJG153, un vector de expresión Cre sin promotor que puede replicarse en un huésped bacteriano. Véase Harrison *et al.* (junio de 2011), *Applied Environ. Microbiol.* 77: 3916-22. pJG153 puede

modificarse empleando técnicas rutinarias para comprender y expresar un ácido nucleico que codifica una variante de amilasa.

[0123] Un ácido nucleico que codifica una variante de amilasa puede estar ligado de forma operativa a un promotor adecuado, lo cual permite la transcripción en la célula huésped. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestra actividad transcripcional en la célula huésped elegida y puede derivarse de genes que codifican proteínas homólogas o bien heterólogas a la célula huésped. Entre los ejemplos de promotores para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN que codifica una variante de amilasa, especialmente en un huésped bacteriano, se encuentran el promotor del operón lac de *E. coli*, los promotores del gen de agarasa dagA o celA de *Streptomyces coelicolor*, los promotores del gen de α -amilasa (amyL) de *Bacillus licheniformis*, los promotores del gen de amilasa maltogénica (amyM) de *Bacillus stearothermophilus*, los promotores de la α -amilasa (amyQ) de *Bacillus amyloliquefaciens* los promotores de los genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis*, etc. Para la transcripción en un huésped fúngico, los ejemplos de promotores útiles son aquellos que derivan del gen que codifica la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la α -amilasa neutra de *Aspergillus niger*, la α -amilasa estable en 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*. Cuando se expresa un gen que codifica una amilasa en una especie bacteriana como *E. coli*, se puede seleccionar un promotor adecuado, por ejemplo, de entre un promotor bacteriófago, incluyendo un promotor T7 y un promotor fago lambda. Entre los ejemplos de promotores adecuados para la expresión en una especie de levadura se incluyen, sin carácter limitativo, los promotores Gal 1 y Gal 10 de *Saccharomyces cerevisiae* y los promotores AOX1 o AOX2 de *Pichia pastoris*. *cbh1* es un promotor endógeno e inducible de *T. reesei*. Véase Liu *et al.* (2008) "Improved heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* by cellobiohydrolase I gene (*cbh1*) promoter optimization," *Acta Biochim. Biophys. Sin* (Shanghái) 40(2): 158-65.

[0124] La secuencia de codificación puede estar ligada de forma operativa a una secuencia de señal. El ADN que codifica la secuencia de señal puede ser la secuencia de ADN asociada de forma natural al gen de amilasa que va a expresarse o proveniente de un género o especie distinta. Se puede introducir una secuencia de señal y una secuencia promotora que comprenden un constructo de ADN o un vector en una célula huésped fúngica, y pueden derivar de la misma fuente. Por ejemplo, la secuencia de señal es la secuencia de señal *cbh1* que está ligada de forma operativa a un promotor *cbh1*.

[0125] Un vector de expresión puede comprender también un terminador de transcripción adecuado y, en eucariotas, secuencias de poliadenilación ligadas de forma operativa a la secuencia de ADN que codifica una variante de amilasa. Las secuencias de terminación y de poliadenilación pueden derivar de forma adecuada de las mismas fuentes que el promotor.

[0126] El vector puede comprender además una secuencia de ADN que permite que el vector se replique en la célula huésped. Entre los ejemplos de tales secuencias se encuentran los orígenes de la replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

[0127] El vector puede comprender también un marcador de selección, por ejemplo, un gen cuyo producto complementa un defecto en la célula huésped aislada, como los genes *dal* de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, o un gen que confiere resistencia antibiótica, como, por ejemplo, resistencia a la ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Asimismo, el vector puede comprender marcadores de selección de *Aspergillus*, como *amdS*, *argB*, *niaD* y *xscC*, un marcador que produzca resistencia a la higromicina, o la selección puede llevarse a cabo mediante cotransformación, como se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, la solicitud internacional PCT WO 91/17243.

[0128] En ciertos aspectos, la expresión intracelular puede resultar ventajosa, por ejemplo, al utilizar ciertas bacterias u hongos como células huésped para producir grandes cantidades de amilasa para el enriquecimiento o purificación posterior. La secreción extracelular de amilasa en el medio de cultivo puede utilizarse también para realizar un material de cultivo celular que comprenda la amilasa aislada.

[0129] Normalmente, el vector de expresión incluye los componentes de un vector de clonación, como, por ejemplo, un elemento que permita la replicación autónoma del vector en el organismo huésped seleccionado y uno o más marcadores fenotípicamente detectables para fines de selección. Normalmente, el vector de expresión comprende secuencias de nucleótidos de control, como un promotor, operador, sitio de unión al ribosoma, señal de inicio de la traducción y, opcionalmente, un gen represor o uno o más genes activadores. Asimismo, el vector de expresión puede comprender una secuencia que codifique una secuencia de aminoácidos capaz de dirigir la amilasa a un orgánulo de la célula huésped, como un peroxisoma, o a un compartimento concreto de la célula huésped. Dicha secuencia diana incluye sin carácter limitativo la secuencia SKL. Para la expresión en la dirección de secuencias de control, la secuencia de ácido nucleico de la amilasa se encuentra ligada de forma operativa a las secuencias de control de una forma adecuada en relación con la expresión.

[0130] Los procedimientos empleados para ligar el constructo de ADN que codifica una amilasa, el promotor, el terminador y otros elementos, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados, son bien conocidos para expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 2ª ed., Cold Spring Harbor, 1989, y 3ª ed., 2001).

3.2. Transformación y cultivo de células huésped

[0131] Una célula aislada que comprende, bien un constructo de ADN, bien un vector de expresión, se utiliza ventajosamente como célula huésped en la producción recombinante de una amilasa. La célula se puede transformar con el constructo de ADN que codifica la enzima, integrando de manera conveniente el constructo de ADN (en una o más copias) en el cromosoma huésped. Por lo general, se considera que esta integración supone una ventaja, ya que es más probable que la secuencia de ADN se mantenga estable en la célula. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped puede llevarse a cabo conforme a métodos habituales, por ejemplo, mediante recombinación homóloga o heteróloga. De forma alternativa, la célula puede transformarse con un vector de expresión según se ha descrito anteriormente en relación con los distintos tipos de células huésped.

[0132] Entre los ejemplos de organismos huésped bacterianos adecuados se encuentran especies de bacterias Gram-positivas, como Bacillaceae, incluidas *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Geobacillus* (anteriormente *Bacillus*) *stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, y *Bacillus thuringiensis*; especies de *Streptomyces*, como *Streptomyces murinus*; especies de bacterias ácido-lácticas, incluyendo *Lactococcus* sp., como *Lactococcus lactis*; *Lactobacillus* sp. incluyendo *Lactobacillus reuteri*; *Leuconostoc* sp.; *Pediococcus* sp.; y *Streptococcus* sp. De forma alternativa, se pueden seleccionar como organismo huésped cepas de especies de bacterias Gram-negativas que pertenecen a Enterobacteriaceae, incluida *E. coli*, o a Pseudomonadaceae.

[0133] Se puede seleccionar un organismo huésped de levadura apropiado de especies de levaduras relevantes desde el punto de vista biotecnológico, entre las que se incluyen, sin carácter limitativo, especies de levaduras como *Pichia* sp., *Hansenula* sp., o *Kluyveromyces*, *Yarrowinia*, especies de *Schizosaccharomyces* o una especie de *Saccharomyces*, incluidas *Saccharomyces cerevisiae* o una especie que pertenezca a *Schizosaccharomyces*, como, por ejemplo, *S. pombe*. Se puede utilizar como organismo huésped una cepa de la especie de levaduras metilotróficas *Pichia pastoris*. De forma alternativa, el organismo huésped puede ser una especie de *Hansenula*. Entre los organismos huésped de hongos filamentosos adecuados se incluyen especies de *Aspergillus*, p. ej., *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus tubigensis*, *Aspergillus awamori*, o *Aspergillus nidulans*. De forma alternativa, pueden utilizarse como organismo huésped cepas de una especie de *Fusarium* sp., p. ej., *Fusarium oxysporum*, o de una especie de *Rhizomucor* sp., como *Rhizomucor miehei*. Otras cepas adecuadas incluyen *Thermomyces* y *Mucor* sp. Asimismo, puede utilizarse *Trichoderma* sp. como un huésped. En el documento EP238023, por ejemplo, se describe un procedimiento adecuado para la transformación de células huésped de *Aspergillus*. Una amilasa expresada por una célula huésped fúngica puede ser glicosilada, esto es, comprenderá un grupo glicosil. El patrón de glicosilación puede ser el mismo o distinto al que presenta la amilasa natural. El tipo y/o grado de glicosilación puede proporcionar cambios en las propiedades enzimáticas y/o bioquímicas.

[0134] Resulta ventajoso eliminar genes de huéspedes de expresión, donde la deficiencia genética puede curarse mediante el vector de expresión transformado. Se pueden emplear métodos conocidos para obtener una célula huésped fúngica que presente uno o más genes inactivados. La inactivación génica puede lograrse mediante la delección completa o parcial, la inactivación por inserción o a través de cualquier otro medio que provoque que un gen no sea funcional para su finalidad prevista, de forma que se impide que el gen exprese una proteína funcional. Cualquier gen de una especie de *Trichoderma* sp. u otro huésped fúngico filamentosos que se ha clonado se puede eliminar; por ejemplo, los genes *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl2*. La delección de genes se puede conseguir insertando una forma del gen que se desea inactivar en un plásmido mediante métodos conocidos en la técnica.

[0135] La introducción de un constructo o vector de ADN en una célula huésped incluye técnicas como la transformación; la electroporación; la microinyección nuclear; la transducción; la transfección, por ejemplo, transfección mediada por lipofección y transfección mediada por DEAE-dextrano; la incubación con precipitado de ADN de fosfato de calcio; el bombardeo de alta velocidad con microproyectiles recubiertos de ADN; y la fusión de protoplastos. En la técnica se conocen métodos generales de transformación. Véase, p. ej., Sambrook *et al.* (2001), más arriba. La expresión de proteína heteróloga en *Trichoderma* se describe, por ejemplo, en el documento de patente americana N.º 6,022,725. Asimismo, se hace referencia a Cao *et al.* (2000) Science 9:991-1001 para la transformación de cepas de *Aspergillus*. Se pueden construir transformantes genéticamente estables con sistemas de vectores, a través de los cuales se integra de forma estable el ácido nucleico que codifica una amilasa en un cromosoma de célula huésped. A continuación, los transformantes se seleccionan y purifican empleando técnicas conocidas.

[0136] La preparación de *Trichoderma* sp. para la transformación, por ejemplo, puede implicar la preparación de protoplastos de micelios fúngicos. Véase Campbell *et al.* (1989) Curr. Genet. 16: 53-56. Los micelios se pueden obtener a partir de esporas vegetativas germinadas. Los micelios se tratan con una enzima que digiere la pared celular, dando lugar a protoplastos. Los protoplastos se protegen mediante la presencia de un estabilizador osmótico en el medio de suspensión. Estos estabilizadores incluyen sorbitol, manitol, cloruro de potasio, sulfato de magnesio y similares. Normalmente, la concentración de estos estabilizadores varía entre 0,8 M y 1,2 M; por ejemplo, se puede utilizar una solución de 1,2 M de sorbitol en el medio de suspensión.

[0137] La absorción de ADN en la cepa huésped de *Trichoderma* sp. depende de la concentración de ion calcio. En general, se utilizan entre aproximadamente 10-50 mM de CaCl₂ en una solución de absorción. Otros compuestos adecuados incluyen un sistema tampón, como tampón TE (10 mM de Tris, pH 7,4; 1 mM de EDTA) o 10 mM de MOPS, pH 6,0 y polietilenglicol. Se cree que el polietilenglicol fusiona las membranas celulares, permitiendo así que los contenidos del medio se liberen en el citoplasma de la cepa de *Trichoderma* sp. Esta fusión deja frecuentemente múltiples copias del ADN plasmídico integradas en el cromosoma huésped.

[0138] Generalmente, la transformación de *Trichoderma* sp. emplea protoplastos o células que han sido sometidas a un tratamiento de permeabilidad, normalmente con una densidad de 10⁵ a 10⁷/ml, especialmente 2x10⁶/ml. Se puede mezclar un volumen de 100 µl de estos protoplastos o células en una solución adecuada (p. ej., 1,2 M de sorbitol y 50 mM de CaCl₂) con el ADN deseado. En general, se añade una concentración alta de PEG a la solución de absorción. Se puede añadir de 0,1 a 1 volumen de 25 % de PEG 4000 a la suspensión de protoplastos; no obstante, resulta útil añadir aproximadamente 0,25 volúmenes a la suspensión de protoplastos. También se pueden añadir aditivos, tales como dimetilsulfóxido, heparina, espermidina, cloruro de potasio y similares, a la solución de absorción para facilitar la transformación. Existen procedimientos similares disponibles para otras células huésped fúngicas. Véase, p. ej., el documento de patente americana N.º 6,022,725.

3.3. Expresión

[0139] Un método para producir una amilasa puede comprender el cultivo de una célula huésped según se ha descrito anteriormente en condiciones propicias para la producción de la enzima, y la recuperación de la enzima de las células y/o del medio de cultivo.

[0140] El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio habitual apropiado para el cultivo de la célula huésped en cuestión y la obtención de la expresión de una amilasa. Los medios apropiados y los componentes de los medios pueden adquirirse gracias a proveedores comerciales, o se pueden preparar conforme a recetas publicadas (p. ej., según se describe en los catálogos de la American Type Culture Collection).

[0141] Una enzima secretada de las células huésped se puede utilizar en una preparación de caldo de cultivo completo. En los presentes métodos, se puede conseguir la preparación de un caldo de fermentación completo gastado de un microorganismo recombinante utilizando cualquier método de cultivo conocido en la técnica que dé como resultado la expresión de una α-amilasa. Puede entenderse, por lo tanto, que la fermentación comprende cultivo en matraz de agitación, fermentación a pequeña o a gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, por lotes, por lote alimentado, o en estado sólido) en laboratorios o fermentadores industriales realizada en un medio adecuado y en condiciones que permitan que la amilasa se exprese o se aisle. El término «caldo de fermentación completo gastado» se define en el presente documento como contenidos no fraccionados de material de fermentación que incluye medio de cultivo, proteínas extracelulares (p. ej., enzimas), y biomasa celular. Se entiende que el término «caldo de fermentación completo gastado» abarca también la biomasa celular que se ha lisado o permeabilizado empleando métodos conocidos en la técnica.

[0142] Una enzima secretada de las células huésped puede recuperarse convenientemente del medio de cultivo mediante procedimientos conocidos, incluyendo la separación de las células del medio mediante centrifugación o filtración, y la precipitación de componentes proteicos del medio por medio de una sal como sulfato de amonio, y a continuación, empleando procesos cromatográficos, como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, o similares.

[0143] El polinucleótido que codifica una amilasa en un vector puede estar ligado de forma operativa a una secuencia de control capaz de posibilitar la expresión de la secuencia de codificación mediante la célula huésped, es decir, el vector es un vector de expresión. Las secuencias de control pueden modificarse, por ejemplo, mediante la adición de otros elementos reguladores transcripcionales para provocar que el nivel de transcripción dirigida por las secuencias de control sea más sensible a moduladores transcripcionales. Las secuencias de control pueden comprender especialmente promotores.

[0144] Las células huésped pueden cultivarse en condiciones adecuadas que permitan la expresión de una amilasa. La expresión de las enzimas puede ser constitutiva, de tal forma que se produzcan continuamente, o inducible, lo cual requiere de un estímulo para iniciar la expresión. En el caso de la expresión inducible, la producción de proteínas se puede iniciar cuando sea conveniente mediante, por ejemplo, la adición de una sustancia inductora al medio de cultivo, como dexametasona o IPTG o soforosa. Los polipéptidos también se pueden producir de forma recombinante en un sistema libre de células *in vitro*, como el sistema de reticulocitos de conejo TNT™ (Promega).

[0145] Un huésped de expresión también puede cultivarse en el medio apropiado para el huésped, en condiciones aerobias. Se puede proporcionar agitación o una combinación de agitación y aireación, teniendo lugar la producción a la temperatura adecuada para ese huésped, p. ej., desde aproximadamente 25 °C hasta aproximadamente 75 °C (p. ej., de 30 °C a 45 °C), dependiendo de las necesidades del huésped y de la producción de la variante de amilasa deseada. El cultivo puede llevarse a cabo desde aproximadamente 12 horas hasta aproximadamente 100 horas o más (y cualquier valor de horas comprendido en ese período, p. ej.,

de 24 a 72 horas). Normalmente, el caldo de cultivo presenta un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,0, dependiendo una vez más de las condiciones de cultivo necesarias para el huésped en relación con la producción de una amilasa.

3.4. Identificación de actividad de amilasa

5 **[0146]** Para evaluar la expresión de una amilasa es una célula huésped, se puede medir la proteína expresada, el correspondiente ARNm, o la actividad de α -amilasa mediante ensayos. Por ejemplo, entre los ensayos apropiados se incluyen el ensayo *Northern blot*, la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa, y la hibridación *in situ*, empleando una sonda de hibridación debidamente marcada. Entre los ensayos adecuados se incluye también la medición de actividad de amilasa en una muestra, por ejemplo, mediante
10 ensayos que midan directamente los azúcares reductores, como glucosa, en los medios de cultivo. Por ejemplo, se puede determinar la concentración de glucosa empleando el kit de reactivo de glucosa n.º 15-UV (Sigma Chemical Co.) o un instrumento, como el autoanalizador Technicon. La actividad de α -amilasa también se puede medir mediante cualquier método conocido, como los ensayos de PAHBAH o ABTS, descritos más adelante.

3.5. Métodos para enriquecer y purificar variantes de amilasas

15 **[0147]** Las técnicas de fermentación, separación y concentración se conocen bien en la técnica, y se pueden utilizar métodos convencionales para preparar una solución concentrada que contenga polipéptidos de una variante de α -amilasa.

[0148] Tras la fermentación, se obtiene un caldo de fermentación, se eliminan las células microbianas y varios sólidos suspendidos, incluidas materias primas de fermentación, mediante técnicas de separación
20 convencionales con el fin de obtener una solución de amilasa. Por lo general, se emplea la filtración, centrifugación, microfiltración, filtración rotativa al vacío, ultrafiltración, centrifugación seguida de ultrafiltración, extracción, o cromatografía, o similares.

[0149] Es conveniente concentrar una solución que contenga polipéptidos de una variante de α -amilasa con el fin de optimizar la recuperación. El uso de soluciones no concentradas requiere de un mayor tiempo de incubación
25 con el fin de recoger el precipitado enzimático enriquecido o purificado.

[0150] La solución que contiene enzimas se concentra utilizando técnicas de concentración convencionales hasta que se obtiene el nivel de enzimas deseado. Se puede lograr la concentración de la solución que contiene enzimas mediante cualquiera de las técnicas expuestas en el presente documento. Entre los ejemplos de métodos de enriquecimiento y purificación se incluyen, sin carácter limitativo, la filtración rotativa al vacío y/o la ultrafiltración.
30

[0151] La solución de enzimas se concentra en una solución de enzimas concentrada hasta que la actividad enzimática de la solución concentrada que contiene polipéptidos de una variante de α -amilasa alcanza un nivel deseado.

[0152] La concentración se puede llevar a cabo empleando, p. ej., un agente de precipitación, como un agente de precipitación de haluro metálico. Los agentes de precipitación de haluro metálico incluyen, sin carácter limitativo, cloruros de metal alcalino, bromuros de metal alcalino y mezclas de dos o más de estos haluros metálicos. Entre los ejemplos de haluros metálicos se incluyen el cloruro de sodio, cloruro de potasio, bromuro de sodio, bromuro de potasio y mezclas de dos o más de estos haluros metálicos. El agente de precipitación de haluro metálico, cloruro de sodio, también puede utilizarse como un conservante.
35

[0153] El agente de precipitación de haluro metálico se utiliza en una cantidad efectiva para precipitar una amilasa. La selección de al menos una cantidad efectiva y una cantidad óptima de haluro metálico eficaz para provocar la precipitación de la enzima, así como las condiciones de la precipitación para la recuperación máxima, incluyendo el tiempo de incubación, pH, temperatura y concentración de enzima, resultará evidente a primera vista para un experto en la técnica, tras análisis rutinarios.
40

[0154] Por lo general, se añade al menos aproximadamente de un 5 % p/v (peso/volumen) a aproximadamente un 25 % p/v de haluro metálico a la solución concentrada de enzimas, y normalmente al menos un 8% p/v. Por lo general, no se añade más de aproximadamente un 25 % p/v (peso/volumen) de haluro metálico a la solución concentrada de enzimas, y normalmente no más de aproximadamente un 20 % p/v. La concentración óptima del agente de precipitación de haluro metálico dependerá, entre otras cosas, de la naturaleza del polipéptido de variante de α -amilasa concreto y de su concentración en la solución concentrada de enzimas.
45
50

[0155] Otra forma alternativa de precipitar la enzima consiste en utilizar compuestos orgánicos. Entre los ejemplos de agentes de precipitación de compuesto orgánico se incluyen: ácido 4-hidroxibenzoico, sales de metal alcalino de ácido 4-hidroxibenzoico, ésteres de alquilo de ácido 4-hidroxibenzoico, y mezclas de dos o más de estos compuestos orgánicos. La adición de los agentes de precipitación de compuesto orgánico puede tener lugar con anterioridad, simultáneamente o posteriormente a la adición del agente de precipitación de haluro metálico, y la adición de ambos agentes de precipitación, el compuesto orgánico y el haluro metálico se puede llevar a cabo de forma secuencial o simultánea.
55

[0156] Por lo general, los agentes de precipitación orgánicos se seleccionan de entre el grupo que consiste en sales de metal alcalino de ácido 4-hidroxibenzoico, como sales de sodio o de potasio, y ésteres de alquilo de ácido 4-hidroxibenzoico lineales o ramificados, donde el grupo alquilo contiene de 1 a 12 átomos de carbono, y mezclas de dos o más de estos compuestos orgánicos. Los agentes de precipitación de compuesto orgánico pueden ser, por ejemplo, ésteres de alquilo de ácido 4-hidroxibenzoico lineales o ramificados, donde el grupo alquilo contiene de 1 a 10 átomos de carbono, y mezclas de dos o más de estos compuestos orgánicos. Ejemplos de compuestos orgánicos son ésteres de alquilo lineales de ácido 4-hidroxibenzoico, donde el grupo alquilo contiene de 1 a 6 átomos de carbono, y mezclas de dos o más de estos compuestos orgánicos. Asimismo, se pueden utilizar ésteres de metilo de ácido 4-hidroxibenzoico, ésteres de propilo de ácido 4-hidroxibenzoico, éster de butilo de ácido 4-hidroxibenzoico, éster de etilo de ácido 4-hidroxibenzoico y mezclas de dos o más de estos compuestos orgánicos. Entre otros compuestos orgánicos también se incluye, sin carácter limitativo, éster de metilo de ácido 4-hidroxibenzoico (llamado metilparabeno), éster de propilo de ácido 4-hidroxibenzoico (llamado propilparabeno), que son también ambos agentes conservantes de amilasa. Para más descripciones, véase, p. ej., el documento de patente americana N.º 5,281,526.

[0157] La adición del agente de precipitación de compuesto orgánico ofrece la ventaja de presentar una alta flexibilidad en las condiciones de precipitación con respecto al pH, temperatura, concentración de variante de amilasa, concentración de agente de precipitación y tiempo de incubación.

[0158] El agente de precipitación de compuesto orgánico se utiliza en una cantidad efectiva para mejorar la precipitación de la enzima por medio del agente de precipitación de haluro metálico. La selección de al menos una cantidad efectiva y una cantidad óptima de agente de precipitación de compuesto orgánico, así como las condiciones de la precipitación para la recuperación máxima, incluyendo el tiempo de incubación, pH, temperatura y concentración de enzima, resultará evidente a primera vista para un experto en la materia, en virtud de la presente descripción, tras los análisis rutinarios.

[0159] Por lo general, se añade al menos aproximadamente un 0,01 % p/v de agente de precipitación de compuesto orgánico a la solución concentrada de enzimas, y normalmente al menos aproximadamente un 0,02 % p/v. Por lo general, no se añade más de aproximadamente un 0,3 % p/v de agente de precipitación de compuesto orgánico a la solución concentrada de enzimas, y normalmente no más de aproximadamente un 0,2 % p/v.

[0160] La solución concentrada de polipéptidos, que contiene el agente de precipitación de haluro metálico, y el agente de precipitación de compuesto orgánico, puede ajustarse a un pH que, necesariamente, dependerá de la enzima que va a ser enriquecida o purificada. En general, el pH se ajusta a un nivel cercano al punto isoeléctrico de la amilasa. El pH puede ajustarse a un pH comprendido en un intervalo que oscila desde aproximadamente 2,5 unidades de pH por debajo del punto isoeléctrico (pI) hasta aproximadamente 2,5 unidades de pH por encima del punto isoeléctrico.

[0161] El tiempo de incubación necesario para obtener un precipitado enzimático enriquecido o purificado depende de la naturaleza de la enzima concreta, la concentración de enzimas, y el/los agente(s) de precipitación específico(s) y su concentración. Por lo general, el tiempo efectivo para precipitar la enzima está comprendido entre aproximadamente 1 hora y aproximadamente 30 horas; normalmente, no sobrepasa aproximadamente 25 horas. En presencia del agente de precipitación de compuesto orgánico, el tiempo de incubación puede reducirse aún más hasta menos de aproximadamente 10 horas, y en la mayoría de los casos, incluso hasta aproximadamente 6 horas.

[0162] En general, la temperatura durante la incubación oscila entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente 50 °C. Normalmente, el método se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre aproximadamente 10 °C y aproximadamente 45 °C (p. ej., entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 40 °C). La temperatura óptima para inducir la precipitación varía conforme a las condiciones de la solución y a la enzima o el/los agente(s) de precipitación utilizado(s).

[0163] La recuperación global del precipitado enzimático enriquecido o purificado, y la eficacia con la que se lleva a cabo el proceso, mejoran al agitar la solución que comprende la enzima, el haluro metálico incorporado y el compuesto orgánico añadido. La etapa de agitación se lleva a cabo tanto durante la adición del haluro metálico y del compuesto orgánico, como durante el período de incubación posterior. Entre los métodos de agitación adecuados se incluyen la mezcla o agitación mecánica, la aireación intensa, o cualquier técnica parecida.

[0164] Tras el período de incubación, la enzima enriquecida o purificada se separa entonces del pigmento disociado y de otras impurezas y se recoge mediante técnicas de separación, como la filtración, la centrifugación, la microfiltración, la filtración rotativa al vacío, la ultrafiltración, la filtración de prensa, la microfiltración por membranas cruzadas, la microfiltración con membranas de flujo cruzado, o similares. Se puede obtener un posterior enriquecimiento o purificación del precipitado enzimático lavando el precipitado con agua. Por ejemplo, se lava el precipitado enzimático enriquecido o purificado con agua que contiene el agente de precipitación de haluro metálico, o con agua que contiene los agentes de precipitación de haluro metálico y de compuesto orgánico.

[0165] Durante la fermentación, se acumula un polipéptido de variante de α -amilasa en el caldo de cultivo. Para el aislamiento, enriquecimiento o purificación de la variante de α -amilasa deseada, se centrifuga o se filtra el caldo de cultivo para eliminar células, y el líquido resultante sin células se emplea para el enriquecimiento o purificación de la enzima. En una forma de realización, el caldo de cultivo libre de células se somete a precipitación salina empleando sulfato de amonio a una saturación de aproximadamente un 70 %; la fracción de precipitación saturada al 70 % se disuelve entonces en un tampón y se aplica a una columna, como una columna Sephadex G-11, y se eluye para recuperar la fracción activa de enzimas. Para un enriquecimiento o purificación adicional, se puede utilizar un procedimiento convencional, como cromatografía de intercambio iónico.

[0166] Las enzimas enriquecidas o purificadas resultan útiles para aplicaciones de lavado de ropa y de limpieza. Por ejemplo, se pueden utilizar en detergentes para ropa y en quitamanchas. Pueden transformarse en un producto final que puede ser líquido (solución, suspensión) o sólido (granulado, polvo).

[0167] En Sumitani *et al.* (2000) "New type of starch-binding domain: the direct repeat motif in the C-terminal region of *Bacillus sp.* 195 α -amylase contributes to starch binding and raw starch degrading," *Biochem. J.* 350: 477-484, se describe un ejemplo más específico de enriquecimiento o purificación, y se resume brevemente en el presente documento. La enzima obtenida a partir de 4 litros de un sobrenadante TK24 de cultivo de *Streptomyces lividans* se trató con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a un 80% de saturación. El precipitado se recuperó mediante centrifugación a $10.000 \times g$ (20 min a 4°C) y se volvió a disolver en 20 Mm de tampón Tris/HCl (pH 7,0) conteniendo 5 mM de CaCl_2 . El precipitado solubilizado se dializó a continuación frente al mismo tampón. La muestra dializada se aplicó entonces a una columna de Sephacryl S-200, que previamente se había equilibrado con 20 mM de tampón Tris/HCl, (pH 7,0), 5 mM de CaCl_2 , y eluido a una velocidad de flujo lineal de 7 ml/h con el mismo tampón. Se recogieron fracciones de la columna y se evaluaron para determinar si existía actividad, con arreglo al ensayo enzimático y al SDS-PAGE. Posteriormente, se purificó la proteína según se expone a continuación. Se equilibró una columna de Toyopearl HW55 (Tosoh Bioscience, Montgomeryville, Pensilvania (EE. UU.); Cat. n.º 19812) con 20 mM de tampón Tris/HCl (pH 7,0) conteniendo 5 mM de CaCl_2 y 1,5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La enzima se eluyó con un gradiente lineal de 1,5 a 0 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 20 mM de tampón Tris/HCL, pH 7,0 que contenía 5 mM de CaCl_2 . Se recogieron las fracciones activas, y la enzima precipitó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a una saturación del 80 %. El precipitado se recuperó, se volvió a disolver y se dializó según se ha descrito anteriormente. A continuación, la muestra dializada se aplicó a una columna Mono Q HR5/5 (Amersham Pharmacia, Cat. n.º 17-5167-01), previamente equilibrada con 20 mM de tampón Tris/HCl (pH 7,0) que contenía 5 mM de CaCl_2 , a una velocidad de flujo de 60 ml/h. Las fracciones activas se recogieron y se añadieron a una solución de 1,5 M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las fracciones de enzimas activas se recromatografiaron en una columna de Toyopearl HW55, al igual que antes, para conseguir una enzima homogénea, según lo determinado mediante SDS-PAGE. Véase, p. ej., Sumitani *et al.* (2000) *Biochem. J.* 350: 477-484, para la discusión general sobre el método y las variaciones al respecto.

[0168] Para la recuperación de la escala de producción, se pueden enriquecer o purificar parcialmente polipéptidos de variante de α -amilasa, tal como se ha descrito en general anteriormente, mediante la eliminación de células mediante floculación con polímeros. De forma alternativa, la enzima puede enriquecerse o purificarse mediante microfiltración, seguida de concentración mediante ultrafiltración utilizando membranas y equipamiento disponibles. No obstante, para algunas aplicaciones, la enzima no necesita enriquecerse ni purificarse, y el caldo de cultivo completo puede lisarse y utilizarse sin un tratamiento posterior. A continuación, la enzima puede transformarse, por ejemplo, en gránulos.

4. Composiciones y usos de variantes de amilasas

[0169] Las variantes de amilasas resultan útiles para varias aplicaciones industriales. Por ejemplo, las variantes de amilasas resultan útiles en un proceso de conversión de almidón, especialmente en un proceso de sacarificación de un almidón que ha sido sometido a licuefacción. El producto final deseado puede ser cualquier producto que pueda producirse mediante la conversión enzimática del sustrato de almidón. Por ejemplo, el producto deseado puede ser un jarabe rico en glucosa y maltosa, que puede utilizarse en otros procesos, como en la preparación de HFCS, o que puede convertirse en una serie de otros productos útiles, como intermedios de ácido ascórbico (p. ej., gluconato; ácido 2-ceto-L-gulónico; 5-ceto-gluconato; y 2,5-dicetogluconato); 1,3-propanodiol; aminoácidos aromáticos (p. ej., tirosina, fenilalanina y triptófano); ácidos orgánicos (p. ej., lactato, piruvato, succinato, isocitrato y oxalacetato); aminoácidos (p. ej., serina y glicina); antibióticos; antimicrobianos; enzimas; vitaminas; y hormonas.

[0170] El proceso de conversión del almidón puede ser un precursor, o realizarse de forma simultánea, de un proceso de fermentación diseñado para producir alcohol para combustible o para beber (es decir, alcohol de boca). Un experto en la materia es consciente de las diversas condiciones de fermentación que se pueden emplear en la producción de estos productos finales. Las variantes de amilasas también resultan útiles en composiciones y métodos de elaboración de alimentos. Estos distintos usos de variantes de amilasas se describen con más detalle a continuación.

4.1. Preparación de sustratos de almidón

[0171] Los expertos en la materia tienen conocimiento de los métodos disponibles que se pueden emplear para preparar sustratos de almidón para su uso en los procesos descritos en el presente documento. Por ejemplo, un sustrato de almidón útil se puede obtener a partir de tubérculos, raíces, tallos, legumbres, cereales o granos enteros. Más concretamente, el almidón granular se puede obtener a partir de maíz, mazorcas, trigo, cebada, centeno, triticale, milo, sagú, mijo, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, judías, plátanos o patatas. El maíz contiene aproximadamente un 60-68 % de almidón; la cebada contiene aproximadamente un 55-65 % de almidón; el mijo contiene aproximadamente un 75-80 % de almidón, el trigo contiene aproximadamente un 60-65 % de almidón; y el arroz pulido contiene un 70-72 % de almidón. Los sustratos de almidón que se contemplan específicamente son el almidón de maíz y el almidón de trigo. El almidón de un grano puede estar molido o entero, e incluye sólidos del maíz, como granos, salvado y/o mazorcas. El almidón puede ser almidón crudo altamente refinado o materia prima de procesos de refinación de almidón. Varios almidones también están disponibles comercialmente. Por ejemplo, el almidón de maíz está disponible en Cerestar, Sigma, y Katayama Chemical Industry Co. (Japón); el almidón de trigo está disponible en Sigma; el almidón de boniato está disponible en Wako Pure Chemical Industry Co. (Japón); y el almidón de patata está disponible en Nakaari Chemical Pharmaceutical Co. (Japón).

[0172] El sustrato de almidón puede ser un almidón crudo de grano entero molido, que contiene fracciones sin almidón, p. ej., residuos de germen y fibras. La molienda puede comprender molienda húmeda, molienda en seco, o bien triturado. En el caso de la molienda húmeda, el grano entero se empa en agua o ácido diluido para separar el grano en sus elementos constitutivos, p. ej., almidón, proteína, germen, aceite, y fibras del grano. La molienda húmeda separa eficazmente el germen y la harina (esto es, gránulos de almidón y proteína), y es especialmente adecuada para la producción de jarabes. En la molienda en seco o en el triturado, los granos enteros se trituran hasta formar un polvo fino, y en ocasiones se procesa sin fraccionar el grano en sus elementos constitutivos. En algunos casos, se recuperan los aceites de los granos. El grano molido en seco comprenderá por tanto cantidades significativas de compuestos de carbohidratos no amiláceos, además de almidón. La molienda en seco del sustrato de almidón se puede emplear para la producción de etanol y otras sustancias bioquímicas. El almidón que se quiere procesar puede ser un almidón de calidad altamente refinado, por ejemplo, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, o al menos un 99,5 % puro.

4.2. Gelatinización y licuefacción de almidón

[0173] Según se utiliza en el presente documento, el término «licuefacción» o «licuar» hace referencia a un proceso mediante el cual se convierte el almidón en dextrinas de cadena más corta y menos viscosas. Por lo general, este proceso implica la gelatinización de almidón de forma simultánea o con posterioridad a la adición de una α -amilasa, aunque opcionalmente pueden añadirse otras enzimas que inducen la licuefacción. En algunas formas de realización, el sustrato de almidón preparado según se ha descrito previamente se suspende en agua. La suspensión de almidón puede contener almidón como un porcentaje en peso de sólidos secos de aproximadamente un 10-55 %, aproximadamente un 20-45 %, aproximadamente un 30-45 %, aproximadamente un 30-40 %, o aproximadamente un 30-35 %. La α -amilasa se puede añadir a la suspensión mediante, por ejemplo, una bomba dosificadora. La α -amilasa que se suele utilizar para esta aplicación es una α -amilasa bacteriana termoestable, como una α -amilasa de *Geobacillus stearothermophilus*. Normalmente, la α -amilasa se proporciona, por ejemplo, a aproximadamente 1500 unidades por kg de materia seca de almidón. Con el fin de optimizar la estabilidad y actividad de α -amilasa, el pH de la suspensión se ajusta normalmente hasta aproximadamente un pH de 5,5-6,5, y también puede añadirse aproximadamente 1 mM de calcio (aproximadamente 40 ppm de iones de calcio libres). La α -amilasa bacteriana que queda en la suspensión tras la licuefacción puede desactivarse a través de una serie de métodos, incluyendo la reducción del pH en una etapa posterior de la reacción o la eliminación de calcio de la suspensión en los casos en los que la enzima sea dependiente del calcio.

[0174] La suspensión de almidón con la α -amilasa puede bombearse continuamente a través de un *jet cooker*, que se calienta con vapor a 105 °C. La gelatinización sucede rápidamente en estas condiciones, y la actividad enzimática, junto con las fuerzas de corte significativas, inicia la hidrólisis del sustrato de almidón. El período de permanencia en el *jet cooker* es breve. El almidón parcialmente gelatinizado puede atravesar una serie de tubos de retención manteniendo una temperatura de 105-110 °C y permaneciendo durante 5-8 min hasta completar el proceso de gelatinización («licuefacción primaria»). La hidrólisis a la DE necesaria se completa en tanques de retención a 85-95 °C o a temperaturas más altas durante aproximadamente de 1 a 2 horas («licuefacción secundaria»). Estos tanques pueden contener deflectores para impedir la retromezcla. Según se utiliza en el presente documento, el término «minutos de licuefacción secundaria» se refiere al tiempo transcurrido desde el comienzo de la licuefacción secundaria hasta el momento en que se mide la dextrina equivalente (DE). A continuación, se deja enfriar la suspensión hasta llegar a la temperatura ambiente. Esta etapa de enfriamiento puede durar de 30 minutos a 180 minutos, p. ej., de 90 minutos a 120 minutos. Normalmente, el almidón licuado presenta la forma de una suspensión con un contenido de sólidos secos (p/p) de aproximadamente un 10-50 %; aproximadamente un 15-40 %; aproximadamente un 20-40 %; aproximadamente un 25-40 %; o aproximadamente un 25-35 %.

[0175] Ventajosamente, la licuefacción con variantes de amilasas puede llevarse a cabo con un pH bajo, eliminando la necesidad de ajustar el pH a aproximadamente un pH de 5,5-6,5. Las variantes de amilasas se pueden utilizar para la licuefacción en un rango de pH de 2 a 7; p. ej., pH 3,0 - 7,5, pH 4,0 - 6,0, o pH 4,5 - 5,8. Las variantes de amilasas pueden mantener actividad de licuefacción en un intervalo de temperatura de aproximadamente 85 °C - 95 °C, p. ej., 85 °C, 90 °C o 95 °C. Por ejemplo, la licuefacción se puede llevar a cabo con 800 µg de una amilasa en una solución de almidón de maíz con 25 % de DS durante 10 min en un pH de 5,8 a 85 °C, o en un pH de 4,5 a 95 °C, por ejemplo. La actividad de licuefacción se puede analizar utilizando cualquiera de entre una serie de pruebas de viscosidad conocidas en la técnica.

[0176] En formas de realización concretas que utilizan las presentes variantes de amilasa, la licuefacción de almidón se lleva a cabo en un intervalo de temperatura de 90-115 °C, con el objetivo de producir jarabes de glucosa de alta pureza, HFCS, maltodextrinas, etc.

4.3. Sacarificación

[0177] El almidón licuado se puede sacarificar en un jarabe rico en sacáridos con DP más bajo (p. ej., DP1 + DP2), utilizando variantes de amilasa, opcionalmente en presencia de otra(s) enzima(s). La composición exacta de los productos de sacarificación depende de la combinación de enzimas utilizada, así como del tipo de almidón granular procesado. Ventajosamente, el jarabe que se puede obtener utilizando las variantes de amilasas proporcionadas puede contener un porcentaje en peso de DP2 del total de oligosacáridos en el almidón sacarificado que sobrepase el 30 %, p. ej., 45 % - 65 % o 55 % - 65 %. El porcentaje en peso de (DP1 + DP2) en el almidón sacarificado puede sobrepasar aproximadamente un 70 %, p. ej., 75 % - 85 % u 80 % - 85 %. Las amilasas presentes también producen un rendimiento de glucosa relativamente elevado, p. ej., DP1 > 20 % en el producto de jarabe.

[0178] Mientras que la licuefacción funciona por lo general como un proceso continuo, la sacarificación se lleva a cabo a menudo como un proceso por lotes. Normalmente, la sacarificación es más efectiva a temperaturas de aproximadamente 60-65 °C y en un pH de aproximadamente 4,0-4,5, por ejemplo, un pH de 4,3, requiriendo un enfriamiento y un ajuste del pH del almidón licuado. La sacarificación se puede llevar a cabo, por ejemplo, a una temperatura que oscila entre aproximadamente 40 °C, aproximadamente 50 °C o aproximadamente 55 °C, hasta aproximadamente 60 °C o hasta aproximadamente 65 °C. Por lo general, la sacarificación se lleva a cabo en depósitos de agitación, que pueden tardar varias horas en llenarse o vaciarse. Normalmente, las enzimas se añaden bien en una proporción fija de sólidos secos mientras se llenan los tanques, bien en una única dosis al inicio de la etapa de llenado. Normalmente, se dirige una reacción de sacarificación para realizar un jarabe durante aproximadamente 24-72 horas, por ejemplo, 24-48 horas. Cuando se alcanza una DE máxima o deseada, la reacción se detiene calentándola a 85 °C durante 5 min, por ejemplo. Una incubación más larga dará como resultado una DE más baja, hasta llegar a aproximadamente 90 DE, ya que la glucosa acumulada se repolimeriza a isomaltosa y/o a otros productos de reversión a través de una reacción de reversión enzimática y/o en línea con el equilibrio termodinámico. Al utilizar una amilasa, la sacarificación se realiza de forma óptima en un intervalo de temperatura comprendido entre aproximadamente 30 °C y aproximadamente 75 °C, p. ej., 45 °C - 75 °C o 47 °C - 74 °C. La sacarificación puede llevarse a cabo en un rango de pH de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 7, p. ej., pH 3,0 - pH 7,5, pH 3,5 - pH 5,5, pH 3,5, pH 3,8 o pH 4,5.

[0179] Se puede añadir una α -amilasa en la suspensión en forma de una composición. Se puede añadir una α -amilasa a una suspensión de sustrato de almidón granular en una cantidad de aproximadamente 0,6 - 10 ppm ds, p. ej., de 2 ppm ds. Se puede añadir una α -amilasa como una enzima de caldo de cultivo completo, clarificada, enriquecida, parcialmente purificada o purificada. La actividad específica de la amilasa puede ser de aproximadamente 300 U/mg de enzima, por ejemplo, medida con el ensayo PAHBAH. La α -amilasa también se puede añadir como un producto de caldo de cultivo completo.

[0180] Se puede añadir una α -amilasa en la suspensión como una solución de enzimas aislada. Por ejemplo, se puede añadir una α -amilasa en forma de un material celular de cultivo producido por células huésped que expresan una amilasa. Una célula huésped también puede secretar una α -amilasa en el medio de reacción durante el proceso de fermentación o de SSF, de forma que la enzima se incorpora continuamente en la reacción. La célula huésped que produce y secreta amilasa puede expresar también una enzima adicional, como una glucoamilasa. Por ejemplo, en el documento de patente americana N.º 5,422,267 se da a conocer el uso de una glucoamilasa de levadura para la producción de bebidas alcohólicas. Por ejemplo, una célula huésped, p. ej., de *Trichoderma reesei* o de *Aspergillus niger*, se puede modificar para coexpresar una α -amilasa y una glucoamilasa, p. ej., HgGA, TrGA o una variante de TrGA, durante la sacarificación. La célula huésped puede estar genéticamente modificada de forma que no exprese su glucoamilasa endógena ni otras enzimas, proteínas u otros materiales. La célula huésped puede modificarse para expresar un amplio espectro de diversas enzimas sacarolíticas. Por ejemplo, la célula huésped recombinante de levadura puede comprender ácidos nucleicos que codifiquen una glucoamilasa, una alfa-glucosidasa, una enzima que utilice azúcar pentosa, una α -amilasa, una pululanasa, una isoamilasa y/o una isopululanasa. Véase, p. ej., el documento WO 2011/153516 A2.

4.4. Isomerización

[0181] El hidrolizado de almidón soluble producido mediante el tratamiento con amilasa puede convertirse en jarabe de almidón con alto contenido en fructosa (HFSS), como jarabe de maíz de alta fructosa (HFCS). Esta conversión se puede alcanzar utilizando una glucosa isomerasa, especialmente una glucosa isomerasa inmovilizada en un soporte sólido. El pH se incrementa hasta aproximadamente de 6,0 a aproximadamente 8,0, p. ej., un pH de 7,5 (dependiendo de la isomerasa), y se elimina el Ca^{2+} mediante intercambio iónico. Entre las isomerasas adecuadas se incluyen SWEETZYME®, IT (Novozymes A/S); IMGI de G-ZYME® y G993 de G-ZYME®, KETOMAX®, G993 de G-ZYME®, líquido de G993 de G-ZYME®, e IGI de GENSWEET®. Tras la isomerización, la mezcla contiene normalmente alrededor de un 40-45 % de fructosa, p. ej., un 42 % de fructosa.

4.5. Fermentación

[0182] El hidrolizado de almidón soluble, especialmente un jarabe rico en glucosa, se puede fermentar poniendo en contacto el hidrolizado de almidón con un organismo de fermentación, normalmente a una temperatura en torno a 32 °C, como de 30 °C a 35 °C para la levadura que produce alcohol. La temperatura y el pH de la fermentación dependerán del organismo de fermentación. Entre los productos de EOF se incluyen metabolitos, como ácido cítrico, ácido láctico, ácido succínico, glutamato monosódico, ácido glucónico, gluconato de sodio, gluconato de calcio, gluconato de potasio, ácido itacónico y otros ácidos carboxílicos, glucono delta-lactona, eritorbato de sodio, lisina y otros aminoácidos, ácido graso omega 3, butanol, isopreno, 1,3-propanodiol, y otros biomateriales.

[0183] Entre los microorganismos etanológicos se incluyen levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, y bacterias, p. ej., *Zymomonas mobilis*, que expresan alcohol deshidrogenasa y piruvato descarboxilasa. El microorganismo etanológico puede expresar xilosa reductasa y xilitol deshidrogenasa, que convierte a la xilosa en xilulosa. En la técnica se conocen y se pueden utilizar cepas mejoradas de microorganismos etanológicos que pueden soportar temperaturas más altas, por ejemplo. Véase Liu *et al.* (2011) Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao 27(7): 1049-56. El origen comercial de estas levaduras incluye ETHANOL RED® (LeSaffre); Thermosacc® (Lallemand); RED STAR® (Red Star); FERMIOLO® (DSM Specialties); y SUPERSTART® (Alltech). En la técnica se conocen también microorganismos que producen otros metabolitos, como ácido cítrico y ácido láctico, mediante fermentación. Véase, p. ej., Papagianni (2007) "Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling", Biotechnol. Adv. 25(3): 244-63; John *et al.* (2009) "Direct lactic acid fermentation: focus on simultaneous saccharification and lactic acid production," Biotechnol. Adv. 27(2): 145-52.

[0184] Los procesos de sacarificación y fermentación se pueden llevar a cabo como un proceso de SSF. La fermentación puede comprender, por ejemplo, un enriquecimiento, purificación y recuperación posteriores de etanol. Durante la fermentación, el contenido de etanol del caldo o «cerveza» puede alcanzar aproximadamente un 8-18 % v/v, p. ej., 14-15 % v/v. El caldo puede destilarse para producir soluciones de etanol enriquecidas, p. ej., 96 % puras. Además, el CO_2 generado en la fermentación puede recogerse con un purificador de CO_2 , comprimido, y comercializado para otros usos, p. ej., bebidas carbonatadas o producción de hielo seco. Los residuos sólidos derivados del proceso de fermentación pueden utilizarse como productos ricos en proteínas, p. ej., alimento para animales.

[0185] Como se ha mencionado anteriormente, puede llevarse a cabo un proceso de SSF con células fúngicas que expresan y secretan amilasa continuamente durante el proceso de SSF. Las células fúngicas que expresan amilasa también pueden ser el microorganismo de fermentación, p. ej., un microorganismo etanológico. Por lo tanto, la producción de etanol también se puede llevar a cabo utilizando una célula fúngica que exprese suficiente amilasa, de forma que se tenga que añadir una cantidad inferior o nula de enzima de forma exógena. La célula huésped fúngica puede ser de una cepa fúngica modificada de forma apropiada. También se pueden utilizar células huésped fúngicas que expresan y secretan otras enzimas, además de amilasa. Dichas células pueden expresar glucoamilasa y/o una pululanasa, fitasa, alfa-glucosidasa, isoamilasa, beta-amilasa, celulasa, xilanasa, otras hemicelulasas, proteasa, beta-glucosidasa, pectinasa, esterasa, enzimas redox, transferasa, u otra enzima.

[0186] Una variación de este proceso es un sistema de «fermentación por lote alimentado», donde el sustrato se añade en incrementos mientras progresa la fermentación. Los sistemas por lote alimentado resultan útiles si la represión catabólica puede inhibir el metabolismo de las células, y donde se desea tener cantidades limitadas de sustrato en el medio. La concentración real del sustrato en sistemas por lote alimentado se calcula mediante los cambios en factores cuantificables como el pH, el oxígeno disuelto y la presión parcial de gases residuales, como el CO_2 . La fermentación discontinua (por lotes) y la fermentación por lote alimentado son técnicas habituales y conocidas en la técnica.

[0187] La fermentación continua es un sistema abierto donde un medio de fermentación determinado se añade progresivamente a un biorreactor, y una cantidad equivalente de medio condicionado se elimina de forma simultánea para el procesamiento. En general, la fermentación continua mantiene los cultivos con una densidad alta constante, donde las células se encuentran principalmente en crecimiento en fase logarítmica. La fermentación continua permite modular el crecimiento celular y/o la concentración de producto. Por ejemplo, un nutriente limitante como la fuente de carbono o la fuente de nitrógeno se mantiene en una tasa fija, y se permite

que se moderen el resto de parámetros. Debido a que el crecimiento se mantiene constante, la pérdida celular causada por el drenaje del medio se debería equilibrar con respecto a la tasa de crecimiento celular en la fermentación. Los métodos para optimizar los procesos de fermentación continua y para maximizar la tasa de formación de producto se conocen en la técnica de la microbiología industrial.

5 4.6. Composiciones que comprenden variantes de amilasas

[0188] Las variantes de amilasa se pueden combinar con una glucoamilasa (EC 3.2.1.3), p. ej., una glucoamilasa de *Trichoderma* o una variante de la misma. Un ejemplo de glucoamilasa es la glucoamilasa de *Trichoderma reesei* (TrGA) y variantes de la misma, que poseen actividad específica y estabilidad térmica superiores. Véase U.S. Published Applications N.ºs 2006/0094080, 2007/0004018, y 2007/0015266 (Danisco US Inc.). Entre las variantes adecuadas de TrGA se incluyen aquellas que presenten actividad de glucoamilasa y al menos un 80 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % de identidad de secuencia con la TrGA natural. Las variantes de amilasa incrementan ventajosamente el rendimiento de glucosa producido en un proceso de sacarificación catalizado por TrGA.

[0189] De forma alternativa, la glucoamilasa puede ser otra glucoamilasa de origen vegetal (incluyendo algas), fúngica o bacteriana. Por ejemplo, las glucoamilasas pueden ser glucoamilasa G1 o G2 de *Aspergillus niger*, o sus variantes (p. ej., Boel *et al.* (1984) EMBO J. 3: 1097-1102; WO 92/00381; WO 00/04136 (Novo Nordisk A/S)); y la glucoamilasa de *A. awamori* (p. ej., WO 84/02921 (Cetus Corp.)). Otra glucoamilasa de *Aspergillus* que se contempla incluye variantes con una estabilidad térmica mejorada, p. ej., G137A y G139A (Chen *et al.* (1996) Prot. Eng. 9: 499-505); D257E y D293E/Q (Chen *et al.* (1995) Prot. Eng. 8: 575-582); N182 (Chen *et al.* (1994) Biochem. J. 301: 275-281); A246C (Fierobe *et al.* (1996) Biochemistry, 35: 8698-8704); y variantes con residuos Pro en las posiciones A435 y S436 (Li *et al.* (1997) Protein Eng. 10: 1199-1204). Otras glucoamilasas que se contemplan incluyen glucoamilasas de *Talaromyces*, en concreto derivadas de *T. emersonii* (p. ej., WO 99/28448 (Novo Nordisk A/S)), *T. leycettanus* (p. ej., documento de patente americana N.º RE 32,153 (CPC International, Inc.)), *T. duponti*, o *T. thermophilus* (p. ej., documento de patente americana N.º 4,587,215). Entre las glucoamilasas bacterianas que se contemplan se incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en concreto de *C. thermoamylolyticum* (p. ej., EP 135,138 (CPC International, Inc.) y de *C. thermohydrosulfuricum* (p. ej., WO 86/01831 (Michigan Biotechnology Institute)). Las glucoamilasas adecuadas incluyen las glucoamilasas derivadas de *Aspergillus oryzae*, como una glucoamilasa que se muestra en la SEQ ID N.º 2 de WO 00/04136 (Novo Nordisk A/S). También son adecuadas glucoamilasas comerciales, como AMG 200L; AMG 300 L; SUPER de SAN™ y E de AMG™ (Novozymes); 300 de OPTIDEX® y L-400 de OPTIDEX (Danisco US Inc.); AMIGASE™ y PLUS de AMIGASE™ (DSM); G900 de G-ZYME® (Enzyme Bio-Systems); y G990 ZR de G-ZYME® (glucoamilasa de *A. niger* con un bajo contenido de proteasa). Otras glucoamilasas adecuadas incluyen la glucoamilasa de *Aspergillus fumigatus*, la glucoamilasa de *Talaromyces*, la glucoamilasa de *Thielavia*, la glucoamilasa de *Trametes*, la glucoamilasa de *Thermomyces*, la glucoamilasa de *Athelia*, o la glucoamilasa de *Humicola* (p. ej., HgGA). Normalmente, las glucoamilasas se añaden en una cantidad de aproximadamente 0,1 - 2 unidades de glucoamilasa (GAU)/g ds, p. ej., aproximadamente 0,16 GAU/g ds, 0,23 GAU/g ds, o 0,33 GAU/g ds.

[0190] Otras enzimas apropiadas que se pueden utilizar con amilasa incluyen una fitasa, proteasa, pululanasa, β -amilasa, isoamilasa, una α -amilasa distinta, alfa-glucosidasa, celulasa, xilanasa, otras hemicelulasas, beta-glucosidasa, transferasa, pectinasa, lipasa, cutinasa, esterasa, enzimas redox, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, se puede añadir una enzima desramificante, como una isoamilasa (EC 3.2.1.68), en cantidades efectivas conocidas por los expertos en la materia. También resulta adecuada una pululanasa (EC 3.2.1.41), p. ej., PROMOZYME®. Normalmente, la pululanasa se añade en 100 U/kg ds. Otras enzimas adecuadas incluyen proteasas, como proteasas fúngicas y bacterianas. Las proteasas fúngicas incluyen aquellas que se obtienen de *Aspergillus*, como de *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*; *Mucor* (p. ej., *M. miehei*); *Rhizopus*; y *Trichoderma*.

[0191] Las β -amilasas (EC 3.2.1.2) son amilasas maltogénicas exoactivas, que catalizan la hidrólisis de enlaces glucosídicos α -1,4 en amilopectina y polímeros de glucosa relacionados, liberando de esta forma maltosa. Las β -amilasas se han aislado de diversas plantas y microorganismos. Véase Fogarty *et al.* (1979) en Progress in Industrial Microbiology, Vol. 15, pp. 112-115. Estas β -amilasas presentan temperaturas óptimas que oscilan entre 40 °C y 65 °C, y un pH óptimo en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,0. Entre las β -amilasas que se contemplan se incluyen, aunque sin carácter limitativo, las β -amilasas de cebada BBA 1500 de SPEZYME®, DBA de SPEZYME®, ME de OPTIMALT™, BBA de OPTIMALT™ (Danisco US Inc.); y WBA de NOVOZYM™ (Novozymes A/S).

[0192] Las composiciones que comprenden las presentes amilasas pueden ser formulaciones acuosas o no acuosas, gránulos, polvos, geles, suspensiones, pastas, etc., que pueden comprender además cualquiera de una o más de las enzimas adicionales que se exponen en el presente documento, junto con tampones, sales, conservantes, agua, cosolventes, tensioactivos, y similares. Dichas composiciones pueden funcionar en combinación con enzimas endógenas u otros ingredientes ya presentes en una suspensión, baño de agua, lavadora, producto de alimento o bebida, etc.; por ejemplo, enzimas endógenas de origen vegetal (incluyendo algas), enzimas residuales de una etapa anterior del proceso, y similares.

5. Composiciones y métodos para elaboración de alimentos y productos de panadería

[0193] La presente invención se refiere también a una «composición alimenticia», incluyendo, sin carácter limitativo, un producto alimenticio, de alimentación animal y/o aditivos alimentarios, que comprende una amilasa, y métodos para preparar dicha composición alimenticia que comprende mezclar una variante de amilasa con uno o más ingredientes alimentarios, o los usos de la misma.

[0194] Asimismo, la presente invención se refiere al uso de una amilasa en la preparación de una composición alimenticia, donde la composición alimenticia se hornea con posterioridad a la incorporación del polipéptido de la invención. Según se utiliza en el presente documento, el término «composición de panadería» hace referencia a cualquier composición y/o aditivo preparado en el proceso de proporción de un producto alimenticio de panadería, que incluye, sin carácter limitativo, harina de panadería, una masa, un aditivo de panificación y/o un producto horneado. La composición alimenticia o el aditivo puede tener forma líquida o sólida.

[0195] Según se utiliza en el presente documento, el término «harina» hace referencia a los granos de cereal molidos o triturados. El término «harina» también hace referencia a productos de sagú o de tubérculos que han sido molidos o triturados. En algunas formas de realización, la harina puede contener también componentes, además de la materia vegetal o el cereal molido/a o aplastado/a. Un ejemplo de un componente adicional, aunque no se pretende que posea carácter limitativo, es un agente leudante. Los granos de cereales incluyen trigo, avena, centeno y cebada. Los productos de tubérculos incluyen harina de tapioca, harina de mandioca y polvo de natillas. El término «harina» incluye también harina de maíz molido, sémola de maíz, harina de arroz, harina integral, harina con levadura, harina de tapioca, harina de mandioca, arroz molido, harina enriquecida y polvo de natillas.

[0196] En el caso de la harina para elaborar productos de panadería y alimenticios para su uso comercial y doméstico, es importante mantener un nivel apropiado de actividad de α -amilasa en la harina. Un nivel de actividad demasiado elevado puede resultar en un producto pegajoso y/o pastoso y que, por lo tanto, no se puede comercializar. La harina con una actividad de α -amilasa insuficiente puede no contener la cantidad de azúcar suficiente para el funcionamiento adecuado de la levadura, derivando en un pan o productos de panadería secos y quebradizos. Por consiguiente, una amilasa, en sí misma o en combinación con otra(s) α -amilasa(s), se puede(n) añadir a la harina para aumentar el nivel de actividad de α -amilasa endógena en la harina.

[0197] Puede añadirse además una sola amilasa o en una combinación con otras amilasas para impedir o retrasar el endurecimiento del pan, esto es, el hecho de que las migas de productos de panadería se vuelvan firmes. Normalmente, la cantidad de amilasa antiendurecimiento estará comprendida en el intervalo de 0,01-10 mg de proteína enzimática por kg de harina, p. ej., 0,5 mg/kg ds. Entre las amilasas antiendurecimiento adicionales que se pueden utilizar junto con una amilasa se incluye una endoamilasa, p. ej., una endoamilasa bacteriana de *Bacillus*. La amilasa adicional puede ser otra α -amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133), p. ej., de *Bacillus*. NOVAMYL® es un ejemplo de α -amilasa maltogénica de la cepa NCIB 11837 de *B. stearothermophilus*, y se describe en Christophersen *et al.* (1997) *Starch* 50: 39-45. Entre otros ejemplos de endoamilasas antiendurecimiento se incluyen α -amilasas bacterianas derivadas de *Bacillus*, como *B. licheniformis* o *B. amyloliquefaciens*. La amilasa antiendurecimiento puede ser una exoamilasa, como una β -amilasa, p. ej., de origen vegetal, como de soja, o de origen microbiano, como de *Bacillus*.

[0198] La composición de panadería que comprende una amilasa puede comprender además una fosfolipasa o una enzima con actividad de fosfolipasa. Una enzima con actividad de fosfolipasa presenta una actividad que se puede medir en unidades de lipasa (LU). La fosfolipasa puede presentar actividad A1 o A2 para eliminar ácidos grasos de los fosfolípidos, formando un lisofosfolípido. Puede presentar o no actividad de lipasa, es decir, actividad en sustratos triglicéridos. Normalmente, la fosfolipasa presenta una temperatura óptima que oscila entre 30 y 90 °C, p. ej., 30-70 °C. Las fosfolipasas añadidas pueden ser de origen animal; por ejemplo, del páncreas, como páncreas de vaca o de cerdo, o del veneno de serpiente o de abeja. De forma alternativa, la fosfolipasa puede ser, por ejemplo, de origen microbiano, p. ej., de hongos filamentosos, levaduras o bacterias.

[0199] La fosfolipasa se añade en una cantidad que mejora la ternura del pan durante el período inicial tras el horneado, especialmente las primeras 24 horas. Normalmente, la cantidad de fosfolipasa estará comprendida en el intervalo de 0,01-10 mg de proteína enzimática por kg de harina, p. ej., 0,1-5 mg/kg. Es decir, la actividad de fosfolipasa estará comprendida generalmente en el intervalo de 20-1000 LU/kg de harina, donde una unidad de lipasa se define como la cantidad de enzima que se necesita para liberar 1 μ mol de ácido butírico por minuto a 30 °C, en pH 7,0, con goma arábica como emulsionante y tributirina como sustrato.

[0200] Por lo general, las composiciones de masa comprenden sémola de trigo o harina de trigo y/u otros tipos de sémola, harina o almidón, como harina de maíz, maicena, sémola de centeno, harina de centeno, harina de avena, copos de avena, harina de soja, sémola de sorgo, harina de sorgo, sémola de patata, harina de patata o fécula de patata. La masa puede ser fresca, congelada o precocida. La masa puede ser una masa leudada o una masa que se haya sometido a fermentación. La masa puede leudar de diversas formas, como mediante la adición de agentes leudantes químicos, p. ej., bicarbonato de sodio, o mediante la adición de un agente leudante, esto es, una masa de fermentación. La masa también puede leudar mediante la incorporación de un cultivo de

levadura adecuado, como un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería), p. ej., una cepa comercializada de *S. cerevisiae*.

5 **[0201]** La masa puede comprender también otros ingredientes habituales para masas, como proteínas, p. ej. leche en polvo, gluten y soja; huevos (p. ej., huevos enteros, yemas de huevo o claras de huevo); un oxidante, como ácido ascórbico, bromato de potasio, yodato de potasio, azodicarbonamida (ADA) o persulfato de amonio; un aminoácido como L-cisteína; un azúcar; o una sal, como cloruro de sodio, acetato de calcio, sulfato de sodio o sulfato de calcio. La masa puede comprender además grasa, p. ej., triglicéridos, como grasa granulada o grasa alimentaria. Asimismo, la masa puede comprender un emulsionante, como mono- o diglicéridos, ésteres de ácido tartárico de mono- o diglicéridos, ésteres de azúcar de ácidos grasos, ésteres de poliglicerol de ácidos grasos, 10 ésteres de ácido láctico de monoglicéridos, ésteres de ácido acético de monoglicéridos, estearatos de polioxiétileno, o lisolecitina. En concreto, la masa puede elaborarse sin la incorporación de emulsionantes.

15 **[0202]** El producto de masa puede ser cualquier producto de masa procesado, incluyendo masas fritas, fritas en abundante aceite, asadas, horneadas, cocidas y cocidas al vapor, como pan y pasteles de arroz cocidos al vapor. En una forma de realización, el producto alimenticio es un producto de panadería. Entre los productos típicos de panadería (horneados) se incluyen pan (como hogazas, panecillos, bollos, *bagels*, bases de pizza, etc.), pastas, *pretzels*, tortillas, pasteles, galletas, bizcochos, galletas saladas, etc.

20 **[0203]** De forma opcional, se puede utilizar una enzima adicional junto con la amilasa antiendurecimiento y la fosfolipasa. La enzima adicional puede ser una segunda amilasa, como una amiloglucosidasa, una β -amilasa, una ciclodextrina gluco transferasa, o la enzima adicional puede ser una peptidasa, en concreto una exopeptidasa, una transglutaminasa, una lipasa, una celulasa, una xilanasa, una proteasa, una proteína disulfuro-isomerasa, p. ej., una proteína disulfuro-isomerasa según se da a conocer en el documento WO 95/00636, por ejemplo, una glucosiltransferasa, una enzima ramificante (enzima ramificante 1,4- α -glucano), una 4- α -gluco transferasa (dextrina glucosiltransferasa) o una oxidorreductasa, p. ej., una peroxidasa, una lacasa, una glucosa oxidasa, una amadoriasa, una metaloproteinasas, una piranosas oxidasa, una lipooxygenasa, una L-aminoácido oxidasa o una carbohidrato oxidasa. La(s) enzima(s) adicional(es) puede(n) ser de cualquier origen, 25 incluyendo vegetales y mamíferos, y especialmente de origen microbiano (bacterias, levaduras u hongos), y se puede(n) obtener mediante técnicas habitualmente utilizadas en la técnica.

30 **[0204]** Normalmente, la xilanasa es de origen microbiano, p. ej., derivada de una bacteria o de un hongo, como una cepa de *Aspergillus*. Entre las xilanas se incluyen PENTOPAN® y NOVOZYM 384®, por ejemplo, que son preparaciones de xilanasa comercializadas y producidas a partir de *Trichoderma reesei*. La amiloglucosidasa puede ser una amiloglucosidasa de *A. niger* (como AMG®). Entre otros productos de amilasa útiles se incluyen GRINDAMYL® A 1000 o A 5000 (Grindsted Products, Dinamarca) y AMYLASE H™ o AMYLASE P™ (DSM). La glucosa oxidasa puede ser una glucosa oxidasa fúngica, en concreto, una glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (como GLUZYME®). Un ejemplo de proteasa es NEUTRASE®.

35 **[0205]** El proceso puede emplearse para cualquier tipo de producto horneado preparado a base de masa, de naturaleza blanda o crujiente, ya sea de tipo blanco, ligero o negro. Entre los ejemplos se incluyen pan, especialmente blanco, integral o de centeno, normalmente en forma de hogazas o panecillos, como, entre otros, pan de tipo *baguete*, pan pita, tortillas, pasteles, tortitas, bizcochos, galletas, bases de tarta, tostas, pan al vapor, pizza y similares.

40 **[0206]** Se puede utilizar una amilasa en una premezcla, comprendiendo harina junto con una amilasa antiendurecimiento, una fosfolipasa, y/o un fosfolípido. La premezcla puede contener otros aditivos mejoradores para masa y/o aditivos mejoradores para pan, p. ej., cualquiera de los aditivos, incluyendo enzimas, mencionados anteriormente. Una amilasa puede ser un componente de una preparación de enzimas que comprende una amilasa antiendurecimiento y una fosfolipasa, para su uso como aditivo de panificación.

45 **[0207]** Opcionalmente, la preparación de enzimas se encuentra en forma de un granulado o un polvo aglomerado. La preparación puede presentar una estrecha distribución granulométrica, con más del 95 % (en peso) de las partículas en el intervalo de 25 a 500 μm . Los granulados y polvos aglomerados se pueden preparar mediante métodos convencionales, p. ej., pulverizando una amilasa en un portador en un granulador de lecho fluido. El portador puede constar de núcleos de partículas que presentan un tamaño adecuado de partículas. El portador puede ser soluble o insoluble, p. ej., una sal (como NaCl o sulfato de sodio), un azúcar (como sacarosa o lactosa), un polialcohol (como sorbitol), almidón, arroz, sémola de maíz o soja.

50 **[0208]** Las partículas envueltas, esto es, las partículas de α -amilasa, pueden comprender una amilasa. Para preparar partículas envueltas de α -amilasa, se pone en contacto la enzima con un lípido de calidad alimentaria en una cantidad suficiente como para suspender todas las partículas de α -amilasa. Los lípidos de calidad alimentaria, según se utilizan en el presente documento, pueden ser cualquier compuesto orgánico de origen natural que sea insoluble en agua, pero soluble en solventes orgánicos no polares como hidrocarburo o éter dietílico. Entre los lípidos de calidad alimentaria adecuados se incluyen, sin carácter limitativo, triglicéridos, ya sean en forma de grasas o aceites, saturados o insaturados. Entre los ejemplos de ácidos grasos y combinaciones de los mismos que conforman los triglicéridos saturados se incluyen, sin carácter limitativo, el 55 butírico, (derivado de grasa láctea), el palmítico (derivado de grasa animal y vegetal), y/o el esteárico (derivado

de grasa animal o vegetal). Entre los ejemplos de ácidos grasos y combinaciones de los mismos que conforman los triglicéridos insaturados se incluyen, sin carácter limitativo, el palmitoleico, (derivado de grasa animal y vegetal), el oleico (derivado de grasa animal y vegetal), el linoleico (derivado de aceites vegetales), y/o el linoléico (derivado de aceite de linaza). Otros lípidos de calidad alimentaria apropiados incluyen, sin carácter

5

limitativo, monoglicéridos y diglicéridos derivados de los triglicéridos descritos anteriormente, fosfolípidos y glucolípidos.

[0209] El lípido de calidad alimentaria, especialmente en forma líquida, se pone en contacto con una forma pulverizada de las partículas de α -amilasa, de tal manera que el material lipídico cubre al menos una porción de la superficie de al menos una mayoría, p. ej., un 100 % de las partículas de α -amilasa. Así, cada partícula de α -amilasa está envuelta individualmente en un lípido. Por ejemplo, la totalidad o la práctica totalidad de las partículas de α -amilasa se proporcionan con una película lipídica fina, continua y envolvente. Esto se puede lograr vertiendo en primer lugar una cantidad de lípido en un contenedor, y suspendiendo a continuación las partículas de α -amilasa, de forma que el lípido humedece profundamente la superficie de cada partícula de α -amilasa. Tras un breve período de agitación, se recuperan las partículas de α -amilasa envueltas, portando una cantidad considerable de los lípidos en sus superficies. El grosor del recubrimiento aplicado de esta forma en las partículas de α -amilasa se puede controlar mediante la selección del tipo de lípido utilizado y repitiendo la operación con el fin de formar una película más gruesa, cuando así se desee.

10

15

[0210] Se puede lograr el almacenamiento, la manipulación y la incorporación del vehículo de entrega cargado por medio de una mezcla envasada. La mezcla envasada puede comprender la α -amilasa envuelta. No obstante, la mezcla envasada puede contener además ingredientes adicionales según considere el fabricante o el panadero. Tras haberse incorporado la α -amilasa envuelta en la masa, el panadero prosigue con el proceso de producción normal de ese producto.

20

[0211] Las ventajas de envolver las partículas de α -amilasa son dobles. En primer lugar, el lípido de calidad alimentaria protege a la enzima frente a la desnaturalización térmica durante el proceso de horneado en el caso de aquellas enzimas que sean termolábiles. Por consiguiente, al mismo tiempo que se estabiliza y se protege la α -amilasa durante las etapas de leudado y horneado, se libera del recubrimiento protector en el producto final de panadería, donde hidroliza los enlaces glucosídicos en poliglucanos. El vehículo de entrega cargado proporciona también una liberación constante de la enzima activa en el producto de panadería. Es decir, tras el proceso de horneado, la α -amilasa activa se libera constantemente desde el recubrimiento protector a un ritmo que contrarresta, y por tanto reduce, los mecanismos de endurecimiento.

25

30

[0212] Por lo general, la cantidad de lípido aplicada en las partículas de α -amilasa puede variar desde un porcentaje bajo del peso total de la α -amilasa hasta varias veces ese peso, dependiendo de la naturaleza del lípido, la manera en que se aplica en las partículas de α -amilasa, la composición de la mezcla de la masa que va a tratarse, y de la gravedad de la operación de mezcla de masa implicada.

35

[0213] El vehículo de entrega cargado, esto es, la enzima envuelta en lípido, se añade a los ingredientes utilizados para preparar un producto de panadería en una cantidad efectiva para ampliar el tiempo de caducidad del producto de panadería. El panadero calcula la cantidad de α -amilasa envuelta, preparada según se ha expuesto anteriormente, que se necesitará para lograr el efecto antiendurecimiento deseado. La cantidad que se necesita de α -amilasa envuelta se calcula basándose en la concentración de enzima envuelta y en la proporción de α -amilasa con respecto a harina especificada. Se ha descubierto que existe una amplia gama de concentraciones efectivas, pero, como se ha expuesto, las mejoras perceptibles antiendurecimiento no se corresponden de forma lineal con la concentración de α -amilasa, aunque, por encima de ciertos niveles mínimos, unos grandes incrementos de la concentración de α -amilasa producen una pequeña mejora adicional. La concentración de α -amilasa que se utiliza realmente en una producción de panadería concreta podría ser mucho más elevada que la mínima necesaria para proporcionar al panadero alguna garantía frente a errores involuntarios de medición a la baja por parte del panadero. El límite inferior de concentración de enzimas se determina mediante el efecto antiendurecimiento mínimo que quiere lograr el panadero.

40

45

[0214] Un método de preparación de un producto de panadería puede comprender: a) preparar partículas de α -amilasa recubiertas de lípido, donde prácticamente todas las partículas de α -amilasa están recubiertas; b) mezclar una masa que contiene harina; c) añadir la α -amilasa recubierta de lípido a la masa antes de que se complete la mezcla, y terminar de mezclar antes de que se elimine el recubrimiento lipídico de la α -amilasa; d) leudar la masa; y e) hornear la masa para proporcionar el producto de panadería, donde la α -amilasa es inactiva durante las etapas de mezclado, leudado y horneado y es activa en el producto de panadería.

50

[0215] La α -amilasa envuelta se puede añadir a la masa durante el ciclo de mezcla, p. ej, cerca del final del ciclo de mezcla. La α -amilasa envuelta se añade en un momento de la etapa de mezclado que permite la suficiente distribución de la α -amilasa envuelta por toda la masa; no obstante, la etapa de mezclado se termina antes de que el recubrimiento protector quede desprovisto de la(s) partícula(s) de α -amilasa. Dependiendo del tipo y del volumen de la masa, y del funcionamiento y velocidad del mezclador, se podrían necesitar entre uno y seis minutos o más para mezclar la α -amilasa envuelta con la masa, aunque la media es de dos a cuatro minutos. De este modo, diversas variables pueden determinar el procedimiento concreto. En primer lugar, la cantidad de α -

55

60

amilasa envuelta debería presentar un volumen total suficiente como para permitir que se reparta la α -amilasa envuelta por toda la mezcla de masa. Si la preparación de α -amilasa envuelta está muy concentrada, puede ser necesario añadir aceite adicional a la premezcla con anterioridad a la incorporación de la α -amilasa envuelta en la masa. Las recetas y los procesos de producción pueden requerir modificaciones concretas; no obstante, se pueden lograr buenos resultados cuando el 25 % del aceite especificado en una fórmula de masa de pan se mantiene fuera de la masa y se utiliza como portador para una α -amilasa envuelta concentrada si se añade cerca del final del ciclo de mezcla. En el caso del pan y otros productos de panadería, especialmente aquellos que poseen un bajo contenido de grasa, p. ej., panes de estilo francés, una mezcla de α -amilasa envuelta de aproximadamente un 1 % del peso seco de la harina es suficiente para mezclar adecuadamente la α -amilasa envuelta con la masa. El intervalo de porcentajes adecuados es amplio y depende de la fórmula, del producto acabado y de los requisitos de la metodología de producción del panadero concreto. En segundo lugar, la suspensión de α -amilasa envuelta debería añadirse a la masa con el tiempo suficiente como para que se mezcle por completo en la masa, pero no durante tanto tiempo como para que el exceso de acción mecánica raspe el recubrimiento lipídico protector de las partículas de α -amilasa envueltas.

[0216] En otro aspecto de la invención, la composición alimenticia es una composición de aceite, carne o grasa que comprende una amilasa. En este contexto, el término «composición de [aceite/carne/grasa]» se refiere a cualquier composición, que esté basada, formada y/o que contenga aceite o carne o grasa, respectivamente. Otro aspecto de la invención está relacionado con un método para preparar una composición de aceite o carne o grasa y/o un aditivo que comprenda una amilasa, que comprende mezclar el polipéptido de la invención con una composición de aceite/carne/grasa y/o ingredientes aditivos.

[0217] En otro aspecto de la invención, la composición alimenticia es una composición de alimento para animales, un aditivo de alimento para animales y/o alimento para mascotas que comprende una amilasa y variantes de la misma. La presente invención se refiere además a un método para preparar dicha composición de alimento para animales, composición de aditivo de alimento para animales, y/o alimento para mascotas que comprende mezclar una amilasa y variantes de la misma con uno o más ingredientes de alimento para animales y/o ingredientes de aditivos de alimento para animales y/o ingredientes de alimento para mascotas. Asimismo, la presente invención se refiere al uso de una amilasa en la preparación de una composición de alimento para animales y/o una composición de aditivo de alimento para animales y/o alimento para mascotas.

[0218] El término «animal» incluye todo animal rumiante o no rumiante. En una forma de realización particular, el animal es un animal no rumiante, como un caballo y un animal monogástrico. Entre los ejemplos de animales monogástricos se incluyen, sin carácter limitativo, cerdos, como lechones, cerdos en crecimiento, cerdas; aves, como pavos, patos, pollos, pollos de engorde, gallinas ponedoras; peces, como salmón, trucha, tilapia, siluros y carpas; y crustáceos, como gambas y camarones. En otra forma de realización, el animal es un animal rumiante, incluyendo, sin carácter limitativo, bovinos, terneros jóvenes, cabras, ovejas, jirafas, bisontes, alces, uapitíes, yaks, búfalos de agua, ciervos, camellos, alpacas, llamas, antílopes, antílopes americanos y nilgós.

[0219] En el presente contexto, se pretende que el término «alimento para mascotas» haga referencia a un alimento para un animal doméstico como, sin carácter limitativo, perros, gatos, jerbos, hámsteres, chinchillas, ratas de compañía, cobayas; mascotas aves, como canarios, periquitos y loros; mascotas reptiles, como tortugas, lagartos y serpientes; y mascotas acuáticas, como peces tropicales y ranas.

[0220] Los términos «composición de alimento para animales», «piensos» y «forraje» se utilizan indistintamente y pueden comprender una o más materias de alimentación seleccionadas del grupo que comprende a) cereales, como granos pequeños (p. ej., trigo, cebada, centeno, avena y combinaciones de los mismos) y/o granos grandes como maíz o sorgo; b) productos derivados de cereales, como harina de gluten de maíz, granos secos de destilería con solubles (DDGS) (especialmente granos secos de destilería con solubles basados en maíz (cDDGS), salvado de trigo, harinillas de trigo, harina baja de trigo, salvado de arroz, cascarilla de arroz, cascarilla de avena, almendra de palma y pulpa de cítrico; c) proteína obtenida a partir de fuentes como soja, girasol, cacahuete, altramuza, guisantes, habas, algodón, colza, harina de pescado, proteína plasmática seca, harina de huesos y carne, proteína de patata, suero de leche, copra, sésamo; d) aceites y grasas obtenidas a partir de fuentes vegetales y animales; e) minerales y vitaminas.

6. Composiciones y uso de desencolado textil

[0221] Asimismo, se contemplan composiciones y métodos para tratar tejidos (p. ej., para desencolar un tejido) utilizando una amilasa. En la técnica se conocen métodos de tratamiento de tejidos (véase, p. ej., documento de patente americana N.º 6,077,316). Por ejemplo, se puede mejorar el tacto y la apariencia de un tejido mediante un método que comprende poner en contacto el tejido con una amilasa en una solución. El tejido se puede tratar con la solución bajo presión.

[0222] Se puede aplicar una amilasa durante o tras la fabricación de un tejido, o durante la etapa de desencolado, o una o más etapas adicionales de tratamiento textil. Durante la fabricación textil, los hilos se exponen a una tensión mecánica considerable. Previamente a la fabricación en telares mecánicos, a menudo se recubren hilos de urdimbre con almidón para encolado o derivados de almidón para aumentar su fuerza tensil y para impedir su rotura. Se puede aplicar una amilasa durante o tras la fabricación para eliminar este almidón de

encolado o derivados de almidón. Tras la fabricación, se puede utilizar una amilasa para eliminar la capa de encolado antes del tratamiento posterior del tejido para asegurar un resultado homogéneo y resistente al lavado.

[0223] Se puede utilizar una única amilasa o en combinación con otros reactivos químicos de desencolado y/o enzimas de desencolado para desencolar tejidos, incluidos tejidos que contengan algodón, como aditivos de detergente, p. ej., en composiciones acuosas. También se puede utilizar una amilasa en composiciones y métodos para producir un aspecto de lavado a la piedra en un tejido y prendas vaqueras con tinte azul. Para la fabricación de ropa, el tejido puede cortarse y coserse en ropa o prendas, que se acaban a continuación. En concreto, en el caso de la fabricación de pantalones vaqueros, se han desarrollado distintos métodos de acabado enzimático. El acabado de las prendas vaqueras comienza normalmente con una etapa de desencolado enzimático, durante la cual se someten las prendas a la acción de enzimas amilolíticas para proporcionar suavidad al tejido y para provocar que el algodón sea más accesible para las posteriores etapas de acabado enzimático. Se puede utilizar una amilasa en métodos de acabado para prendas vaqueras (p. ej., un «proceso de lavado biológico o *biostoning*»), desencolado enzimático y aporte de suavidad al tejido, y/o proceso de acabado.

7. Composiciones de limpieza

[0224] Un aspecto de las presentes composiciones y métodos es una composición de limpieza que incluye una amilasa como un componente. Se puede utilizar un polipéptido de amilasa como un componente en composiciones de detergentes para, p. ej., lavado manual, lavado de ropa, lavado de vajillas, y limpieza de superficies duras. Tales composiciones incluyen composiciones de detergente para ropa líquidas de alta resistencia (HDL, por sus siglas en inglés), secos de alta resistencia (HDD) y manuales, incluyendo composiciones de detergente para ropa en formato monodosis, y composiciones de lavavajillas automático (ADW) y manual (a mano), incluyendo composiciones de lavavajillas en formato monodosis.

7.1. Resumen

[0225] Preferentemente, se incorpora una amilasa en detergentes en una concentración de o cercana a una concentración utilizada habitualmente en el caso de amilasa en detergentes. Por ejemplo, se puede añadir un polipéptido de amilasa en una cantidad correspondiente a 0,00001 - 1 mg (calculada como proteína enzimática pura) de amilasa por litro de solución de lavado/lavavajillas. En el presente documento se proporcionan ejemplos de formulaciones, como se expone por ejemplo a continuación:

[0226] Un polipéptido de amilasa puede ser un componente de una composición de detergente, como única enzima o junto con otras enzimas, incluidas otras enzimas amilolíticas. Como tales, se pueden incluir en la composición de detergente en forma de un granulado no pulverulento, un líquido estabilizado, o una enzima protegida. Se pueden producir granulados no pulverulentos, por ejemplo, según se da a conocer en los documentos de patente americana n.ºs 4,106,991 y 4,661,452, y opcionalmente pueden estar recubiertos mediante métodos que se conocen en la técnica. Entre los ejemplos de materiales de recubrimiento ceroso se incluyen productos de poli(óxido de etileno) (polietilenglicol, PEG) con pesos molares medios de 1.000 a 20.000; nonilfenoles etoxilados que presentan de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados, en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en los que hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos de ácidos grasos. En el documento GB 1483591, por ejemplo, se proporcionan ejemplos de materiales de recubrimiento que forman una película adecuada para aplicarse mediante técnicas de lecho fluido. Las preparaciones de enzimas líquidas pueden, por ejemplo, estabilizarse añadiendo un poliol como propilenglicol, un azúcar o un polialcohol, ácido láctico o ácido bórico de acuerdo con métodos establecidos. En la técnica se conocen otros estabilizadores enzimáticos. Se pueden preparar enzimas protegidas de acuerdo con el método que se da a conocer por ejemplo en el documento EP 238 216. Los polioles se reconocen desde hace mucho tiempo como estabilizadores de proteínas, así como mejoradores de la solubilidad de proteínas.

[0227] La composición de detergente puede presentar cualquier forma útil, p. ej., polvos, gránulos, pastas, barras o líquido. Un detergente líquido puede ser acuoso, conteniendo normalmente hasta aproximadamente un 70 % de agua y desde un 0 % hasta aproximadamente un 30 % de solvente orgánico. También puede presentar la forma de un tipo de gel compacto que únicamente contiene aproximadamente un 30 % de agua.

[0228] La composición de detergente comprende uno o más tensioactivos, cada uno de los cuales puede ser aniónico, no iónico, catiónico o zwitteriónico. El detergente contendrá normalmente de un 0 % a aproximadamente un 50 % de tensioactivo aniónico, como sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS); α -olefinsulfonato (AOS); sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso) (AS); etoxisulfato de alcohol (AEOS o AES); alcanosulfonatos secundarios (SAS); ésteres metílicos de ácido graso α -sulfo; ácido alquilsuccínico o alquensuccínico; o jabón. La composición puede contener también de un 0 % a aproximadamente un 40 % de tensioactivo no iónico como etoxilato de alcohol (AEO o AE), etoxilatos de alcohol carboxilado, etoxilato de nonilfenol, alquilpoliglucósido, óxido de alquil dimetil amina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, o polihidroxi alquil amida de ácido graso (según se describe, por ejemplo, en el documento WO 92/06154).

[0229] La composición de detergente puede comprender adicionalmente una o más de otras enzimas, como proteasas, otra enzima amilolítica, cutinasa, lipasa, celulasa, pectato liasa, perhidrolasa, xilanas, peroxidasa, y/o lacasa en cualquier combinación.

5 **[0230]** El detergente puede contener desde aproximadamente un 1 % hasta aproximadamente un 65 % de un mejorador de detergente o de un agente complejante como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, citrato, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTMPA), ácido alquilsuccínico o alqueni succínico, silicatos solubles o silicatos estratificados (p. ej., SKS-6 de Hoechst). El detergente también puede ser no mejorado, es decir, básicamente sin presentar mejorador de detergente. Las enzimas se pueden utilizar en cualquier composición compatible con la estabilidad de la enzima. Por lo general, las enzimas se pueden proteger frente a componentes perjudiciales por medio de formas de encapsulación conocidas, por ejemplo, mediante granulación o secuestro en hidrogeles. Se pueden utilizar enzimas, y específicamente amilasas, ya sean con o sin dominios de unión al almidón, en varias composiciones que incluyen aplicaciones de lavado de ropa y de lavavajillas, limpiadores de superficies, así como en composiciones para la producción de etanol a partir de almidón o biomasa.

15 **[0231]** El detergente puede comprender uno o más polímeros. Entre los ejemplos se incluyen carboximetilcelulosa (CMC), poli(vinilpirrolidona) (PVP), polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilatos como poliacrilatos, copolímeros de ácido maleico/acrílico y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.

20 **[0232]** El detergente puede contener un sistema de blanqueo, que puede comprender una fuente de H₂O₂ como perborato o percarbonato, que puede combinarse con un activador de blanqueo que forma perácido, como tetraacetilendiamina (TAED) o nonanoiloxibencenosulfonato (NOBS). De forma alternativa, el sistema de blanqueo puede comprender peroxiácidos (p. ej., peroxiácidos de tipo amida, imida o sulfona). El sistema de blanqueo puede ser también un sistema de blanqueo enzimático, por ejemplo, perhidrolasa, como el que se describe en la solicitud internacional PCT WO 2005/056783.

25 **[0233]** Las enzimas de la composición de detergente pueden estabilizarse utilizando agentes estabilizadores convencionales, p. ej., un poliol como propilenglicol o glicerol; un azúcar o polialcohol; ácido láctico; ácido bórico o un derivado de ácido bórico como, por ejemplo, un éster de borato aromático; y la composición puede estar formulada según se describe, p. ej., en WO 92/19709 y WO 92/19708.

30 **[0234]** El detergente puede contener también otros ingredientes habituales de detergente como, p. ej., suavizantes de tejidos, incluidas arcillas, potenciadores de espuma, supresores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes de suspensión de suciedad, agentes de redeposición antisuciedad, tintes, bactericidas, inhibidores de decoloración, blanqueadores ópticos o perfumes.

[0235] Normalmente, el pH (medido en solución acuosa en concentración de uso) es neutro o alcalino, p. ej., pH de aproximadamente 7,0 hasta aproximadamente 11,0.

35 **[0236]** Más adelante, se describen formas concretas de composiciones de detergente para la incorporación de la presente α -amilasa. Muchas de estas composiciones se pueden proporcionar en formato monodosis para facilitar su uso. Se describen formulaciones y envases monodosis, por ejemplo, en los documentos US20090209445A1, US20100081598A1, US7001878B2, EP1504994B1, WO2001085888A2, WO2003089562A1, WO2009098659A1, WO2009098660A1, WO2009112992A1, WO2009124160A1, WO2009152031A1, WO2010059483A1, 40 WO2010088112A1, WO2010090915A1, WO2010135238A1, WO2011094687A1, WO2011094690A1, WO2011127102A1, WO2011163428A1, WO2008000567A1, WO2006045391A1, WO2006007911A1, WO2012027404A1, EP1740690B1, WO2012059336A1, US6730646B1, WO2008087426A1, WO2010116139A1, y WO2012104613A1.

7.2. Composición de detergente para ropa líquido de alta resistencia (HDL)

45 **[0237]** Entre los ejemplos de composiciones de detergente para ropa HDL se incluye un tensioactivo detergente (10 % - 40 % p/p), incluidos un tensioactivo detergente aniónico (seleccionado de entre un grupo de cadena lineal o ramificada o aleatoria, sulfatos de alquilo sustituidos o no sustituidos, sulfonatos de alquilo, sulfato de alquilo alcoxilado, fosfatos de alquilo, fosfonatos de alquilo, carboxilatos de alquilo, y/o mezclas de estos), y opcionalmente un tensioactivo no iónico (seleccionado de un grupo de cadena lineal o ramificada o aleatoria, alcohol alcoxilado de alquilo sustituido o no sustituido, por ejemplo un alcohol etoxilado de alquilo C8-C18 y/o alcoxilatos de alquilfenol C6-C12), donde la relación de peso entre tensioactivo detergente aniónico (con un índice hidrofílico (Hlc) de entre 6,0 y 9) y tensioactivo detergente no iónico es mayor de 1:1. Entre los tensioactivos 50 detergentes adecuados se incluyen también tensioactivos detergentes catiónicos (seleccionados de un grupo de compuestos de alquilpiridinio, compuestos cuaternarios de alquilamonio, compuestos cuaternarios de alquilfosfonio, compuestos ternarios de alquilsulfonio, y/o mezclas de estos); tensioactivos detergentes zwitteriónicos y/o anfóteros (seleccionados de un grupo de sulfobetaínas de alcanolamina); tensioactivos anfólicos; tensioactivos semipolares no iónicos y mezclas de estos.

[0238] Opcionalmente, la composición puede incluir un polímero potenciador de la tensioactividad que consiste en polímeros desengrasantes alcoxilados anfífilos (seleccionados de un grupo de polímeros alcoxilados que presentan propiedades hidrofílicas e hidrofóbicas ramificadas, como polialquileniminas alcoxiladas en el intervalo de 0,05 % en peso - 10 % en peso) y/o polímeros de injerto aleatorio (que normalmente comprenden un esqueleto hidrofílico que comprende monómeros seleccionados del grupo que consiste en: ácidos carboxílicos insaturados C1-C6, éteres, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, unidades de azúcar, unidades alcoxi, anhídrido maleico, polialcoholes saturados como glicerol, y mezclas de los mismos; y cadena(s) lateral(es) hidrofóbica(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en: grupo alquilo C4-C25, polipropileno, polibutileno, éster de vinilo de un ácido monocarboxílico C1-C6 saturado, éster alquilo C1-C6 de ácido acrílico o metacrílico, y mezclas de estos.

[0239] La composición puede incluir polímeros adicionales, como polímeros de liberación de suciedad (incluidos poliésteres con extremos protegidos aniómicamente, por ejemplo SRP1, polímeros que comprenden al menos una unidad de monómero seleccionado de entre sacárido, ácido dicarboxílico, poliol y combinaciones de estos, en configuración aleatoria o en bloque, polímeros a base de tereftalato de etileno y copolímeros de los mismos en una configuración aleatoria o en bloque, por ejemplo Repel-o-tex SF, SF-2 y SRP6, Texcare SRA100, SRA300, SRN100, SRN170, SRN240, SRN300 y SRN325, Marloquest SL), polímeros de antirredeposición (0,1 % en peso a 10 % en peso, incluidos polímeros de carboxilato, tales como polímeros que comprenden al menos un monómero seleccionado de entre ácido acrílico, ácido maleico (o anhídrido maleico), ácido fumárico, ácido itacónico, ácido aconítico, ácido mesacónico, ácido citracónico, ácido metilmalónico, y cualquier mezcla de los mismos, homopolímero de vinilpirrolidona, y/o polietilenglicol, peso molecular en el intervalo de 500 a 100.000 Da); polímero celulósico (incluidos aquellos seleccionados de entre alquilcelulosa, alquil alcoxialquilcelulosa, carboxialquil celulosa, alquil carboxialquilcelulosa, ejemplos de los cuales incluyen carboximetilcelulosa, metilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, metilcarboximetilcelulosa, y mezclas de los mismos) y carboxilato polimérico (como copolímero aleatorio de maleato/acrilato u homopolímero de poliácrilato).

[0240] La composición puede incluir además ácido graso saturado o insaturado, preferentemente ácido graso C12-C24 saturado o insaturado (0 % en peso a 10 % en peso); auxiliares de deposición (ejemplos de las cuales incluyen polisacáridos, preferentemente polímeros celulósicos, haluros de poli dialil dimetil amonio (DADMAC), y copolímeros de DAD MAC con vinilpirrolidona, acrilamidas, imidazoles, haluros de imidazolinio, y mezclas de los mismos, en configuración aleatoria o en bloque, goma guar catiónica, celulosa catiónica tal como hidroxietilcelulosa catiónica, almidón catiónico, poliácridamidas catiónicas, y mezclas de estos.

[0241] La composición puede incluir además agentes inhibidores de transferencia de tintes, entre los ejemplos de los cuales se incluye ftalocianina de manganeso, peroxidasas, polímeros de polivinilpirrolidona, polímeros N-óxidos de poliamina, copolímeros de N-vinilpirrolidona y N-vinilimidazol, poliviniloxazolidonas y polivinilimidazoles y/o mezclas de estos; agentes quelantes, entre los ejemplos de los cuales se incluye ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentametilfosfónico (DTPMP), ácido hidroxietano difosfónico (HEDP), ácido etilendiamino N,N'-disuccínico (EDDS), ácido metilglicindiacético (MGDA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido propilendiaminotetraacético (PDT A), 2-hidroxipiridina-N-óxido (HPNO), o ácido metilglicindiacético (MGDA), ácido glutámico N,N-ácido diacético (sal tetrasódica de ácido glutámico N,N-dicarboximetil (GLDA), ácido nitrilotriacético (NTA), ácido 4,5-dihidroxi-m-bencenosulfónico, ácido cítrico y cualesquiera sales de los mismos, ácido N-hidroxietilendiaminotriacético (HEDTA), ácido trietilentetraminohexaacético (TTHA), ácido N-hidroxietiliminodiacético (HEIDA), dihidroxietilglicina (DHEG), ácido etilendiaminotetrapropiónico (EDTP), y derivados de los mismos.

[0242] Preferentemente, la composición incluía enzimas (en general, de aproximadamente 0,01 % en peso de enzima activa a 0,03 % en peso de enzima activa), seleccionadas de entre proteasas, amilasas, lipasas, celulasas, colina oxidasas, peroxidasas/oxidasas, pectato liasas, mananasas, cutinasas, lacasas, fosfolipasas, lisofosfolipasas, aciltransferasas, perhidrolasas, arilesterasas, y cualquier mezcla de estas. La composición puede incluir un estabilizador de enzimas (entre los ejemplos de los cuales se incluyen polioles como propilenglicol o glicerol, azúcar o polialcohol, ácido áctico, inhibidor de la proteasa reversible, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, p. ej., un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenilborónico como ácido 4-formilfenil borónico).

[0243] Opcionalmente, la composición incluye supresores de espuma con base de silicona o de ácido graso; tintes matizadores, cationes de calcio y de magnesio, ingredientes de señalización visual, antiespumante (de 0,001 % en peso a aproximadamente 4,0 % en peso) y/o estructurante/espesante (de 0,01 % en peso a 5 % en peso, seleccionado del grupo que consiste en diglicéridos y triglicéridos, diestearato de etilenglicol, celulosa microcristalina, materiales a base de celulosa, celulosa microfibrilada, biopolímeros, goma xantana, goma gellan, y mezclas de los mismos).

[0244] La composición puede estar en cualquier forma líquida, por ejemplo, una forma de líquido o gel, o cualquier combinación de las mismas. La composición puede estar en cualquier formato monodosis, por ejemplo, una cápsula.

7.3. Composición de detergente para ropa seco/sólido de alta resistencia (HDD)

[0245] Entre los ejemplos de composiciones de detergente para ropa HDD se incluye un tensioactivo deteritivo, incluidos tensioactivos deteritivos aniónicos (p. ej., de cadena lineal o ramificada o aleatoria, sulfatos de alquilo sustituidos o no sustituidos, sulfonatos de alquilo, sulfato de alquilo alcoxilado, alquifosfatos, alquifosfonatos, alquilcarboxilatos y/o mezclas de los mismos), tensioactivo deteritivo no iónico (p. ej., de cadena lineal o ramificada o aleatoria, etoxilatos de alquilo C8-C18 sustituidos o no sustituidos, y/o alcoxilatos de alquilfenol C6-C12), tensioactivos deteritivos catiónicos (p. ej., compuestos de alquil piridinio, compuestos de alquilamonio cuaternario, compuestos de alquifosfonio cuaternario, compuestos de alquilsulfonio ternario, y mezclas de estos), tensioactivos deteritivos zwitteriónicos y/o anfóteros (p. ej., sulfobetainas de alcanolamina), tensioactivos anfóteros, tensioactivos semipolares no iónicos, y mezclas de estos; mejoradores, incluidos mejoradores sin fosfato (por ejemplo, mejoradores de zeolita, entre los que se incluyen zeolita A, zeolita X, zeolita P y zeolita MAP en el intervalo de 0 % en peso a menos del 10 % en peso), mejoradores de fosfato (por ejemplo, tripolifosfato de sodio en el intervalo de 0 % en peso a menos del 10 % en peso), ácido cítrico, sales de citrato y ácido nitrilotriacético, sal de silicato (p. ej., silicato de sodio o de potasio o metasilicato de sodio en el intervalo de 0 % en peso a menos del 10 % en peso, o silicato estratificado (SKS-6)); sal de carbonato (p. ej., carbonato de sodio y/o bicarbonato de sodio en el intervalo de 0 % en peso a menos del 80 % en peso); y agentes blanqueadores, incluidos fotoblanqueadores (p. ej., ftalocianinas de zinc sulfonadas, ftalocianinas de aluminio sulfonadas, tintes de xanteno, y mezclas de estos), activadores de blanqueo hidrofóbicos o hidrofílicos (p. ej., dodecanoil oxibenceno sulfonato, decanoil oxibenceno sulfonato, ácido decanoil oxibenzoico o sus sales, 3,5,5-trimetilhexano oxibenceno sulfonato, tetraacetiletilendiamina-TAED, nonanoiloxibenceno sulfonato-NOBS, quats de nitrilo, y mezclas de estos), fuentes de peróxido de hidrógeno (p. ej., sales de perhidrato inorgánicas, entre los ejemplos de las cuales se incluye sal de sodio monohidratada o tetrahidratada de perborato, percarbonato, persulfato, persulfato, o persilicato), perácidos preformados hidrofílicos y/o hidrofóbicos (p. ej., ácidos y sales percarboxílicas, ácidos y sales percarbónicas, ácidos y sales perimidicas, ácidos y sales peroximonosulfúricas, y mezclas de estos), y/o catalizadores blanqueantes (p. ej., potenciadores de blanqueo de imina (entre los ejemplos de los cuales se incluyen cationes y poliiones de iminio), zwitteriones de iminio, aminas modificadas, óxidos de amina modificados, N-sulfonyl iminas, N-fosfonyl iminas, N-acil iminas, dióxidos de tiadiazol, perfluoroiminas, cetonas de azúcar cíclico, y mezclas de estos, y catalizadores blanqueantes que contienen metal (p. ej., cationes de cobre, hierro, titanio, rutenio, wolframio, molibdeno o manganeso, así como cationes de metal auxiliares como de zinc o aluminio y un secuestrante como ácido etilendiaminotetraacético, ácido etilendiaminotetra(metilfosfónico), y sales solubles en agua de estos).

[0246] Preferentemente, la composición incluye enzimas, p. ej., proteasas, amilasas, lipasas, celulasas, colina oxidasas, peroxidases/oxidasas, pectato liasas, mananasas, cutinasas, lacasas, fosfolipasas, lisofosfolipasas, aciltransferasas, perhidrolasas, arilesterasas, y cualquier mezcla de estas.

[0247] Opcionalmente, la composición puede incluir ingredientes de detergente adicionales, incluidas microcápsulas de perfume, acorde de perfume de almidón encapsulado, agentes matificantes, polímeros adicionales, incluidos polímeros de integridad de los tejidos y catiónicos, ingredientes bloqueadores de tinte, agentes suavizantes, abrillantadores (por ejemplo, abrillantadores fluorescentes C.I.), agentes floculantes, agentes quelantes, poliaminas alcoxiladas, auxiliares de deposición de tejido, y/o ciclodextrina.

7.4. Composición de detergente lavavajillas automático (ADW)

[0248] Entre los ejemplos de composición de detergente ADW se incluyen tensioactivos no iónicos, incluidos tensioactivos etoxilados no iónicos, tensioactivos de alcohol alcoxilado, alcoholes poli(oxialquilados) cubiertos de epoxi, o tensioactivos de óxido de amina presentes en cantidades de 0 a 10 % en peso; mejoradores en el intervalo de 5-60 %, incluidos mejoradores de fosfato (p. ej., monofosfatos, difosfatos, tripolifosfatos, otros polifosfatos oligoméricos, tripolifosfato de sodio-STPP) y mejoradores sin fosfato (p. ej., compuestos a base de aminoácido, incluido ácido metilglicindiacético (MGDA) y sales y derivados de este, ácido glutámico-N,N-diacético (GLDA) y sales y derivados de este, ácido iminodisuccínico (IDS) y sales y derivados de este, carboximetilululina y sales y derivados de esta, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), ácido B-alaninodiacético (B-ADA) y sus sales, homopolímeros y copolímeros de ácidos policarboxílicos y sus sales parcial o completamente neutralizadas, ácidos policarboxílicos monoméricos y ácidos hidroxicarboxílicos y sus sales en el intervalo de 0,5 % a 50 % en peso; polímeros sulfonados/carboxilados en el intervalo de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 50 % en peso para proporcionar estabilidad dimensional; agentes de secado en el intervalo de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 10 % en peso (p. ej., poliésteres, especialmente poliésteres aniónicos, opcionalmente junto con otros monómeros con de 3 a 6 funcionalidades; normalmente, funcionalidades de ácido, alcohol o éster, que son propicios a la policondensación, compuestos o compuestos precursores de policarbonato-poliorganosiloxano, poliuretano-poliorganosiloxano y/o poliurea-poliorganosiloxano, de los mismos, especialmente del tipo urea y carbonato cíclico reactivo); silicatos en el intervalo de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 20 % en peso (incluidos silicatos de sodio o potasio, por ejemplo disilicato de sodio, metasilicato de sodio y filosilicatos cristalinos); blanqueador inorgánico (p. ej., sales de perhidrato, como sales de perborato, percarbonato, persulfato, persulfato y persilicato) y blanqueador orgánico (p. ej., peroxiácidos orgánicos, incluidos diacil y tetraacilperóxidos, especialmente ácido diperoxidodecanodioico, ácido diperoxitetradecanodioico, ácido diperoxihexadecanodioico); activadores de blanqueo (esto es, precursores orgánicos de perácido en el intervalo

de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 10 % en peso); catalizadores de blanqueo (p. ej., triazacilonano de manganeso y complejos relacionados, Co, Cu, Mn y Fe bispiridilamina y complejos relacionados, y acetato de pentamina de cobalto(III) y complejos relacionados); agentes de tratamiento de metal en el intervalo de aproximadamente un 0,1 % a un 5 % en peso (p. ej., benzotriazoles, sales y complejos metálicos, y/o silicatos); enzimas en el intervalo de aproximadamente 0,01 a 5,0 mg de enzima activa por gramo de composición de detergente lavavajillas automático (p. ej., proteasas, amilasas, lipasas, celulasas, colina oxidasas, peroxidasas/oxidasas, pectato liasas, mananasas, cutinasas, lacasas, fosfolipasas, lisofosfolipasas, aciltransferasa, perhidrolasa, arilesterasa, y mezclas de estas); y componentes estabilizadores de enzimas (p. ej., oligosacáridos, polisacáridos, y sales metálicas inorgánicas divalentes).

10 7.5. Composiciones de detergente adicionales

[0249] A continuación, en los párrafos numerados, se describen ejemplos adicionales de formulaciones de detergente a las que se puede añadir la presente amilasa.

1) Una composición de detergente formulada como un granulado que presenta una densidad aparente de al menos 600 g/l que comprende aproximadamente de un 7 % a aproximadamente un 12 % de sulfonato de alquilbenceno lineal (calculado como ácido); de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 4 % de etoxisulfato de alcohol (p. ej., alcohol C12-18, óxido de etileno 1-2 (EO)) o sulfato de alquilo (p. ej., C16-18); de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 9 % de etoxilato de alcohol (p. ej., alcohol C14-15, 7 EO); de aproximadamente un 14 % a aproximadamente un 20 % de carbonato de sodio (p. ej., Na_2CO_3); de aproximadamente un 2 a aproximadamente un 6 % de silicato soluble (p. ej., Na_2O , 2SiO_2); de aproximadamente un 15 % a aproximadamente un 22 % de zeolita (NaA1SiO_4); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 6 % de sulfato de sodio (p. ej., Na_2SO_4); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 15 % de citrato de sodio/ácido cítrico (p. ej., $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$); de aproximadamente un 11 % a aproximadamente un 18 % de perborato de sodio (p. ej., $\text{NaBO}_3\text{H}_2\text{O}$); de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 6 % de TAED; de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 2 % de carboximetilcelulosa (CMC); 0-3 % de polímeros (p. ej., copolímero de ácido maleico/acrílico, PVP, PEG); 0,0001-0,1 % de enzimas (calculadas como proteína enzimática pura); y 0-5 % de ingredientes minoritarios (p. ej., supresores de espuma, perfumes, abrillantador óptico, fotoblanqueador).

2) Una composición de detergente formulada como un granulado que presenta una densidad aparente de al menos 600 g/l que comprende aproximadamente de un 6 % a aproximadamente un 11 % de sulfonato de alquilbenceno lineal (calculado como ácido); de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 3 % de etoxisulfato de alcohol (p. ej., alcohol C12-18 1-2, EO) o sulfato de alquilo (p. ej., C16-18); de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 9 % de etoxilato de alcohol (p. ej., alcohol C14-15, 7 EO); de aproximadamente un 15 % a aproximadamente un 21 % de carbonato de sodio (p. ej., Na_2CO_3); de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 4 % de silicato soluble (p. ej., Na_2O , 2SiO_2); de aproximadamente un 24 % a aproximadamente un 34 % de zeolita (NaA1SiO_4); de aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 10 % de sulfato de sodio (p. ej., Na_2SO_4); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 15 % de citrato de sodio/ácido cítrico (p. ej., $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 2 % de carboximetilcelulosa (CMC); 1-6 % de polímeros (p. ej., copolímero de ácido maleico/acrílico, PVP, PEG); 0,0001-0,1 % de enzimas (calculadas como proteína enzimática pura); 0-5 % de ingredientes minoritarios (p. ej., supresores de espuma, perfume).

3) Una composición de detergente formulada como un granulado que presenta una densidad aparente de al menos 600 g/l que comprende aproximadamente de un 5% a aproximadamente un 9% de sulfonato de alquilbenceno lineal (calculado como ácido); de aproximadamente un 7 % a aproximadamente un 14 % de etoxilato de alcohol (p. ej., alcohol C12-15, 7 EO); de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 3 % de jabón como ácido graso (p. ej., ácido graso C16-22); de aproximadamente un 10% a aproximadamente un 17% de carbonato de sodio (como Na_2CO_3); de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 9 % de silicato soluble (p. ej., Na_2O , 2SiO_2); de aproximadamente un 23 % a aproximadamente un 33% de zeolita (NaA1SiO_4); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 4 % de sulfato de sodio (p. ej., Na_2SO_4); de aproximadamente un 8% a aproximadamente un 16 % de perborato de sodio (p. ej., $\text{NaBO}_3\text{H}_2\text{O}$); de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 8 % de TAED; de un 0 % a aproximadamente un 1 % de fosfonato (p. ej., EDTMPA); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 2 % de carboximetilcelulosa (CMC); 0-3 % de polímeros (p. ej., copolímero de ácido maleico/acrílico, PVP, PEG); 0,0001-0,1 % de enzimas (calculadas como proteína enzimática pura); y 0-5 % de ingredientes minoritarios (p. ej., supresores de espuma, perfume, abrillantador óptico).

4) Una composición de detergente formulada como un granulado que presenta una densidad aparente de al menos 600 g/l que comprende aproximadamente de un 8% a aproximadamente un 12 % de sulfonato de alquilbenceno lineal (calculado como ácido); de aproximadamente un 10% a aproximadamente un 25% de etoxilato de alcohol (p. ej., alcohol C12-15, 7 EO); de aproximadamente un 14 % a aproximadamente un 22% de carbonato de sodio (como Na_2CO_3); de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 % de silicato soluble (p. ej., Na_2O , 2SiO_2); de aproximadamente un 25% a aproximadamente un 35% de zeolita (NaA1SiO_4); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 10 % de sulfato de sodio (p. ej., Na_2SO_4); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 2 % de carboximetilcelulosa (CMC); 1-3 % de polímeros

(p. ej., copolímero de ácido maleico/acrílico, PVP, PEG); 0,0001-0,1 % de enzimas (calculadas como proteína enzimática pura); y 0-5 % de ingredientes minoritarios (p. ej., supresores de espuma, perfume).

5) Una composición acuosa de detergente líquido que comprende aproximadamente de un 15 % a aproximadamente un 21 % de sulfonato de alquilbenceno lineal (calculado como ácido); de aproximadamente un 12 % a aproximadamente un 18 % de etoxilato de alcohol (p. ej., alcohol C12-15, 7 EO o alcohol C12-15, 5 EO); de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 13 % de jabón como ácido graso (p. ej., ácido oleico); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 13 % de ácido alquenilsuccínico (C12-14); de aproximadamente un 8 % a aproximadamente un 18 % de etanolamina; de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 8 % de ácido cítrico; de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 3 % de fosfonato; de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 3 % de polímeros (p. ej., PVP, PEG); de un 0 % a aproximadamente un 2 % de borato (p. ej., B4O7); de aproximadamente un 8 % a aproximadamente un 14 % de propilenglicol; 0,0001-0,1 % de enzimas (calculadas como proteína enzimática pura); y 0-5 % de ingredientes minoritarios (p. ej., dispersantes, supresores de espuma, perfume, abrillantador óptico).

6) Una composición acuosa de detergente líquido estructurado que comprende de aproximadamente un 15 % a aproximadamente un 21 % de sulfonato de alquilbenceno lineal (calculado como ácido); 3-9 % de etoxilato de alcohol (p. ej., alcohol C12-15, 7 EO, o alcohol C12-15, 5 EO); de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 10 % de jabón como ácido graso (p. ej., ácido oleico); de aproximadamente un 14 % a aproximadamente un 22 % de zeolita (como NaA1SiO4); de aproximadamente un 9 % a aproximadamente un 18 % de citrato de potasio; de un 0 % a aproximadamente un 2 % de borato (p. ej., B4O7); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 2 % de carboximetilcelulosa (CMC); de un 0 % a aproximadamente un 3 % de polímeros (p. ej., PEG, PVP); de un 0 % a aproximadamente un 3 % de polímeros de anclaje como, p. ej., copolímero de lauril metacrilato/ácido acrílico; fracción molar 25:1, PM 3800; de un 0 % a aproximadamente un 5 % de glicerol; 0,0001-0,1 % de enzimas (calculadas como proteína enzimática pura); y 0-5 % de ingredientes minoritarios (p. ej., dispersantes, supresores de espuma, perfume, abrillantadores ópticos).

7) Una composición de detergente formulada como un granulado que presenta una densidad aparente de al menos 600 g/l que comprende aproximadamente de un 5 % a aproximadamente un 10 % de sulfato de alcohol graso; de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 9 % de monoetanolamida de ácido graso etoxilado; 0-3 % de jabón como ácido graso; de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 10 % de carbonato de sodio (como Na₂CO₃); de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 4 % de silicato soluble (p. ej., Na₂O, 2SiO₂); de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 40 % de zeolita (p. ej., NaA1SiO4); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 8 % de sulfato de sodio (p. ej., Na₂SO₄); de aproximadamente un 12 % a aproximadamente un 18 % de perborato de sodio (p. ej., NaBO₃H₂O); de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 7 % de TAED; de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 % de polímeros (p. ej., copolímero de ácido maleico/acrílico, PEG); 0,0001-0,1 % de enzimas (calculadas como proteína enzimática pura); y 0-5 % de ingredientes minoritarios (p. ej., abrillantador óptico, supresores de espuma, perfume).

8) Una composición de detergente formulada como un granulado que comprende aproximadamente de un 8 % a aproximadamente un 14 % de sulfonato de alquilbenceno lineal (calculado como ácido); de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 11 % de monoetanolamida de ácido graso etoxilado; de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 3 % de jabón como ácido graso; de aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 10 % de carbonato de sodio (p. ej., Na₂CO₃); de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 4 % de silicato soluble (Na₂O, 2SiO₂); de aproximadamente un 30 % a aproximadamente un 50 % de zeolita (p. ej., NaA1SiO4); de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 11 % de sulfato de sodio (p. ej., Na₂SO₄); de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 12 % de citrato de sodio (p. ej., C6H5Na3O7); de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 % de polímeros (p. ej., PVP, copolímero de ácido maleico/acrílico, PEG); 0,0001-0,1 % de enzimas (calculadas como proteína enzimática pura); y 0-5 % de ingredientes minoritarios (p. ej., supresores de espuma, perfume).

9) Una composición de detergente formulada como un granulado que comprende aproximadamente de un 6 % a aproximadamente un 12 % de sulfonato de alquilbenceno lineal (calculado como ácido); de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 4 % de tensioactivo no iónico; de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 6 % de jabón como ácido graso; de aproximadamente un 14 % a aproximadamente un 22 % de carbonato de sodio (p. ej., Na₂CO₃); de aproximadamente un 18 % a aproximadamente un 32 % de zeolita (p. ej., NaA1SiO4); de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 20 % de sulfato de sodio (p. ej., Na₂SO₄); de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 8 % de citrato de sodio (p. ej., C6H5Na3O7); de aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 9 % de perborato de sodio (p. ej., NaBO3H2O); de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 % de activador de blanqueo (p. ej., NOBS o TAED); de un 0 % a aproximadamente un 5 % de fosfonato (p. ej., EDTMPA); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 2 % de carboximetilcelulosa (CMC); de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 % de polímeros (p. ej., policarboxilato o PEG); 0,0001-0,1 % de enzimas (calculadas como proteína enzimática pura); y 0-5 % de ingredientes minoritarios (p. ej., abrillantador óptico, perfume).

10) Una composición acuosa de detergente líquido que comprende de aproximadamente un 15 % a aproximadamente un 23 % de sulfonato de alquilbenceno lineal (calculado como ácido); de aproximadamente un 8 % a aproximadamente un 15 % de etoxisulfato de alcohol (p. ej., alcohol C12-15, 2-3 EO); de

aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 9 % de etoxilato de alcohol (p. ej., alcohol C12-15, 7 EO, o alcohol C12-15, 5 EO); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 3 % de jabón como ácido graso (p. ej., ácido láurico); de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 % de etanolamina; de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 10 % de citrato de sodio; de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 6 % de hidrotopo (p. ej., toluensulfonato de sodio); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 2 % de borato (p. ej., B4O7); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 1 % de carboximetilcelulosa; de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 3 % de etanol; de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 5 % de propilenglicol; 0,0001-0,1 % de enzimas (calculadas como proteína enzimática pura); y 0-5 % de ingredientes minoritarios (p. ej., polímeros, dispersantes, perfume, abrillantadores).

11) Una composición acuosa de detergente líquido que comprende de aproximadamente un 20 % a aproximadamente un 32% de sulfonato de alquilbenceno lineal (calculado como ácido); 6-12 % de etoxilato de alcohol (p. ej., alcohol C12-15, 7 EO, o alcohol C12-15, 5 EO); de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 6 % de etanolamina; de aproximadamente un 8 % a aproximadamente un 14 % de ácido cítrico; de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 3 % de borato (p. ej., B4O7); de un 0 % a aproximadamente un 3 % de polímero (p. ej., copolímero de ácido maleico/acrílico, polímero de anclaje como, por ejemplo, copolímero de lauril metacrilato/ácido acrílico); de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 8 % de glicerol; 0,0001-0,1 % de enzimas (calculadas como proteína enzimática pura); y 0-5 % de ingredientes minoritarios (p. ej., hidrotopos, dispersantes, perfume, abrillantadores ópticos).

12) Una composición de detergente formulada como un granulado que presenta una densidad aparente de al menos 600 g/l que comprende aproximadamente de un 25 % a aproximadamente un 40 % de tensioactivo aniónico (sulfonato de alquilbenceno lineal, sulfato de alquilo, α -olefinsulfonato, ésteres metílicos de ácido graso α -sulfo, alcanosulfonatos, jabón); de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 % de tensioactivo no iónico (p. ej., etoxilato de alcohol); de aproximadamente un 8 % a aproximadamente un 25 % de carbonato de sodio (p. ej., Na_2CO_3); de aproximadamente un 5 % a aproximadamente un 15 % de silicatos solubles (p. ej., Na_2O , 2SiO_2); de un 0 % a aproximadamente un 5 % de sulfato de sodio (p. ej., Na_2SO_4); de aproximadamente un 15 % a aproximadamente un 28 % de zeolita (NaA1SiO_4); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 20% de perborato de sodio (p. ej., $\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 5 % de activador de blanqueo (TAED o NOBS); 0,0001-0,1 % de enzimas (calculadas como proteína enzimática pura); y 0-3% de ingredientes minoritarios (p. ej., perfume, abrillantadores ópticos).

13) Composiciones de detergente según se han descrito anteriormente en las composiciones 1) - 12), donde la totalidad o parte del sulfonato de alquilbenceno lineal se sustituye por sulfato de alquilo (C12-C18).

14) Una composición de detergente formulada como un granulado que presenta una densidad aparente de al menos 600 g/l que comprende de aproximadamente un 9 % a aproximadamente un 15 % de sulfato de alquilo (C12-C18); de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 6% de etoxilato de alcohol; de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 5 % de amida de ácido graso de polihidroxialquilo; de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 % de zeolita (NaA1SiO_4); de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 % de disilicato estratificado (p. ej., SK56 de Hoechst); de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 12 % de carbonato de sodio (p. ej., Na_2CO_3); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 6 % de silicato soluble (p. ej., Na_2O , 2SiO_2); de aproximadamente un 4 % a aproximadamente un 8 % de citrato de sodio; de aproximadamente un 13 % a aproximadamente un 22 % de percarbonato de sodio; de aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 8 % de TAED; de un 0 % a aproximadamente un 5 % de polímeros (p. ej., policarboxilatos y PVP); 0,0001-0,1 % de enzimas (calculadas como proteína enzimática pura); y 0-5 % de ingredientes minoritarios (p. ej., abrillantador óptico, fotoblanqueador, perfume, supresores de espuma).

15) Una composición de detergente formulada como un granulado que presenta una densidad aparente de al menos 600 g/l que comprende aproximadamente de un 4 % a aproximadamente un 8 % de sulfato de alquilo (C12-C18); de aproximadamente un 11 % a aproximadamente un 15% de etoxilato de alcohol; de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 4 % de jabón; de aproximadamente un 35 % a aproximadamente un 45 % de zeolita MAP o zeolita A; de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 8 % de carbonato de sodio (como Na_2CO_3); de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 4 % de silicato soluble (p. ej., Na_2O , 2SiO_2); de aproximadamente un 13 % a aproximadamente un 22 % de percarbonato de sodio; 1-8 % de TAED; de un 0 % a aproximadamente un 3% de carboximetilcelulosa (CMC); de un 0 % a aproximadamente un 3 % de polímeros (p. ej., policarboxilatos y PVP); 0,0001-0,1 % de enzimas (calculadas como proteína enzimática pura); y 0-3% de ingredientes minoritarios (p. ej., abrillantador óptico, fosfonato, perfume).

16) Formulaciones de detergente según se ha descrito anteriormente en 1) - 15), que contienen un perácido estabilizado o encapsulado, bien como un componente adicional o como un sustituto para sistemas de blanqueo ya especificados.

17) Composiciones de detergente según se ha escrito anteriormente en 1), 3), 7), 9) y 12), donde el perborato se sustituye por percarbonato.

18) Composiciones de detergente según se ha escrito anteriormente en 1), 3), 7), 9), 12), 14) y 15), que contienen asimismo un catalizador de manganeso. El catalizador de manganeso es, por ejemplo, uno de los

compuestos descritos en «Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching», Nature 369: 637-639 (1994).

19) Composición de detergente formulada como un detergente líquido no acuoso que comprende un tensioactivo líquido no iónico como, por ejemplo, alcohol primario alcoxilado lineal, un sistema mejorador (p. ej., fosfato), una(s) enzima(s), y un álcali. El detergente puede comprender también tensioactivo aniónico y/o un sistema de blanqueo.

[0250] Como se ha indicado anteriormente, el presente polipéptido de amilasa se puede incorporar en una concentración empleada habitualmente en detergentes. Actualmente, se contempla que, en la composición de detergente, la enzima se puede añadir en una cantidad correspondiente a 0,00001 - 1,0 mg (calculada como proteína enzimática pura) de polipéptido de amilasa por litro de solución de lavado.

[0251] La composición de detergente también puede contener otros ingredientes convencionales de detergente, p. ej., material defloculante, material de relleno, depresores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes suspensores de suciedad, agentes secuestrantes, agentes de redeposición antisuciedad, agentes deshidratantes, tintes, bactericidas, fluorescentes, espesantes y perfumes.

[0252] La composición de detergente puede formularse como una composición de detergente para lavar la ropa a mano (manual) o a máquina (automático), incluida una composición de aditivo para ropa adecuada para pretratar tejidos manchados y una composición suavizante de tejido añadida al aclarado, o formularse como una composición de detergente para su uso en operaciones generales de limpieza domésticas de superficies duras, o formularse para operaciones de lavado de vajilla manual o automático.

[0253] Cualquiera de las composiciones de limpieza descritas en el presente documento pueden incluir cualquier número de enzimas adicionales. Por lo general, la(s) enzima(s) debería(n) ser compatible(s) con el detergente seleccionado (p. ej., en lo que respecta al pH óptimo, la compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, y similares), y la(s) enzima(s) debería(n) estar presente(s) en cantidades efectivas. Las siguientes enzimas se proporcionan a modo de ejemplos.

[0254] Proteasas: Entre las proteasas adecuadas se incluyen aquellas de origen animal, vegetal o microbiano. Se incluyen mutantes modificados químicamente o con proteínas modificadas, así como proteínas procesadas de forma natural. La proteasa puede ser una serina proteasa o una metaloproteasa, una proteasa microbiana alcalina, una proteasa de tipo tripsina, o una proteasa de tipo quimotripsina. Entre los ejemplos de proteasas alcalinas se incluyen las subtilisinas, especialmente aquellas derivadas de *Bacillus*, p. ej., subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168 (véase, p. ej., WO 89/06279). Otros ejemplos incluyen aquellas proteasas mutantes descritas en el las patentes americanas n.ºs RE 34,606, 5,955,340, 5,700,676, 6,312,936, y 6,482,628. Entre los ejemplos de proteasas de tipo tripsina se incluyen la tripsina (p. ej., de origen porcino o bovino), y proteasas de *Fusarium* (véase, p. ej., WO 89/06270 y WO 94/25583). Entre los ejemplos de proteasas útiles se incluyen también, aunque sin carácter limitativo, las variantes descritas en los documentos WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116, y WO 98/34946. Entre las enzimas de proteasa disponibles comercialmente se incluyen, aunque sin carácter limitativo: Alcalase®, Savinase®, Primase™, Duralase™, Esperase®, BLAZE™, POLARZYME®, OVOZYME®, KANNASE®, LIQUANASE®, NEUTRASE®, RELEASE® y ESPERASE® (Novo Nordisk A/S y Novozymes A/S), Maxatase®, Maxacal™, Maxapem™, Properase®, Purafect®, Purafect OxP™, Purafect Prime™, FNA™, FN2™, FN3™, OPTICLEAN®, OPTIMASE®, PURAMAX™, EXCELLASE™ y PURAFAST™ (Danisco US Inc./DuPont Industrial Biosciences, Palo Alto, California, EE. UU), BLAP™ y variantes de BLAP™ (Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien, Düsseldorf, Alemania), y KAP (subtilisina de *B. alcalophilus*; Kao Corp., Tokio, Japón). Otros ejemplos de proteasas son la NprE de *Bacillus amyloliquefaciens* y la ASP de la cepa 69B4 de *Cellulomonas* sp. (Danisco US Inc./DuPont Industrial Biosciences, Palo Alto, California, EE. UU.). Se describen diversas proteasas en los documentos WO95/23221, WO 92/21760, WO 09/149200, WO 09/149144, WO 09/149145, WO 11/072099, WO 10/056640, WO 10/056653, WO 11/140364, WO 12/151534, la patente americana con n.º de publicación 2008/0090747, y las patentes americanas n.ºs 5,801,039, 5,340,735, 5,500,364, 5,855,625, US RE 34,606, 5,955,340, 5,700,676, 6,312,936, y 6,482,628, y varias otras patentes. En algunas otras formas de realización, se pueden emplear metaloproteasas en la presente invención, incluida, aunque sin carácter limitativo, la metaloproteasa neutra descrita en el documento WO 07/044993. Entre las proteasas adecuadas se incluyen proteasas producidas de forma natural o variantes modificadas específicamente seleccionadas o modificadas para funcionar a temperaturas relativamente bajas.

[0255] Lipasas: Entre las lipasas adecuadas se incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente, modificadas proteolíticamente, o con proteínas modificadas. Entre los ejemplos de lipasas útiles se incluyen, aunque sin carácter limitativo, lipasas de *Humicola* (sinónimo de *Thermomyces*), p. ej., de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) (véanse, p. ej., los documentos EP 258068 y EP 305216), de *H. insolens* (véase, p. ej., WO 96/13580); una lipasa de *Pseudomonas* (p. ej., de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes*; véase, p. ej., EP 218 272), *P. cepacia* (véase, p. ej., EP 331 376), *P. stutzeri* (véase, p. ej., GB 1,372,034), *P. fluorescens*, la cepa SD 705 de *Pseudomonas* sp. (véanse, p. ej., WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (véase, p. ej., WO 96/12012); una lipasa de *Bacillus* (p. ej., de *B. subtilis*; véase, p. ej., Dartois *et al.* Biochemica et Biophysica Acta, 1131: 253-360 (1993)), *B. stearothermophilus* (véase, p. ej., JP

64/744992), o *B. pumilus* (véase, p. ej., WO 91/16422). Otras variantes de lipasa contempladas para su uso en las formulaciones incluyen aquellas que se describen por ejemplo en los documentos: WO 92/05249, WO 94/01541, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079, WO 97/07202, EP 407225, y EP 260105. Algunas enzimas de lipasa disponibles comercialmente incluyen Lipolase® y Lipolase Ultra™ (Novo Nordisk A/S y Novozymes A/S).

[0256] Poliesterasas: En la composición se pueden incluir poliesterasas adecuadas, como las que se describen, por ejemplo, en los documentos WO 01/34899, WO 01/14629 y US6933140.

[0257] Amilasas: Las presentes composiciones se pueden combinar con otras amilasas, incluidas otras α -amilasas. Tal combinación es especialmente deseable cuando distintas α -amilasas muestran diferentes características de rendimiento y la combinación de una pluralidad de α -amilasas distintas da como resultado una composición que proporciona los beneficios de las distintas α -amilasas. Entre otras amilasas se incluyen amilasas disponibles comercialmente, como, aunque sin carácter limitativo, STAINZYME®, NATALASE®, DURAMYL®, TERMAMYL®, FUNGAMYL® y BAN™ (Novo Nordisk A/S y Novozymes A/S); RAPIDASE®, POWERASE®, PURASTAR® y PREFERENZ™ (de DuPont Industrial Biosciences).

[0258] Celulasas: Se pueden añadir celulasas a las composiciones. Entre las celulasas adecuadas se incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o con proteínas modificadas. Entre las celulasas adecuadas se incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, p. ej., las celulasas fúngicas producidas por *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum*, que se exponen por ejemplo en las patentes americanas n.ºs 4,435,307; 5,648,263; 5,691,178; 5,776,757; y WO 89/09259. Ejemplos de celulasas que se contemplan para su uso son aquellas que presentan beneficios para el cuidado del color en el tejido. Ejemplos de dichas celulasas son las celulasas que se describen por ejemplo en los documentos EP 0495257, EP 0531372, WO 96/11262, WO 96/29397 y WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasa, como las que se describen en los documentos WO 94/07998; WO 98/12307; WO 95/24471; PCT/DK98/00299; EP 531315; patentes americanas n.ºs 5,457,046; 5,686,593; y 5,763,254. Entre las celulasas disponibles comercialmente se incluyen CELLUZYME® y CAREZYME® (Novo Nordisk A/S y Novozymes A/S); CLAZINASE® y PURADAX HA® (DuPont Industrial Biosciences); y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

[0259] Peroxidasas/Oxidases: Entre las peroxidasas/oxidases adecuadas que se contemplan para su uso en las composiciones se incluyen aquellas de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Se incluyen mutantes modificados químicamente o con proteínas modificadas. Entre los ejemplos de peroxidasas útiles se incluyen las de *Coprinus*, p. ej., de *C. cinereus*, y variantes del mismo, como se describe en los documentos WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257. Entre algunas peroxidasas disponibles comercialmente se incluye por ejemplo GUARDZYME™ (Novo Nordisk A/S y Novozymes A/S).

[0260] La composición de detergente puede comprender también 2,6- β -D-fructano hidrolasa, que resulta efectiva en la eliminación/limpieza de biopelículas presentes en prendas/tejidos de carácter doméstico y/o industrial.

[0261] La(s) enzima(s) de detergente se puede(n) incluir en una composición de detergente añadiendo aditivos separados que contengan una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprende la totalidad de estas enzimas. Un aditivo de detergente, esto es, un aditivo separado o un aditivo combinado, puede estar formulado, por ejemplo, como un granulado, un líquido, una suspensión, y similares. Entre los ejemplos de formulaciones de aditivo de detergente se incluyen, aunque sin carácter limitativo, granulados, en concreto granulados no pulverulentos, líquidos, en concreto líquidos estabilizados, o suspensiones.

[0262] Se pueden producir granulados no pulverulentos, por ejemplo, según se da a conocer en los documentos de patente americana n.ºs 4,106,991 y 4,661,452, y opcionalmente pueden estar recubiertos mediante métodos que se conocen en la técnica. Entre los ejemplos de materiales de recubrimiento cerosos se incluyen productos de poli(óxido de etileno) (p. ej., polietilenglicol, PEG) con pesos molares medios de 1.000 a 20.000; nonilfenoles etoxilados que presentan de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados, en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en los que hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos de ácidos grasos. En el documento GB 1483591, por ejemplo, se proporcionan ejemplos de materiales de recubrimiento que forman una película adecuados para su aplicación mediante técnicas de lecho fluido. Las preparaciones de enzimas líquidas pueden, por ejemplo, estabilizarse añadiendo un poliol como propilenglicol, un azúcar o un polialcohol, ácido láctico o ácido bórico de acuerdo con los métodos establecidos. Se pueden preparar enzimas protegidas conforme al método que se da a conocer en el documento EP 238,216.

[0263] La composición de detergente puede presentarse en cualquier forma conveniente, p. ej., una barra, un comprimido, un polvo, un gránulo, una pasta o un líquido. Un detergente líquido puede ser acuoso, conteniendo normalmente hasta aproximadamente un 70 % de agua, y desde un 0 % hasta aproximadamente un 30 % de solvente orgánico. Asimismo, se contemplan geles detergentes compactos que contengan aproximadamente un 30 % o menos de agua. Opcionalmente, la composición de detergente puede comprender uno o más tensioactivos, que pueden ser no iónicos, incluyendo semipolares y/o aniónicos y/o catiónicos y/o zwitteriónicos.

Los tensioactivos pueden estar presentes en una amplia gama, desde aproximadamente un 0,1 % hasta aproximadamente un 60 % en peso.

[0264] Cuando se incluya en este, el detergente contendrá normalmente desde aproximadamente un 1 % hasta aproximadamente un 40 % de un tensioactivo aniónico, como sulfonato de alquilbenceno lineal, α -olefinsulfonato, sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso), etoxisulfato de alcohol, alcanosulfonato secundario, éster metílico de ácido graso α -sulfo, ácido alquilsuccínico o alquenilsuccínico, o jabón.

[0265] Cuando se incluya en este, el detergente contendrá normalmente desde aproximadamente un 0,2 % hasta aproximadamente un 40 % de un tensioactivo no iónico, como etoxilato de alcohol, etoxilato de nonilfenol, alquil poliglucósido, óxido de alquil dimetil amina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, amida de ácido graso de polihidroxialquilo, o derivados N-acilo-N-alquilo de glucosamina («glucamidas»).

[0266] El detergente puede contener desde un 0 % hasta aproximadamente un 65 % de un mejorador de detergente o de un agente complejante como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético, ácido alquilsuccínico o alquenilsuccínico, silicatos solubles o silicatos estratificados (p. ej., SKS-6 de Hoechst).

[0267] El detergente puede comprender uno o más polímeros. Entre los ejemplos de polímeros se incluyen carboximetilcelulosa (CMC), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(etilenglicol) (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos, p. ej., poliacrilatos, copolímeros de ácido maleico/acrílico y copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.

[0268] La(s) enzima(s) de la composición de detergente se puede(n) estabilizar empleando agentes estabilizadores convencionales, por ejemplo, poliol (p. ej., propilenglicol o glicerol), un azúcar o polialcohol, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico (p. ej., éster de borato aromático), o un derivado de ácido fenilborónico (p. ej., ácido 4-formilfenilborónico). La composición puede estar formulada según se describe en los documentos WO 92/19709 y WO 92/19708.

[0269] Se contempla que en las composiciones de detergente, en concreto las variantes de enzima, se pueden añadir en una cantidad correspondiente a aproximadamente de 0,01 mg a aproximadamente 100 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado (p. ej., de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5,0 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado o de 0,1 a aproximadamente 1,0 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado).

[0270] En el documento WO2013063460 se describen numerosos ejemplos de formulaciones de detergente a las que se pueden añadir las presentes amilasas (o que en ciertos casos se identifican como un componente de las mismas). Entre estas se incluyen formulaciones/envases de detergente en monodosis disponibles comercialmente, como PUREX® UltraPacks (Henkel), FINISH® Quantum (Reckitt Benckiser), CLOROX™ 2 Packs (Clorox), OxiClean Max Force Power Paks (Church & Dwight), TIDE® Stain Release, CASCADE® ActionPacs, y TIDE® Pods™ (Procter & Gamble), PS.

7.6. Métodos para evaluar la actividad de amilasa en composiciones de detergente

[0271] En la técnica se conocen numerosos ensayos de limpieza con α -amilasa, incluidos análisis de muestras y de micromuestras. En los Ejemplos adjuntos se describen únicamente algunos de estos ensayos.

[0272] Con el fin de representar además las composiciones y métodos, y las ventajas de los mismos, los siguientes ejemplos específicos se proporcionan en el entendimiento de que presentan un carácter ilustrativo en lugar de limitativo.

8. Composiciones de destilado

[0273] La presente variante de amilasa puede ser un componente de una composición de destilado utilizada en un proceso de elaboración de cerveza, esto es, elaboración de una bebida de malta fermentada. Los carbohidratos no fermentables forman la mayoría de los sólidos disueltos en la cerveza final. Este residuo permanece debido a la incapacidad de las amilasas de malta para hidrolizar los enlaces alfa-1,6 del almidón. Los carbohidratos no fermentables aportan alrededor de 50 calorías por cada 12 onzas (0,35 l) de cerveza. Una amilasa, en combinación con una glucoamilasa y opcionalmente una pululanasa y/o isoamilasa, contribuyen a convertir el almidón en dextrinas y azúcares fermentables, disminuyendo los carbohidratos restantes no fermentables en la cerveza final.

[0274] Las principales materias primas utilizadas para elaborar estas bebidas son agua, lúpulo y malta. Además, se pueden utilizar como fuente de almidón componentes como sémola de maíz común, sémola de maíz refinada, levadura de cerveza molida, arroz, sorgo, almidón de maíz refinado, cebada, almidón de cebada, cebada descascarillada, trigo, almidón de trigo, cereal torrefacto, copos de cereales, centeno, avena, patata, tapioca y jarabes, tales como jarabe de maíz, jarabe de caña de azúcar, jarabe de azúcar invertido, jarabes de cebada y/o de trigo, y similares.

[0275] Por diversas razones, la malta, que se produce principalmente a partir de variedades seleccionadas de cebada, aporta el mayor efecto sobre el carácter y la calidad de la cerveza. En primer lugar, la malta es el principal agente saborizante en la cerveza. En segundo lugar, la malta proporciona la mayor parte del azúcar fermentable. En tercer lugar, la malta proporciona las proteínas, que contribuirán a proporcionar el carácter del cuerpo y de la espuma de la cerveza. En cuarto lugar, la malta proporciona la actividad enzimática necesaria durante la molienda. El lúpulo también influye significativamente en la calidad de la cerveza, incluido el sabor. En concreto, el lúpulo (o los componentes del lúpulo) añade sustancias amargantes deseables a la cerveza. El lúpulo actúa además como precipitante de proteínas, establece agentes conservantes y ayuda en la formación y estabilización de la espuma.

[0276] Asimismo, para la elaboración de cerveza se emplean granos, como cebada, avena, trigo, así como componentes vegetales, como maíz, lúpulo y arroz, tanto en la industria como en la elaboración de cerveza casera. Los componentes utilizados en la elaboración de cerveza pueden ser no malteados o pueden ser malteados, esto es, parcialmente germinados, lo cual resulta en un aumento de los niveles de enzimas, incluida la α -amilasa. Para una correcta elaboración de cerveza, se necesitan unos niveles adecuados de actividad de enzima α -amilasa con el fin de asegurar los niveles apropiados de azúcares para la fermentación. Por consiguiente, puede añadirse una amilasa, por sí sola o en combinación con otra(s) α -amilasa(s), a los componentes utilizados para la elaboración de cerveza.

[0277] Según se utiliza en el presente documento, el término «material de partida» hace referencia a los granos y componentes vegetales que se trituran o se rompen. Por ejemplo, la cebada utilizada en la producción de cerveza es un grano que se ha molido o triturado grueso para obtener una consistencia apropiada para producir una pulpa para la fermentación. Según se utiliza en el presente documento, el término «material de partida» incluye cualquiera de los tipos de vegetales y granos mencionados anteriormente en forma triturada o molida gruesa. Los métodos que se describen en el presente documento se pueden utilizar para determinar los niveles de actividad de α -amilasa tanto en harinas como en materiales de partida.

[0278] En la técnica se conocen procesos para elaborar cerveza. Véase, p. ej., Wolfgang Kunze (2004) "Technology Brewing and Malting", Research and Teaching Institute of Brewing, Berlín (VLB), 3.^a edición. En resumen, el proceso implica: (a) preparar una pulpa, (b) filtrar la pulpa para preparar un mosto, y (c) fermentar el mosto para obtener una bebida fermentada, como la cerveza. Normalmente, la malta molida o triturada se mezcla con agua y se mantiene durante un período de tiempo a temperaturas controladas para permitir que las enzimas presentes en la malta conviertan en azúcares fermentables el almidón que se encuentra en la malta. A continuación, la pulpa se transfiere a un filtro de mosto, donde se separa el líquido del residuo de grano. Este líquido dulce se denomina «mosto», y el residuo de grano sobrante se denomina «grano usado». Normalmente, la pulpa se somete a una extracción, que implica añadir agua a la pulpa con el fin de recuperar el extracto soluble residual del grano usado. El mosto se hierve entonces enérgicamente para esterilizar el mosto y ayudar a la formación del color, el sabor y el olor. En algún momento de la ebullición, se añade el lúpulo. El mosto se enfría y se transfiere a un fermentador.

[0279] El mosto se pone en contacto con la levadura en un fermentador. El fermentador se puede refrigerar para detener la fermentación. La levadura flocula y se elimina. Por último, la cerveza se enfría y se almacena durante un período de tiempo, en el cual la cerveza se aclara y se desarrolla su sabor, y se asienta cualquier material que pudiera afectar a la apariencia, el sabor o la vida útil de la cerveza. Normalmente, la cerveza contiene de aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 10 % v/v de alcohol, aunque se puede obtener cerveza con un contenido más alto de alcohol, p. ej., un 18 % v/v. Previamente al envasado, la cerveza se carbonata y, opcionalmente, se filtra y se pasteuriza.

[0280] La composición de destilado que comprende una amilasa, en combinación con una glucoamilasa y opcionalmente una pululanasa y/o isoamilasa, se puede añadir a la pulpa de la etapa (a) expuesta anteriormente, esto es, durante la preparación de la pulpa. De forma alternativa, o adicionalmente, la composición de destilado se puede añadir a la pulpa de la etapa (b) descrita anteriormente, esto es, durante la filtración de la pulpa. De forma alternativa, o adicionalmente, la composición de destilado se puede añadir al mosto de la etapa (c) descrita anteriormente, esto es, durante la fermentación del mosto.

[0281] Una bebida fermentada, como una cerveza, se puede producir por medio de uno de los métodos descritos anteriormente. La bebida fermentada puede ser una cerveza, como una cerveza de pura malta, cerveza elaborada de acuerdo con el *Reinheitsgebot* o ley de pureza de 1516, cerveza de fermentación alta o *ale*, IPA (*India pale ale*), cerveza de fermentación baja o *lager*, cerveza amarga o *bitter*, Happoshu (segunda cerveza), tercera cerveza, cerveza seca, bebida afín a la cerveza, cerveza ligera, cerveza de bajo contenido alcohólico, cerveza baja en calorías, *porter*, *bock*, cerveza negra, licor de malta, cerveza sin alcohol, licor de malta sin alcohol y similares, pero también bebidas a base de malta y cereales alternativas, tales como bebidas de malta con sabor a fruta, por ejemplo, bebidas de malta con sabor a cítrico, tales como con sabor a limón, naranja, lima o bayas, bebidas a base de malta con sabor a licor, por ejemplo, licor de malta con sabor a vodka, ron o tequila o bebidas de malta con sabor a café, tales como licor de malta con sabor a cafeína, y similares.

9. Reducción de almidón positivo al yodo

[0282] Las variantes de amilasas pueden reducir la cantidad de almidón positivo al yodo (IPS), al utilizarse en un método de licuefacción y/o sacarificación. El IPS se puede obtener a partir de la amilosa que se escapa en la hidrólisis y/o a partir de polímero de almidón retrogradado. La retrogradación del almidón se lleva a cabo de forma espontánea en una pasta de almidón, o en un gel al envejecer, a causa de la tendencia de las moléculas de almidón a unirse entre sí, seguida por un aumento de la cristalinidad. Las soluciones de concentración baja se tornan cada vez más turbias como consecuencia de la asociación progresiva de moléculas de almidón en artículos más grandes. Tiene lugar la precipitación espontánea y el almidón precipitado parece retomar su conducción original de ser insoluble en agua fría. Las pastas de concentración más alta se convierten en un gel al enfriarse, y al envejecer, se vuelve progresivamente más firme a causa de la creciente asociación de moléculas de almidón. Este hecho se debe a la acusada tendencia a la formación de enlace de hidrógeno entre grupos hidroxilo en moléculas de almidón adyacentes. Véase J.A. Radley, ed., *Starch and its Derivatives* 194-201 (Chapman and Hall, Londres (1968)).

[0283] La presencia de IPS en la solución de sacárido afecta negativamente a la calidad del producto final y representa un problema importante para el procesamiento posterior. El IPS taponaa o ralentiza el sistema de filtración, y obstruye las columnas de carbono utilizadas para la purificación. Cuando el IPS alcanza niveles suficientemente elevados, podría filtrarse a través de las columnas de carbono y reducir la eficiencia productiva. Asimismo, podría resultar en un producto final borroso tras el almacenamiento, lo cual resulta inaceptable para la calidad del producto final. La cantidad de IPS se puede reducir aislando el tanque de sacarificación y volviendo a mezclar los contenidos. No obstante, el IPS se acumulará en las columnas de carbono y en los sistemas de filtros, entre otros. Se espera que el empleo de variantes de amilasas mejore al rendimiento general del proceso al reducir la cantidad de IPS.

[0284] Con el fin de representar además las composiciones y métodos, y las ventajas de los mismos, los siguientes ejemplos específicos se proporcionan en el entendimiento de que presentan un carácter ilustrativo en lugar de limitativo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Ensayos

[0285] A continuación se exponen, para facilitar la comprensión, diversos ensayos utilizados en el presente documento. Cualquier desviación de los protocolos en Ejemplos posteriores se indica en las secciones correspondientes. En estos experimentos, se utilizó un espectrofotómetro para medir la absorbancia de los productos formados una vez concluidas las reacciones.

A. Tratamiento con cuentas de Chelex de sobrenadantes de cultivo

[0286] Las microplacas (MTP) de 96 pocillos que contienen cultivos en crecimiento se extrajeron de las incubadoras y se sustituyeron las tapas de EnzyScreen por selladores de plástico desechables (Nunc cat. # 236366; Rochester, Nueva York, EE. UU.). Las células se separaron del sobrenadante de cultivo mediante centrifugación (RCF 1118, 5 minutos). Se extrajeron 150 µl de sobrenadante de cada pocillo y se transfirieron a placas filtrantes (Millipore Multiscreen HTS, Billerica, Massachusetts, EE. UU.) que contienen cuentas de Chelex preparadas según se ha descrito anteriormente. Las placas se agitaron enérgicamente durante 5 minutos y se recogió el sobrenadante de 3 placas de crecimiento de replicación en una única microplaca de pocillos profundos (Axygen, PDW-11-C) empleando un dispositivo colector de vacío. Las placas que contenían sobrenadantes se sellaron y se almacenaron a 4 °C.

[0287] Las cuentas de Chelex-100 y la malla 200-400 (BioRad, Hercules, California, EE. UU.) se lavaron dos veces con 2 volúmenes de lecho de 1 M de HCl, y después con 5 volúmenes de lecho de agua ultrapura en un aparato de filtro de vidrio sinterizado. Se utilizaron 2 volúmenes de lecho de 1 M de KOH para lavar las cuentas, y a continuación se realizó otro lavado con 5 volúmenes de lecho con agua ultrapura. Las cuentas filtradas se transfirieron a un vaso de precipitado y se suspendieron con la suficiente agua ultrapura para producir una suspensión capaz de mezclarse. El pH de la suspensión se ajustó a 8-8,5 empleando HCl. El líquido se extrajo y las cuentas se secaron empleando un filtro de vidrio sinterizado. Se preparó una suspensión de cuentas (40 % p/p) en agua ultrapura y su pH se ajustó a 8,0 utilizando KOH/HCl. Se mantuvo una suspensión que presentaba una consistencia constante mediante mezclado enérgico. Se utilizó un dispositivo de depósito *bubble paddle* (V&P Scientific, San Diego, California, EE. UU.) para transferir 100 µl de suspensión a todos los pocillos de las placas filtrantes. El líquido se extrajo empleando un dispositivo colector de vacío.

B. Purificación de proteínas

[0288] Las cepas de *Bacillus* que expresan variantes de amilasa se cultivaron en matraces de 2,5 l en el medio de cultivo (enriquecido con medios semidefinidos basados en tampón MOPs, con urea como fuente principal de nitrógeno, glucosa como fuente principal de carbono, y complementada con un 1 % de soítona para un crecimiento celular firme) durante 60-72 horas a 37 °C o en tanques de 14 l empleando un proceso de fermentación por lote alimentado con un medio de macerado de maíz y harina de soja complementada con sales

minerales y glucosa como fuente de carbono durante 100 horas a 36 °C. Tras la incubación, las células se separaron del medio de fermentación mediante centrifugación y los sobrenadantes se concentraron mediante ultrafiltración. Se añadió sulfato de amonio al concentrado a una concentración final de 0,5 M. Las proteínas se purificaron empleando cromatografía de interacción hidrofóbica utilizando una columna de fenil-sefariosa en el sistema AKTA Explorer FPLC (GE Healthcare). La columna se equilibró con 50 mM de HEPES, pH 8, con 2 mM de CaCl₂ y 0,5 M de sulfato de amonio, y las proteínas se eluyeron con 50 mM de HEPES, pH 8, con 2 mM de CaCl₂ y un 50 % de propilenglicol. Tras cada operación de HPLC, las fracciones líquidas asociadas al máximo en cuestión se agruparon, y se realizaron las mediciones de absorbancia de las fracciones agrupadas para calcular las concentraciones iniciales. La concentración de proteínas de las muestras concentradas se determinó promediando el resultado de tres mediciones distintas: mediciones de absorbancia a 280 nm, densitometría SDS-PAGE de muestras tratadas con ácido en comparación con un estándar conocido, y mantenimiento de las proteínas en un sistema HPLC y realizando mediciones de absorbancia a 215 nm y a 280 nm.

C. Ensayo de determinación de proteínas

[0289] Los ensayos de determinación de proteínas se llevaron a cabo utilizando sobrenadante de cultivo tratado con cuentas de Chelex de cultivos que crecían en microplacas (MTP) de 96 pocillos durante 3 días a 37 °C con agitación a 300 rpm y con un 80 % de humedad. Se utilizó una nueva MTP de 96 pocillos con fondo redondo que contenía 25 µl de sobrenadante por pocillo para el método de determinación de proteínas mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Los sobrenadantes se diluyeron cuatro veces en 25 mM de acetato de sodio con pH 5,5 y se analizaron 10 µl de cada muestra diluida. Se empleó una HPLC de Agilent 1200 (Hewlett Packard) equipada con una columna Poroshell 300SB-C8 (Agilent Technologies Santa Clara, California, EE. UU.). La muestra se unió a la columna utilizando 25 mM de acetato de sodio con pH 5,5, y se eluyó con un gradiente de hasta un 70 % de acetonitrilo. La absorbancia se midió a 220 nm, se integró empleando el *software* ChemStation (Agilent Technologies) y se determinó la concentración de proteínas basándose en una curva estándar de proteína CspAmy2-v1 purificada.

D. Ensayo Ceralpha de actividad de α-amilasa

[0290] El ensayo Ceralpha de α-amilasa se llevó a cabo utilizando el kit Ceralpha (Megazyme, Wicklow, Irlanda). El ensayo implica incubar el sobrenadante de cultivo con una mezcla de sustrato en condiciones definidas, y la reacción se concluye (y se desarrolla el color) mediante la incorporación de un tampón borato (200 mM de ácido bórico/tampón NaOH, pH 10). El sustrato es una mezcla del oligosacárido definido «*p*-nitrofenil maltoheptaósido con extremo no reductor bloqueado» (BNPNG7) y niveles excesivos de α-glucosidasa (que no actúa en el sustrato nativo a causa de la presencia del «grupo bloqueador»). En la hidrólisis del oligosacárido mediante una α-amilasa endoactiva, las cantidades excesivas de α-glucosidasa presentes en la mezcla proporciona una hidrólisis instantánea y cuantitativa del fragmento de *p*-nitrofenil maltosacárido a glucosa y a *p*-nitrofenol libre. Se midió la absorbancia a 405 nm, que se relaciona directamente con el nivel de amilasa en la muestra analizada.

[0291] El equipo utilizado para este ensayo incluía un robot Biomek FX (Beckman Coulter Brea, California, EE. UU.); un lector de microplacas SpectraMAX (tipo 340-Dispositivos moleculares, Sunnyvale, California, EE. UU.) y una incubadora/agitador iEMS (Thermo Scientific, Rockford, Illinois, EE. UU.). El reactivo y las soluciones utilizadas fueron:

- 1) sustrato de *p*-nitrofenil maltoheptaósido (BNPNG7) (kit Ceralpha HR de Megazyme);
- 2) 50 mM de tampón malato, 0,005 % de TWEEN® 80 con pH 5,6 o 50 mM de MOPS, 0,005 % de TWEEN® 80, pH 7 (tampones de dilución); y
- 3) 200 mM de ácido bórico/tampón NaOH, pH 10 (tampón STOP).

[0292] Se disolvió un vial que contenía 54,5 mg de sustrato de BNPNG7 en 10 ml de agua MilliQ y a continuación se diluyó en 30 ml de tampón de dilución para conformar 40 ml del sustrato de trabajo (1,36 mg/ml). Las muestras de amilasa (sobrenadante de fermentación) se diluyeron 40X con tampón de dilución. El ensayo se llevó a cabo añadiendo 5 µl de solución de amilasa diluida en los pocillos de una MTP, y después se añadieron 55 µl de la solución de sustrato de trabajo de BNPNG7 diluida. Las soluciones se mezclaron y la MTP se selló con un sello para placa y se colocó en una incubadora/agitador (iEMS - Thermo Scientific) durante 4 minutos a 25 °C. La reacción se concluye añadiendo 70 µl de tampón STOP y la absorbancia se leyó a una longitud de onda de 400 nm en un lector de microplacas. Se empleó un control no enzimático para los valores de fondo de la absorbancia.

E. Ensayo de estabilidad térmica

[0293] Se midió la estabilidad térmica de CspAmy2-v1 y de las variantes determinando la actividad de amilasa utilizando el ensayo Ceralpha de α-amilasa. El equipo utilizado para este ensayo incluía un robot Biomek FX (Beckman Coulter); un lector de microplacas SpectraMAX (tipo 340-Dispositivos moleculares), una máquina de PCR Tetrad2DNA Engine (Biorad), y una incubadora/agitador iEMS (Thermo Scientific). Las soluciones de reactivo utilizadas fueron (* no en todos los ensayos):

- 1) Tampones de estrés térmico

- a) 50 mM de KOAc con pH 4,5 (5 ppm de CaCl₂, 50 ppm de NaCl)*,
- b) 50 mM de KOAc con pH 5,0 (10 ppm de CaCl₂, 10 mM de NaCl),
- c) 50 mM de KOAc con pH 5,7 (5 ppm de CaCl₂, 50 ppm de NaCl),
- d) 50 mM de KOAc con pH 5,7 (condición sin sal)*

- 5 2) Sustrato de *p*-nitrofenil maltoheptaósido (BPNPG7) (kit Ceralpha HR de Megazyme);
 3) 50 mM de tampón malato, 0,005 % de TWEEN® 80, pH 5,6 (tampón de dilución); y
 4) 200 mM de ácido bórico/NaOH, pH 10 (tampón STOP).
 5) Sobrenadante de cultivo de amilasa: se diluyeron 1:10 placas enzimáticas de dilución maestra 1:10 en cada uno de los cuatro tampones de estrés térmico en una placa de PCR
- 10 **[0294]** Se añadieron 5 µl de las muestras enzimáticas diluidas en una placa de PCR de 96 pocillos que contenía 55 µl de solución de sustrato de trabajo BPNPG7 diluida y se determinó la actividad de amilasa inicial de las muestras utilizando el ensayo Ceralpha de α-amilasa Ceralpha según se ha descrito en la Sección C. Las muestras se sometieron a estrés térmico durante 3-6 minutos en un termociclador PCR del siguiente modo: Soluciones tampón (a) 50 °C, (b) 59 °C-60 °C, (c) 65 °C-70 °C, y (d) 65 °C. Las muestras sometidas a estrés
- 15 térmico se enfriaron inmediatamente a temperatura ambiente y se analizaron 5 µl de alícuotas para determinar la actividad de amilasa empleando el ensayo de α-amilasa Ceralpha según se ha descrito en la Sección C. Para cada variante, se utilizó la proporción de las actividades de amilasa inicial y residual para calcular la estabilidad térmica de la siguiente forma: Estabilidad térmica = [valor de t_{residual}] / [valor de t_{inicial}], por lo que se calculó la proporción de actividad de estabilidad térmica basándose en la actividad enzimática tras la incubación térmica dividida por la actividad enzimática antes de la incubación térmica. Para cada muestra (variantes), se calculó el índice de rendimiento (PI). El índice de rendimiento para la estabilidad térmica se determinó comparando la estabilidad térmica de la enzima variante con la de una enzima de referencia tratada de forma similar.

F. Ensayos de hidrólisis de almidón (ensayos de aplicación de harina de maíz y almidón de maíz)

- 25 **[0295]** La hidrólisis de almidón de harina de maíz y de almidón de maíz se utilizó para medir la actividad específica de CspAmy2-v1 y sus variantes. La actividad se midió en función de los extremos reductores generados mediante la descomposición enzimática de harina de maíz o de almidón de maíz. Los extremos reductores generados durante la incubación con cualquier sustrato se cuantificaron utilizando un ensayo PAHBAH (hidrazida de ácido *p*-hidroxibenzoico). El equipo utilizado para el ensayo incluía un robot Biomek FX (Beckman Coulter); un lector de microplacas SpectraMAX (tipo 340-Dispositivos moleculares), una máquina de PCR Tetrad2DNA Engine (Biorad), y una incubadora/agitador iEMS (Thermo Scientific), y un depósito *bubble paddle*.

- 30 **[0296]** La harina de maíz orgánico de Azure Farms (Norco, California) se molió hasta formar un polvo fino utilizando un molinillo de café para consumidores, y a continuación se tamizó para obtener una fracción de <250 micras. La harina de maíz tamizada se lavó minuciosamente con agua MilliQ mediante la suspensión y centrifugación repetida. El material de harina de maíz orgánico de Cargill Farms también se lavó minuciosamente con agua MilliQ mediante la suspensión y centrifugación repetida.

- 35 **[0297]** Tanto las fracciones lavadas de harina de maíz como las de almidón de maíz se suspendieron en agua MilliQ que contenía un 0,005 % de azida de sodio como 20 % (p/p) de soluciones madre. Las soluciones madre se diluyeron además con una solución tampón madre 20X a 10,9 % p/v de soluciones de harina de maíz y de almidón de maíz (concentración de tampón final: 55 mM de KOAc, pH 5).

- 40 **[0298]** Se añadieron 55 µl de los sustratos de harina de maíz y almidón de maíz diluidos en microplacas de PCR junto con 5 µl de muestras de enzima diluidas 1:10 empleando un depósito *bubble paddle*. Las placas se sellaron y se colocaron a 83 °C durante 5 minutos, y después se redujo a 45 °C. La reacción de hidrólisis de almidón se concluyó añadiendo 70 µl de NaOH 0,1 N. Las placas se sellaron y se centrifugaron durante 3 minutos a 1610 RCF. Los productos de reacción de hidrólisis de almidón de ambas reacciones se analizaron mediante el ensayo PAHBAH según se describe a continuación.

- 45 **[0299]** *Ensayo PAHBAH:* Se añadieron alícuotas de 80 µl de 0,5 N NaOH a todos los pocillos de una placa de PCR vacía (una «placa de reacción PAHBAH»), y a continuación se añadieron 20 µl de reactivo PAHBAH (5 % p/v de hidrazida de ácido *p*-hidroxibenzoico (Sigma # H9882, San Luis, Misuri) disuelto en 0,5 N HCl). Las soluciones se mezclaron pipeteando hacia arriba y hacia abajo. Se añadieron 20 µl de los sobrenadantes de reacción de hidrólisis de almidón en cada pocillo de la placa de reacción PAHBAH. Las placas se sellaron y se colocaron en un termociclador, programado durante 2 minutos a 95 °C para desarrollar el color, y se enfrió a continuación hasta 20 °C. Las muestras de 80 µl de las mezclas de reacción PAHBAH desarrolladas se transfirieron a una placa nueva, y se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro.

55 G. Ensayo de micromuestras de almidón de arroz CS-28

- [0300]** El fundamento de este ensayo de amilasa es la liberación de un tinte naranja a causa de la hidrólisis de almidón de arroz incorporado a una micromuestra de algodón. Se mide la absorbancia a 488 nm del líquido de

lavado y esta se relaciona con el nivel de actividad de amilasa en la muestra analizada en las condiciones deseadas (pH, temperatura y tampón).

[0301] El equipo utilizado para este ensayo incluía un robot Biomek FX (Beckman Coulter); un lector de microplacas SpectraMAX (tipo 340-Dispositivos moleculares) y una incubadora/agitador iEMS (Thermo Scientific). El reactivo y las soluciones utilizadas fueron:

- 1) Micromuestras CS-28 (almidón de arroz, de color);
- 2) 10 mM de HEPES, 2 mM de CaCl₂, 0,005 % de tampón TWEEN 80, pH 8,0, conductividad 1 mS/cm;
- 3) 25 mM de CAPS, 2 mM de CaCl₂, 0,005 % de tampón TWEEN 80, pH 10,0, conductividad 5 mS/cm (ajustada con 5 M de NaCl); y
- 4) 10 mM de NaCl, 0,1 mM de CaCl₂, 0,005% de TWEEN 80.
- 5) 50 mM de MOPS pH 7,15, 0,1 mM de CaCl₂.

[0302] Las micromuestras CS-28 con 5,5 mm de diámetro circular las proporcionó el Center for Testmaterials (CFT, Vlaardingen, Países Bajos). Se colocaron dos micromuestras en cada pocillo de una microplaca de poliestireno de fondo plano con 96 pocillos Corning 9017. Los sobrenadantes de cultivo se diluyeron ocho veces en 50 mM de MOPS con pH 7,15, 0,1 mM de CaCl₂, y posteriormente en 10 mM de NaCl, 0,1 mM de CaCl₂, 0,005 % de solución TWEEN®80 hasta aproximadamente 1 ppm, concentración de enzimas final.

[0303] La incubadora/agitador se configuró a la temperatura deseada, 25 °C (temperatura ambiente) o 50 °C. Se añadieron 174 µl o 177 µl de tampón HEPES o CAPS, respectivamente, en cada pocillo de la microplaca que contenía las micromuestras, y posteriormente se añadieron 6 µl o 3 µl de solución diluida de enzimas en cada pocillo, dando como resultado un volumen total de 180 µl/pocillo. La microplaca se selló con un sellado de placa y se colocó en la incubadora/agitador iEMS y se incubó durante 15 minutos a 1150 rpm a 25 °C para la limpieza con un pH 8, baja conductividad (1 mS/cm), o durante 15 minutos a 1150 rpm a 50 °C para la limpieza con un pH 10, conductividad alta (5 mS/cm). Tras la incubación en las condiciones apropiadas, se transfirieron 100 µl de solución de cada pocillo a una nueva microplaca, y se midió la absorbancia a 488 nm empleando un espectrofotómetro para microplacas. Se incluyeron controles que contenían dos micromuestras y tampón, pero no enzima, para la sustracción del rendimiento de limpieza de fondo.

[0304] Cada valor de absorbancia se corrigió mediante la sustracción del blanco (obtenido tras la incubación de micromuestras en ausencia de enzima), y la absorbancia resultante proporcionó una medida de la actividad hidrolítica. Se calculó un índice de rendimiento (PI) para cada muestra.

[0305] Para calcular los índices de rendimiento de limpieza (PI), se utilizó la ecuación de Langmuir para ajustar los datos basándose en el control de enzima de referencia. Utilizando la concentración de proteínas de las variantes, se calculó el rendimiento esperado basado en el ajuste de curvas. El rendimiento observado se dividió por el rendimiento calculado. A continuación, este valor se dividió por el rendimiento de la enzima de referencia.

H. Ensayo de estabilidad detergente

[0306] La estabilidad de la amilasa de referencia y de las variantes de esta se determinó midiendo su actividad tras la incubación en condiciones definidas, en presencia de una mezcla de 10 % de detergente (detergente Persil Color Gel adquirido comercialmente, Henkel (Düsseldorf, Alemania), adquirido en 2011). El detergente se inactivó por calor antes de su uso, y las actividades de amilasa inicial y residual se determinaron empleando el ensayo de α-amilasa Ceralpha según se ha descrito anteriormente en la sección C.

[0307] El equipo utilizado para este ensayo incluía un robot Biomek FX (Beckman Coulter); un lector de microplacas SpectraMAX (tipo 340-Dispositivos moleculares), una máquina de PCR Tetrad2DNA Engine (Biorad) y una incubadora/agitador iEMS (Thermo Scientific). Las soluciones de reactivo utilizadas fueron:

- 1) Sustrato de p-nitrofenil maltoheptaósido (BPNG7) (kit Ceralpha HR de Megazyme);
- 2) Detergente líquido (Persil Color Gel, inactivado por enzimas mediante calor durante 4 h a 90 °C);
- 3) 50 mM de MOPS, 0,1 mM de CaCl₂, 0,005 % de tampón TWEEN®80, pH 7 (tampón de dilución);
- 4) Solución de 10 % de detergente diluida en tampón de dilución;
- 5) 200 mM de ácido bórico/tampón NaOH, pH 10 (tampón STOP); y
- 6) Sobrenadantes de cultivo de amilasa diluidos ocho veces en 50 mM de MOPS pH 7,15, 0,1 mM de CaCl₂ conteniendo 0-100 µg/ml de proteína.

[0308] Se añadieron 85 µl de una solución de 10 % de detergente a una placa de PCR de 96 pocillos y se mezclaron con 15 µl del sobrenadante de cultivo diluido. Se diluyó una muestra de la placa de PCR 3X en tampón de dilución y se utilizó una alícuota de 5 µl de esta dilución para determinar la actividad de amilasa inicial. La placa de PCR se incubó en un bloque de PCR Tetrad a 80,5 °C durante 5 minutos. Tras la incubación, la mezcla detergente-enzima se diluyó 3X en tampón de dilución y se midió la actividad residual. La actividad de amilasa inicial ($t_{inicial}$) y residual ($t_{residual}$) se determinó mediante el ensayo de α-amilasa Ceralpha, según se ha descrito anteriormente en la Sección C, empleando una muestra de 5 µl.

[0309] Para cada variante, se utilizó la proporción de las actividades de amilasa residual e inicial para calcular la estabilidad detergente del siguiente modo: Estabilidad detergente = [valor de t_{residual}] / [valor de t_{inicial}].

[0310] Se calculó el índice de rendimiento (PI) para cada muestra (variantes). El índice de rendimiento para la estabilidad detergente se determinó comparando la estabilidad detergente de la enzima variante con la de una enzima de referencia tratada de forma similar.

I. Índice de rendimiento

[0311] El índice de rendimiento (PI) compara el rendimiento o estabilidad de la variante y de la enzima de referencia en la misma concentración de proteínas. Además, se pueden calcular los valores teóricos por medio de los parámetros de la ecuación de Langmuir de la enzima estándar. Un índice de rendimiento (PI) que sea superior a 1 (PI >1) indica un rendimiento mejorado mediante una variante en comparación con la enzima de referencia, mientras que un PI de 1 (PI = 1) identifica una variante con el mismo rendimiento que la enzima de referencia, y un PI inferior a 1 (PI <1) identifica una variante con un peor rendimiento que el de la enzima de referencia.

Ejemplo 2

15 Generación de cepas de *Bacillus* que expresan CspAmy2-v1

[0312] En este ejemplo, se describe la construcción de cepas de *Bacillus subtilis* que expresan amilasa CspAmy2-v1 y variantes de esta (SEQ ID N.º 2). La amilasa CspAmy2-v1 es una variante de la amilasa CspAmy2 (SEQ ID N.º 1) que presenta una delección tanto de R178 como de G179 (esto es, Δ RG). CspAmy2 es una amilasa de un *Cytophaga* sp., cuya secuencia de nucleótido fue descrita por Chii-Ling *et al.* (2002) Appl. Environ. Microbiol. 68: 3651-3654. Se describió que CspAmy2-v1 presentaba una estabilidad térmica mejorada con respecto a CspAmy2 en Rong-Jen *et al.* (2003) Appl. Environ. Microbiol. 69: 2383-85.

[0313] Se produjo un fragmento de ADN sintético (SEQ ID N.º 7) que codifica CspAmy2-v1 mediante GeneArt AG (Ratisbona, Alemania) y sirvió como patrón de ADN para la construcción de cepas de *Bacillus subtilis* que expresaran amilasa CspAmy2-v1 y variantes de esta. El fragmento de ADN incluye una secuencia de nucleótidos de codón modificado que codifica la forma madura de la amilasa CspAmy2-v1 adyacente a una secuencia que codifica el péptido señal LAT (subrayado):

```

ATGAAACAACAAAAACGGCTTTACGCCGATTGCTGACGCTGTTATTTGCGCTCATCTTCTTGC
TGCCTCATTCTGCAGCTAGCGCAGCAGCGACAAACGGAACAATGATGCAGTATTTTCGAGTGGTA
TGTACCTAACGACGGCCAGCAATGGAACAGACTGAGAACAGATGCCCTTACTTGTCATCTGTT
GGTATTACAGCAGTATGGACACCGCCGGCTTATAAGGGCACGTCTCAAGCAGATGTGGGGTACG
GCCCCGTACGATCTGTATGATTTAGGCGAGTTTAATCAAAAAGGTACAGTCAGAACGAAGTATGG
CACAAAAGGAGAACTTAAATCTGCTGTTAACACGCTGCATTCAAATGGAATCCAAGTGTATGGT
GATGTCGTGATGAATCATAAAGCAGGTGCTGATTATACAGAAAACGTAACGGCGGTGGAGGTGA

```

ATCCGTCTAATAGAAATCAGGAAACGAGCGGCGAATATAATATTCAGGCATGGACAGGCTTCAA
 CTTTCCGGGCAGAGGAACAACGTATTCTAACTTCAAATGGCAGTGGTTCCATTTTGTATGGAACG
 GATTGGGACCAGAGCAGAAGCCTCTCTAGAATCTTCAAATTCACGGGAAAGGCGTGGGACTGGG
 AGGTTTCTTCAGAAAACGGAATTATGACTATCTGATGTACGCGGACATTGATTATGACCATCC
 GGATGTCGTGAATGAAATGAAAAAGTGGGGCGTCTGGTATGCCAACGAAGTTGGGTTAGATGGA
 TACAGACTTGACGCGGTCAAACATATTAATTTAGCTTTCTCAAAGACTGGGTGGATAACGCAA
 GAGCAGCGACGGGAAAAGAAATGTTTACGGTTGGCGAATATTGGCAAATGATTTAGGGGCCCT
 GAATAACTACCTGGCAAAGTAAATTACAACCAATCTCTTTTTGATGCGCCGTTGCATTACAAC
 TTTTACGCTGCCTCAACAGGGGTGGATATTACGATATGAGAAATATTCTTAATAACACGTTAG
 TCGCAAGCAATCCGACAAAGGCTGTTACGTTAGTTGAGAATCATGACACACAGCCTGGACAATC
 ACTGGAATCAACAGTCCAACCGTGGTTTAAACCGTTAGCTACGCGTTTATTCTCACGAGAAGC
 GGAGGCTATCCTTCTGTATTTTATGGAGATATGTACGGTACAAAAGGAACGACAACAAGAGAGA
 TCCCTGCTCTTAAATCTAAAATCGAACCTTTGCTTAAGGCTAGAAAAGACTATGCTTATGGAAC
 ACAGAGAGACTATATTGATAACCCGGATGTCATTGGCTGGACGAGAGAAGGGGACTCAACGAAA
 GCCAAGAGCGGTCTGGCCACAGTGATTACAGATGGGCCGGCGGTTCAAAAAGAATGTATGTTG
 GCACGAGCAATGCGGGTAAATCTGGTATGATTTGACAGGGAATAGAACAGATAAAAATCACGAT
 TGGAAAGCGATGGCTATGCAACATTTCTGTCAATGGGGCTCAGTTTCAGTATGGGTGCAGCAA

[0314] La forma madura del polipéptido CspAmy2-v1 producida a partir del vector pHPLT02-CspAmy2-v1 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 2.

5

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRRLTDAPYLSVGI TAVWTPPAYKGT SQADVGYGPYDLYDL
 GEFNQKGTVRTRKYGTKGELKSAVNNTLHNSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENVTADEVNPSNRNQE
 TSGEYNIQAWTGFNFPGRGTTYSNFKWQWFHFDGTDWDQSRSLSRIFKFTGKAWDWEVSSGENG
 YDYLMYADIDYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHIKFSFLKDWVNDNARAATGKEM
 FTVGEYWQNDL GALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAAS TGGGYDMRNILNNTLVASNPTKA
 VTLVENHDTQPGQSLESTVQPFKPLAYAFILTRSGGYPSVIFYGDMYGTKGTTTREPALKSKI
 EPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTREGDSTKAKSGLATVITDGPGGSKRMVVGTSNAGEI
 WYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPVNGGSVSVWVQQ

10

[0315] Para expresar CspAmy2-v1, el fragmento de ADN que codifica CspAmy2-v1 se clonó en el vector pHPLT02, una versión modificada del vector pHPLT (Solingen *et al.* (2001) *Extremophiles* 5:333-341) por GeneArt y se fusionó en el marco con el péptido señal *AmyL* (LAT) utilizando los sitios de restricción única *NheI* y *XhoI*, dando como resultado el plásmido pHPLT02-CspAmy2-v1. El vector de expresión pHPLT contiene el promotor LAT (Plat) de *B. licheniformis* y elementos adicionales de pUB110 (McKenzie *et al.* (1986) *Plasmid*, 15: 93-103), incluido un gen de replicasa (reppUB), un gen de resistencia a la neomicina/kanamicina (neo) y un marcador de resistencia a la bleomicina (bleo). Se empleó la mutagénesis de sitio dirigido (Stratagene) para cambiar los nucleótidos 5'-TCA-3' de serina 28 del péptido señal *AmyL* por los nucleótidos 5'-AGC-3' para introducir el sitio de restricción único *NheI*.

15

20

[0316] Una cepa adecuada de *B. subtilis* se transformó con ADN de plásmido pHPLT02-CspAmy2-v1 utilizando un método conocido en la técnica (WO 02/14490). Los transformantes de *B. subtilis* se seleccionaron en placas de agar que contenían agar infusión de corazón (Difco, n.º de Catalog. 244400, Lawrence, Kansas, EE. UU. y 10 mg/l de sulfato de neomicina (Sigma, N.º de Catalog. N-1876; contiene 732 µg de neomicina por mg, San Luis, Misuri, EE. UU.). El cultivo selectivo de los transformantes de *B. subtilis* que albergan el plásmido pHPLT02-CspAmy2-v1 se llevó a cabo en matraces de agitación a 37 °C durante ~65 h en medio MBD (medio semidefinido enriquecido basado en tampón MOP, con urea como fuente principal de nitrógeno, glucosa como fuente principal

de carbono, y complementado con un 1 % de soytina para un crecimiento celular sólido) conteniendo 5 mM de CaCl₂ y 10 ppm de neomicina). El cultivo resultó en la producción de amilasa CspAmy2-v1 secretada con actividad hidrolizadora de almidón.

Ejemplo 3

5 Generación de cepas de *Bacillus* que expresan variantes combinatorias de CspAmy2

[0317] En este ejemplo, se describe la construcción de cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformis* que expresan dos variantes combinatorias de CspAmy2 (CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6). CspAmy2-v5 es una variante de CspAmy2 con las mutaciones E187P, I203Y, G476K, y que carece de R178 y G179. CspAmy2-v6 es una variante de CspAmy2 con las mutaciones E187P, I203Y, G476K, R458N, T459S, D460T, y que carece de R178 y G179. Para la expresión de CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6, se crearon constructos de expresión mediante una combinación de síntesis genética y de PCR de fusión, empleando técnicas habituales.

[0318] Los constructos de expresión de CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6 se ligaron a un vector pICatH (como se describe, por ejemplo, en los documentos EP2428572 y US7968691) y se transformaron en células competentes de *B. subtilis* (*amyE* negativas) como se conoce en la técnica (WO 2002/014490). En estos clones, los fragmentos de ADN que codifican CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6 se fusionan en el marco con una secuencia que codifica el péptido señal de la amilasa de *B. licheniformis* (*amyL*), lo cual deriva en la secreción de las variantes de amilasa en el medio de cultivo. La expresión de CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6 en estos clones está controlada por el promotor de la amilasa de *B. licheniformis* (*amyL*) (Figuras 1A y 1B).

[0319] Los transformantes de *B. subtilis* se seleccionaron en placas de agar que contenían agar infusión de corazón (Difco) y 10 mg/l de sulfato de neomicina, 5 mg/l de cloranfenicol y azul de almidón (Sigma). Para cada constructo, se seleccionó un transformante con actividad hidrolizadora de almidón y se verificó la secuencia de los constructos de expresión de amilasa en pICatH mediante secuenciación de ADN (BaseClear, Países Bajos). Los plásmidos resultantes, pICatH-CspAmy2-v5 y pICatH-CspAmy2-v6, se aislaron de los clones de *B. subtilis* y se transformaron en células de *B. licheniformis* (*amyL* y *catH* negativas) y se integraron en el genoma según se describe en los documentos EP2428572 y US7968691. Tras la escisión de secuencias de vector, los constructos de expresión se amplificaron sometiendo a las cepas a un aumento gradual en la concentración de cloranfenicol de hasta 50 µg/ml. Las cepas de *B. licheniformis* mostraron halos en las placas de azul de almidón, indicando secreción de amilasa CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6 activa.

[0320] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-v5 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 8:

```
AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSVVGITAVWTPPAYKGT SQADVGYGPYDLYDL
GEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVN TLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENV TAVEVNP SNRNQE
TSGEYNIQAWTGFNF PGRGTTYSNFKWQWFHFDGTDWDQSRSLSRIFKFTGKAWDWPV SSENGN
YDYL MYADYDYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHIKFSFLKDWVDNARAATGKEM
FTVGEYWQNDLGALNNYLAKVNYNQS LFDAPLHYNFYAASTGGGYDMRNILNNTLVASNP TKA
VTLVENHDTQPGQSLESTVQPFWKPLAYAFILTRSGGYPSV FYGDMYGTKGTTTREIPALKSKI
EPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTREGDSTKAKSGLATVITDGP GGSKRMYVGT SNAGEI
WYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPV NKGSVSVWVQQ
```

[0321] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-v6 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 9:

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSSVGITAVWTPPAYKGTSSQADVGYGPYDLYDL
 GEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVNTLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENVTAVEVNPSNRNQE
 TSGEYNIQAWTGFNFPRGRTTYSNFKWQWFHFDGTDWDQSRSLSRIFKFTGKAWDWPVSSSENGN
 YDYLMYADYDYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHIKFSFLKDWVDNARAATGKEM
 FTVGEYWQNDL GALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAAS TGGGYDMRNILNNTLVASNPTKA
 VTLVENHDTQPGQSLESTVQPWFKPLAYAFILTRSGGYPSVFGDMYGTGKTTTREPALKSKI
 EPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTREGDSTKAKSGLATVITDGPGGSKRMVGTSNAGEI
 WYDLTGNNSTKIIIGSDGYATFPVVKGSVSVWVQQ

Ejemplo 4

Rendimiento de limpieza de variantes combinatorias de CspAmy2

- 5 **[0322]** El rendimiento de limpieza de CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6 purificadas se analizó en un ensayo de limpieza de micromuestras. Se perforó el almidón de arroz CFT CS-28 en muestras de algodón o almidón de maíz EMPA 161 en cretona de algodón (Center for Testmaterials, BV, Vlaardingen, Países Bajos) conteniendo un tinte indicador ligado al almidón para formar discos que medían 5,5 mm de diámetro. Se colocaron dos discos en cada pocillo de 3 placas de ensayo de no unión de 96 pocillos con fondo plano.
- 10 **[0323]** Ambas variantes (esto es, CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6), la molécula original (CspAmy2), y una α -amilasa de detergente de referencia comercial disponible en el mercado, esto es, PURASTAR® (AmyL; α -amilasa de *B. licheniformis*; Danisco US Inc.), se diluyeron en 0,5 mg/ml de tampón de dilución (50 mM MOPS, pH 7,2, 0,005 % de Tween), y a continuación se diluyeron a 2 ppm en una microplaca. Se transfirieron 200 μ l de estas muestras a la primera fila de cada placa de muestras. A continuación, se añadieron 100 μ l de tampón HEPES (25 mM de HEPES, pH 8,0, con 2 mM de CaCl_2 y 0,005 % de Tween-80) en cada pocillo de las 5 filas siguientes de las placas de muestras. A continuación, se transfirieron 100 μ l de las muestras de enzima diluidas desde la primera fila hasta la siguiente fila, se mezclaron adecuadamente, y se continuó con diluciones en serie hasta antes de la última fila, que sirvió como blancos. Cuando todas las filas contuvieron 100 μ l de solución, se añadieron 100 μ l de tampón en cada pocillo de la placa para dar como resultado volúmenes de 200 μ l por pocillo, y concentraciones de enzimas finales de 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625 y 0 ppm.
- 15
- 20 **[0324]** Las placas se incubaron a 25 °C con agitación a 1150 rpm durante 15 minutos. Se analizó el rendimiento de enzima mediante la cantidad de color liberado en la solución de lavado, que se cuantificó espectrofotométricamente a 488 nm mediante la transferencia de 150 μ l de la solución de lavado final a nuevas microplacas de unión al medio. Se sustrajo el blanco de las lecturas triplicadas y se promediaron. Los resultados del ensayo de eliminación de suciedad se muestran en la Figura 2. CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6 mostraron un rendimiento similar entre sí, y son significativamente mejores que la molécula original, CspAmy2, y mucho mejores que PURASTAR®.
- 25

Ejemplo 5

Análisis de estabilidad térmica de variantes combinatorias de CspAmy2

30 A. Estabilidad térmica en tampón

- [0325]** Se diluyeron además 0,5 mg/ml de materiales de partida de enzimas purificadas (esto es, CspAmy2-v5, CspAmy2-v6, CspAmy2), PURASTAR® (α -amilasa de *Bacillus licheniformis*), y ACE-QK (variante de α -amilasa TS-23 de *Bacillus* sp. descrita en US20120045817 y WO2010/115028) a 5 ppm en tampón de dilución (50 mM de MOPS, pH 7,2, 0,005 % de Tween). Se añadieron 50 μ l de cada enzima en cada una de las 9 tiras de tubos para PCR y se sellaron. Se incubó una muestra «no estresada» de cada enzima a temperatura ambiente a lo largo de la duración del experimento. Las otras 8 muestras se incubaron en un termociclador a 45, 55, 65, 70, 75, 80, 85, o 90 °C durante 15 minutos. A continuación, se transfirieron las muestras por triplicado a microplacas, y se analizó la actividad de α -amilasa para las muestras no sometidas a estrés y sometidas a estrés empleando el reactivo Ceralpha (Megazyme, Inc.). Se calculó la actividad residual dividiendo la actividad de cada amilasa tras el estrés térmico por la actividad de esa amilasa no sometida a estrés. Los resultados se representan en la Figura 3. CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6 mostraron un aumento de la estabilidad térmica a concentraciones bajas de calcio en comparación con el resto de enzimas analizadas.
- 35
- 40

B. Estabilidad térmica en tampón con calcio añadido

- 45 **[0326]** Al igual que anteriormente, se diluyeron además 0,5 mg/ml de materiales de partida de enzimas purificadas a 5 ppm en tampón de dilución, en este caso complementado con 5 mM de cloruro de calcio (esto es, 50 mM de MOPS, pH 7,2, 0,005 % de Tween, 5 mM de cloruro de calcio). El experimento se llevó a cabo según

se ha descrito anteriormente. Los resultados se representan en la Figura 4. CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6 mostraron una estabilidad térmica similar en comparación con el resto de enzimas analizadas.

C. Estabilidad térmica en detergente líquido

5 **[0327]** Los detergentes comerciales EPSIL™ Perfect (McBride) y OMO™ Color (Unilever) se inactivaron por calor a 90 °C durante 4 horas para eliminar las actividades de enzimas existentes. Tras la inactivación, la actividad de CspAmy2-v5, CspAmy2-v6, CspAmy2, PURASTAR® y ACE-QK en los detergentes inactivados por calor se midió empleando los ensayos de Suc-AAPF-pNA y Ceralpha para asegurar que se ha suprimido cualquier actividad de proteasa y de amilasa, respectivamente. Las soluciones de 10 % de estos dos detergentes líquidos se realizaron en agua.

10 **[0328]** Se añadieron 100 µl de cada material de partida de enzima purificada de 0,5 mg/ml en 400 µl de las soluciones de 10 % de detergente. Se añadieron 50 µl de estas muestras en tiras de tubos para PCR y se incubaron a las temperaturas anteriormente mencionadas durante 15 minutos cada una, según se ha descrito anteriormente. Al extraer las muestras del termociclador, y antes de medir la actividad de α-amilasa, se realizó una dilución 1:20 adicional en tampón de dilución. Como se ha indicado anteriormente, se calculó la actividad residual dividiendo la actividad de cada amilasa tras el estrés detergente y térmico por la actividad de esa amilasa no sometida a estrés. Los resultados se representan en la Figura 5 (OMO™) y en la Figura 6 (EPSIL™). CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6 mostraron mejor estabilidad térmica en comparación con la enzima original y con las otras enzimas analizadas.

Ejemplo 6

20 **Generación de cepas de *Bacillus* que expresan variantes combinatorias de CspAmy2**

A. Diseño de variantes combinatorias

25 **[0329]** Se construyeron variantes de CspAmy2-v1 codificadas por ADN sintético que presentaban diversas combinaciones de sustituciones en las posiciones N126, Y150, F153, L171, T180, E187, I203 y S241 (que se refieren a SEQ ID N.º 1) mediante GeneArt y se liberaron como plásmidos transformados en un huésped de *B. subtilis*, según se describe en el Ejemplo 2 en el caso de CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6. Con sustituciones únicas en cada uno de los ocho sitios, fueron posibles 256 combinaciones. Se seleccionaron las sustituciones específicas de N126Y, Y150H, F153W, L171N, T180H, E187P, I203Y y S241Q, y se realizaron y analizaron diez de las posibles combinaciones. Los nombres de las variantes y los residuos de aminoácidos presentes en cada una de las ocho posiciones se representan en la Tabla 2. Para mayor claridad, los nombres completos de las variantes de la tabla son CspAmy2-C16A - CspAmy2-C16J. En algunas tablas y figuras, los nombres de las variantes están abreviados, pero siempre quedan claros a raíz de la descripción. Se realizaron otras variantes de CspAmy2-v1 que presentan adicionalmente las mutaciones E187P o S241Q, y se designaron CspAmy2-v1-E187P o CspAmy2-v1-S241Q, respectivamente.

35 **Tabla 2:** Combinaciones de mutaciones analizadas

Nombre	N126	Y150	F153	L171	T180	E187	I203	S241
C16A	Y	Y	F	L	T	P	Y	S
C16B	Y	Y	F	L	T	E	Y	Q
C16C	Y	Y	W	L	T	P	Y	S
C16D	Y	Y	W	L	T	E	Y	Q
C16E	Y	Y	W	L	H	P	Y	S
C16F	Y	Y	W	L	H	E	Y	Q
C16G	Y	H	W	N	T	P	Y	S
C16H	Y	H	W	N	T	E	Y	Q
C16I	Y	H	W	N	H	P	Y	S

Nombre	N126	Y150	F153	L171	T180	E187	I203	S241
C16J	Y	H	W	N	H	E	Y	Q

B. Construcción de cepas de *Bacillus* que expresan variantes combinatorias de CspAmy2

5 [0330] El ADN del plásmido pHPLT02-CspAmy2-v1 (que codifica CspAmy2-v1, véase Ejemplo 2) sirvió como patrón para producir las bibliotecas combinatorias adicionales en sitios preseleccionados en la región madura. El vector de expresión pHPLT02 se derivó del vector pHPLT. El vector de expresión pHPLT contiene el promotor LAT (Plat) de *B. licheniformis* y elementos adicionales de pUB110 (McKenzie *et al.* (1986) Plasmid, 15: 93-103), incluido un gen de replicasa (reppUB), un gen de resistencia a la neomicina/kanamicina (neo) y un marcador de resistencia a la bleomicina (bleo). GeneArt (Ratisbona, Alemania) creó bibliotecas combinatorias en las posiciones descritas empleando sus protocolos estándar. Los codones correspondientes para cada sitio de interés se sustituyeron con codones para al menos un aminoácido de tipo no natural. Las mezclas de pHPLT02-CspAmy2-v1 con codones mutagenizados se utilizaron para transformar células competentes de *B. subtilis* como se conoce en la técnica (WO 2002/014490) para generar las bibliotecas combinatorias de CspAmy2-v1. Las mezclas de transformación se colocaron en placas de agar infusión de corazón (HI) que contenían 10 mg/l de sulfato de neomicina. Para cada biblioteca, se escogieron y cultivaron colonias bacterianas únicas en medio líquido de TSB (caldo a base de triptona y soja) con una selección de 10 mg/ml de neomicina para el posterior aislamiento de ADN y el análisis de secuencia genética. Se generaron variantes y se identificaron como miembros de esta biblioteca combinatoria. El cultivo selectivo de las variantes se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos a 37 °C durante 68 h en medio MBD (medio semidefinido enriquecido basado en tampón MOP, con urea como fuente principal de nitrógeno, glucosa como fuente principal de carbono, y complementado con un 1 % de soytona para un crecimiento celular sólido).

20 [0331] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-16A se muestra a continuación como SEQ ID N.º 10:

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSVVGITAVWTPPAYKGT SQADVGYGPYDLYDL
 GEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVNTLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENVTAVEVNPSNRYQE
 TSGEYNIQAWTGFNFPGRGTTYSNFKWQWFHFDGTDWDQSRSLSRIFKFTGKAWDWPVSSSENGN
 YDYLMYADYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHIKFSFLKDWVDNARAATGKEM
 FTVGEYWQNDLGALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAASTGGGYDMRNILNNTLVASNPTKA
 VTLVENHDTQPGQSLESTVQPWFKPLAYAFILTRSGGYPSVFYGDYMGTKGTTTREIPALKSKI
 EPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTREGDSTKAKSGLATVITDGPGGSKRMYVGTSNAGEI
 WYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPVNGGSSVSVWVQQ

25

[0332] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-16B se muestra a continuación como SEQ ID N.º 11:

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSVVGITAVWTPPAYKGT SQADVGYGPYDLYDL
 GEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVNTLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENVTAVEVNPSNRYQE
 TSGEYNIQAWTGFNFPGRGTTYSNFKWQWFHFDGTDWDQSRSLSRIFKFTGKAWDWEVSSSENGN
 YDYLMYADYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHIKFSFLKDWVDNARAATGKEM
 FTVGEYWQNDLGALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAASTGGGYDMRNILNNTLVASNPTKA
 VTLVENHDTQPGQSLESTVQPWFKPLAYAFILTRSGGYPSVFYGDYMGTKGTTTREIPALKSKI
 EPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTREGDSTKAKSGLATVITDGPGGSKRMYVGTSNAGEI
 WYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPVNGGSSVSVWVQQ

30

[0333] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-16C se muestra a continuación como SEQ ID N.º 12:

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSSVGITAVWTPPAYKGT SQADVGYGPYDLYDL
GEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVN TLH SNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENVTAVEVNP SNRYQE
TSGEYNIQAWTGFNFPGRGTTYSNWKQWFHFDGTDWDQSRSLSRIFKFTGKAWDWPV SSENGN
YDYLMYADYDYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHIKFSFLKDWVDNARAATGKEM
FTVGEYWQNDLGALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAASTGGGYDMRNILNNTLVASNP TKA
VTLVENHDTQPGQSLESTVQPWFKPLAYAFILTRSGGYPSVFYGD MYGKGT TTTREIPALKSKI
EPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTREGDSTKAKSGLATVITDGP GGSKRMYVGT SNAGEI
WYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPVNGGSVSVWVQQ

5 **[0334]** La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-16D se muestra a continuación como SEQ ID N.º 13:

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSSVGITAVWTPPAYKGT SQADVGYGPYDLYDL
GEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVN TLH SNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENVTAVEVNP SNRYQE
TSGEYNIQAWTGFNFPGRGTTYSNWKQWFHFDGTDWDQSRSLSRIFKFTGKAWDWEV SSENGN
YDYLMYADYDYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHIKQFLKDWVDNARAATGKEM
FTVGEYWQNDLGALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAASTGGGYDMRNILNNTLVASNP TKA
VTLVENHDTQPGQSLESTVQPWFKPLAYAFILTRSGGYPSVFYGD MYGKGT TTTREIPALKSKI
EPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTREGDSTKAKSGLATVITDGP GGSKRMYVGT SNAGEI
WYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPVNGGSVSVWVQQ

10 **[0335]** La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-16E se muestra a continuación como SEQ ID N.º 14:

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSSVGITAVWTPPAYKGT SQADVGYGPYDLYDL
GEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVN TLH SNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENVTAVEVNP SNRYQE
TSGEYNIQAWTGFNFPGRGTTYSNWKQWFHFDGTDWDQSRSLSRIFKFH GKAWDWPV SSENGN
YDYLMYADYDYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHIKFSFLKDWVDNARAATGKEM
FTVGEYWQNDLGALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAASTGGGYDMRNILNNTLVASNP TKA
VTLVENHDTQPGQSLESTVQPWFKPLAYAFILTRSGGYPSVFYGD MYGKGT TTTREIPALKSKI
EPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTREGDSTKAKSGLATVITDGP GGSKRMYVGT SNAGEI
WYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPVNGGSVSVWVQQ

15 **[0336]** La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-16F se muestra a continuación como SEQ ID N.º 15:

ES 2 676 895 T3

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSSVGITAVWTPPAYKGT SQADVGYPYDLYDL
GEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVN TLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENV TAVEVNPSNRYQE
TSGEYNIQAWTGFNFPGRGTTYSNWKQWFHFDGTDWDQSRSLSRIFK FHKAWDWEVSS ENGN
YDYLLMYADYDYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHIKFQFLKDWVDNARAATGKEM
FTVGEYWQNDLGALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAASTGGGYDMRNILNNTLVASNP TKA
VTLVENHDTQPGQSLESTVQPWFKPLAYAFILTRSGGYPSVFYGD MYGKGT TTTREIPALKSKI
EPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTREGDSTKAKSGLATVITDGP GGSKRMYVGT SNAGEI
WYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPVNGGSVSVWVQQ

[0337] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-16G se muestra a continuación como SEQ ID N.º 16:

5

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSSVGITAVWTPPAYKGT SQADVGYPYDLYDL
GEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVN TLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENV TAVEVNPSNRYQE
TSGEYNIQAWTGFNFPGRGTTYSNWKQWFHFDGTDWDQSRSNSRIFK FTGKAWDWPVSS ENGN
YDYLLMYADYDYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHIKFSFLKDWVDNARAATGKEM
FTVGEYWQNDLGALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAASTGGGYDMRNILNNTLVASNP TKA
VTLVENHDTQPGQSLESTVQPWFKPLAYAFILTRSGGYPSVFYGD MYGKGT TTTREIPALKSKI
EPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTREGDSTKAKSGLATVITDGP GGSKRMYVGT SNAGEI
WYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPVNGGSVSVWVQQ

[0338] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-16H se muestra a continuación como SEQ ID N.º 17:

10

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSSVGITAVWTPPAYKGT SQADVGYPYDLYDL
GEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVN TLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENV TAVEVNPSNRYQE
TSGEYNIQAWTGFNFPGRGTTYSNWKQWFHFDGTDWDQSRSNSRIFK FTGKAWDWEVSS ENGN
YDYLLMYADYDYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHIKFQFLKDWVDNARAATGKEM
FTVGEYWQNDLGALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAASTGGGYDMRNILNNTLVASNP TKA
VTLVENHDTQPGQSLESTVQPWFKPLAYAFILTRSGGYPSVFYGD MYGKGT TTTREIPALKSKI
EPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTREGDSTKAKSGLATVITDGP GGSKRMYVGT SNAGEI
WYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPVNGGSVSVWVQQ

[0339] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-16I se muestra a continuación como SEQ ID N.º 18:

15

ES 2 676 895 T3

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSSVGITAVWTPPAYKGT SQADVGYGPYDLYDL
GEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVN TLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENV TAVEVNPSNRYQE
TSGEYNIQAWTGFNF PGRGTTTHSNWKQWFHFDGTDWDQSRSNSRIFKFHGKAWDWPV SSENGN
YDYLMYADYDYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHIKFSFLKDWVDNARAATGKEM
FTVGEYWQNDLGALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAAS TGGGYDMRNILNNTLVASNPTKA
VTLVENHDTQPGQSLESTVQPWFKPLAYAFILTRSGGYPSV FYGDMYGTKGTTTREIPALKSKI
EPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTREGDSTKAKSGLATVITDGP GGSKRMYVGT SNAGEI
WYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPVNGGSVSVWVQQ

[0340] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-16J se muestra a continuación como SEQ ID N.º 19:

5

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSSVGITAVWTPPAYKGT SQADVGYGPYDLYDL
GEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVN TLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENV TAVEVNPSNRYQE
TSGEYNIQAWTGFNF PGRGTTTHSNWKQWFHFDGTDWDQSRSNSRIFKFHGKAWDWEV SSENGN
YDYLMYADYDYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHIKQFLKDWVDNARAATGKEM
FTVGEYWQNDLGALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAAS TGGGYDMRNILNNTLVASNPTKA
VTLVENHDTQPGQSLESTVQPWFKPLAYAFILTRSGGYPSV FYGDMYGTKGTTTREIPALKSKI
EPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTREGDSTKAKSGLATVITDGP GGSKRMYVGT SNAGEI
WYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPVNGGSVSVWVQQ

[0341] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-v1-E187P se muestra a continuación como SEQ ID N.º 20:

10

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSSVGITAVWTPPAYKGT SQADVGYGPYDLYDL
GEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVN TLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENV TAVEVNPSNRNQE
TSGEYNIQAWTGFNF PGRGTTYSNFKWQWFHFDGTDWDQSRSLSRIFKFTGKAWDWPV SSENGN
YDYLMYADIDYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHIKFSFLKDWVDNARAATGKEM
FTVGEYWQNDLGALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAAS TGGGYDMRNILNNTLVASNPTKA
VTLVENHDTQPGQSLESTVQPWFKPLAYAFILTRSGGYPSV FYGDMYGTKGTTTREIPALKSKI
EPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTREGDSTKAKSGLATVITDGP GGSKRMYVGT SNAGEI
WYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPVNGGSVSVWVQQ

[0342] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-v1-S241Q se muestra a continuación como SEQ ID N.º 21:

15

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSSVGITAVWTPPAYKGTSSQADVGYGPYDLYDL
 GEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVNTLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENVTAVEVNPSSNRNQE
 TSGEYNIQAWTGFNFPGRTTYSNFKWQWFHFDGTDWDQSRSLSRIFKFTGKAWDWEVSSSENGN
 YDYLMYADIDYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKH IKFQFLKDWVDNARAATGKEM
 FTVGEYWQNDL GALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAAS TGGGYDMRNILNNTLVASNPTKA
 VTLVENHDTQPGQSLESTVQPWFKPLAYAFILTRSGGYPSVFYGDYMYGKGTITREIPALKSKI
 EPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTREGDSTKAKSGLATVITDGPGGSKRMYVGTSNAGEI
 WYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPVNGGSVSVWVQQ

Ejemplo 7

Evaluación de estabilidad térmica de variantes de CspAmy2

5 **[0343]** Las variantes combinatorias de CspAmy2-C16A - CspAmy2-C16J del Ejemplo 5 (esto es, "C16A" - "C16G" o "16A - 16G," respectivamente) se analizaron para determinar su estabilidad térmica en las siguientes condiciones:

1. 50 mM de acetato de potasio, pH 5,7, 0,125 mM de CaCl₂, 2,2 mM de NaCl, 85 °C.
- 10 2. 50 mM de acetato de potasio, pH 5,0, 0,125 mM de CaCl₂, 2,2 mM de NaCl, 70 °C.
3. 50 mM de acetato de potasio, pH 4,5, 0,125 mM de CaCl₂, 2,2 mM de NaCl, 65 °C.

15 **[0344]** Se prepararon soluciones madre de cada variante diluyendo variantes purificadas a una concentración de proteínas final de 1 mg/ml en agua milli-Q, a continuación, se diluyó además cada variante (200 veces) en cada solución tampón descrita anteriormente (la dosis final de enzimas es de 5 µg/ml). Las soluciones de enzimas diluidas se precalentaron a una temperatura adecuada durante dos minutos, y a continuación se enfriaron en hielo para interrumpir cualquier agregado de proteínas. Se transfirieron 50 µl de cada solución de enzimas a tiras de tubos para PCR de 0,2 ml, que se calentaron a la temperatura apropiada (con base en el pH del tampón) y se permitió su incubación durante un período de dos horas. A continuación, se colocaron las muestras en un baño de agua con hielo para finalizar el período de estrés térmico.

20 **[0345]** Una vez recogidos todos los puntos temporales para cada tampón, se determinó la actividad residual empleando el ensayo Ceralpha, según se describe en el Ejemplo 1. Para cada variante, se llevaron a cabo dos experimentos independientes de inactivación en función del tiempo. Las representaciones de actividad residual frente al tiempo se basaron en una única ecuación exponencial decreciente para determinar una constante (k) de decrecimiento. La semivida de decrecimiento se definió como ln(2)/k. Estos experimentos se llevaron a cabo por duplicado para cada variante.

25 **[0346]** El índice de rendimiento (PI) para cada variante se definió como la proporción de la semivida de la variante y la semivida de una molécula original de referencia. Para las variantes C16A, C16C, C16E, C16G y C16I, la molécula de referencia era CspAmy2-v1-E187P. Para las variantes C16B, C16D, C16F, C16H y C16J, la molécula de referencia era CspAmy2-v1-S241Q. Las semividas e índices de rendimiento relativos se muestran en la tabla de la Figura 7. Otros experimentos mostraron que la estabilidad de C16D era similar a la de STAINZYME®, mientras que la estabilidad de C16F era mayor que la de STAINZYME® (no representada). En las Figuras 8-10, respectivamente, se representa de forma gráfica el rendimiento relativo de las variantes combinatorias con pH 4,5 y a 65 °C, con pH 5,0 y a 70 °C, y con pH 5,7 y a 85 °C. Todas las variantes C16A-J eran más estables que sus respectivas moléculas originales.

Ejemplo 8

Reducción de la viscosidad utilizando variantes de CspAmy2

35 **[0347]** Las variantes combinatorias CspAmy2-C16A - CspAmy2-C16J del Ejemplo 5 se analizaron para determinar su capacidad para reducir la viscosidad de una solución de almidón, como medida de la actividad de hidrólisis de almidón. Los experimentos de viscosidad se llevaron a cabo empleando un analizador rápido de viscosidad (Newport Scientific; en el presente documento, «RVA») con botes lisos lavados de 38 mm x 68 mm
 40 (Parte n.º AA0384001) y una paleta de doble borde (Parte n.º NS101783). La obtención de datos y el análisis se llevaron a cabo con Thermocline para Windows (versión 3.11; (Newport Scientific)). Inmediatamente antes de cada operación, se prepararon 33 g de 25 % de sólidos secos (ds) de suspensión de harina de maíz en un bote de RVA del modo siguiente: se pesaron 9,17 g de harina de maíz (con un contenido de humedad del 11,8 %) en una balanza analítica y se mezclaron con 23,83 g de agua desionizada. Se ajustó el pH de la muestra con 0,0828
 45 ml de ácido sulfúrico 1N (para pH 5,8) o 0,285 ml de ácido sulfúrico 1N (para pH 5,0). Se incorporó la enzima en una dosis apropiada, y se colocó el bote en el viscosímetro. Todas las operaciones tuvieron una duración de 10

minutos, con una rampa de temperatura a 85 °C durante 80 segundos seguida por un mantenimiento de la temperatura a 85 °C durante el resto de la operación. Se analizó cada enzima en tres dosis. Las respuestas a la dosis se calcularon para dos partes de la curva de viscosidad. El máximo de viscosidad se define como la viscosidad máxima que se alcanza durante el experimento, y la viscosidad final se define como la lectura de viscosidad al final del experimento. Debido a que la viscosidad presenta una relación recíproca con la dosis de enzimas, las curvas de respuesta a la dosis se linealizaron representando 1/viscosidad (también denominada fluidez) frente a la dosis de enzima. Las pendientes de estas curvas se utilizaron como medida cuantitativa de la actividad específica de cada variante. El índice de rendimiento (PI) para cada variante se definió como la proporción de la actividad específica de la variante y la actividad específica de una molécula original de referencia. Para las variantes CspAmy2-C16A, CspAmy2-C16C, CspAmy2-C16E, CspAmy2-C16G y CspAmy2-C16I, la molécula de referencia es CspAmy2-v1-E187P. Para las variantes CspAmy2-C16B, CspAmy2-C16D, CspAmy2-C16F, CspAmy2-C16H y CspAmy2-C16J, la molécula de referencia es CspAmy2-v1-S241Q. El rendimiento de reducción de la viscosidad se muestra en las Tablas 3 y 4.

15 **Tabla 3:** Mejoras en la reducción de viscosidad en pH 5,8

	Fluidez máxima/mg de enzima	PI máximo	Fluidez final/mg de enzima	PI final
C16A	0,0044	1,10	0,17	1,99
C16B	0,0047	1,18	0,17	1,47
C16C	0,0048	1,20	0,17	1,96
C16D	0,0049	1,22	0,18	1,53
C16E	0,0043	1,08	0,18	2,12
C16F	0,0044	1,10	0,18	1,56
C16G	0,0051	1,28	0,17	1,99
C16H	0,0045	1,11	0,17	1,44
C16I	0,0047	1,19	0,19	2,16
C16J	0,0050	1,25	0,19	1,65
E187P	0,0040	1,00	0,09	1,00
S241Q	0,0040	1,00	0,12	1,00

Tabla 4: Mejoras en la reducción de viscosidad en pH 5,0

	Fluidez máxima/mg de enzima	PI máximo	Fluidez final/mg de enzima	PI final
C16A	0,0180	1,27	0,17	1,96
C16B	0,0065	1,27	0,14	1,80
C16C	0,0061	1,24	0,19	2,08
C16D	0,0062	1,20	0,16	1,97
C16E	0,0065	1,33	0,19	2,16
C16F	0,0061	1,18	0,17	2,16

	Fluidez máxima/mg de enzima	PI máximo	Fluidez final/mg de enzima	PI final
C16G	0,0072	1,46	0,19	2,10
C16H	0,0063	1,23	0,16	1,98
C16I	0,0067	1,35	0,20	2,23
C16J	0,0069	1,35	0,19	2,36
E187P	0,0049	1,00	0,09	1,00
S241Q	0,0051	1,00	0,08	1,00

EJEMPLO 9

Rendimiento de limpieza y estabilidad detergente de variantes de CspAmy2

A. Rendimiento de limpieza de variantes de CspAmy2

5 **[0348]** Se analizó el rendimiento de limpieza de las variantes combinatorias CspAmy2-C16A - CspAmy2-C16J del Ejemplo 5 en un ensayo de limpieza de micromuestras utilizando almidón de arroz CS-28 de CFT en muestras de algodón. El ensayo se llevó a cabo usando sobrenadantes de cultivo. La concentración de proteínas de los sobrenadantes se cuantificó empleando HPLC. El equipo empleado para este ensayo incluía un robot Biomek FX (Beckman Coulter), un lector de microplacas SpectraMAX (tipo 340-Dispositivos moleculares) y una incubadora/agitador iEMS (Thermo Scientific). El reactivo y las soluciones utilizadas fueron:

- 1) Micromuestras CS-28 (almidón de arroz, de color);
- 2) 10 mM de HEPES, 2 mM de CaCl₂, 0,005 % de tampón TWEEN 80, pH 8,0, conductividad 1 mS/cm;
- 3) 50 mM de MOPS en pH 7,15, 0,005 % de TWEEN 80.

15 **[0349]** Las micromuestras CS-28 con 5,5 mm de diámetro circular fueron proporcionadas por el Center for Testmaterials (CFT, Vlaardingen, Países Bajos). Se colocaron dos micromuestras en cada pocillo de una microplaca de poliestireno con fondo plano de 96 pocillos Corning 9017. Los sobrenadantes de cultivo se diluyeron veinte veces en 50 mM de MOPS con pH 7,15, 0,005 % de TWEEN 80.

20 **[0350]** La incubadora/agitador se configuró a 25 °C (temperatura ambiente). Se añadieron 178,5 µl de tampón HEPES, respectivamente, en cada pocillo de la microplaca que contenía las micromuestras y posteriormente se añadió 1,5 µl de solución diluida de enzimas en cada pocillo, dando como resultado un volumen total de 180 µl/pocillo. La microplaca se selló con un sellado de placa y se colocó en la incubadora/agitador iEMS y se incubó durante 15 minutos a 1150 rpm a 25 °C. Tras la incubación en las condiciones adecuadas, se transfirieron 100 µl de solución de cada pocillo a una nueva microplaca, y se midió la absorbancia a 488 nm utilizando un espectrofotómetro para microplacas. Se incluyeron controles que contenían dos micromuestras y tampón, pero no enzima, para la sustracción del rendimiento de limpieza de fondo.

25 **[0351]** Cada valor de absorbancia se corrigió mediante la sustracción del blanco (obtenido tras la incubación de micromuestras en ausencia de enzima), y la absorbancia resultante proporcionó una medida de la actividad hidrolítica. Se calculó un índice de rendimiento (PI) para cada muestra en comparación con CspAmy2-v1, suponiendo una respuesta lineal en el rango del ensayo empleado. Los resultados se representan en la Tabla 4.1.

B. Estabilidad detergente de variantes de CspAmy2

35 **[0352]** La estabilidad detergente de las variantes de CspAmy2 adicionales se determinó midiendo su actividad tras la incubación en condiciones definidas, en presencia de una mezcla de 10 % de detergente (detergente Persil Color Gel adquirido comercialmente, Henkel (Düsseldorf, Alemania), adquirido en 2011). El detergente se inactivó por calor antes de su uso, y las actividades de amilasa inicial y residual se determinaron empleando el ensayo de α-amilasa Ceralpha. El equipo empleado para este ensayo incluía un robot Biomek FX (Beckman Coulter); un lector de microplacas SpectraMAX (tipo 340-Dispositivos moleculares), una máquina de PCR Tetrad2DNA Engine (Biorad) y una incubadora/agitador iEMS (Thermo Scientific). Las soluciones de reactivo utilizadas fueron las siguientes:

- 40 1) Sustrato de p-nitrofenil maltoheptaósido (BPNPG7) (kit Ceralpha HR de Megazyme);
- 2) Detergente líquido (Persil Color Gel, inactivado por enzimas mediante calor durante 4 h a 90 °C);
- 3) 50 mM de MOPS, 0,1 mM de CaCl₂, 0,005 % de tampón TWEEN®80, pH 7 (tampón de dilución);

- 4) Solución de 10 % de detergente diluida en tampón de dilución;
 5) 200 mM de ácido bórico/tampón NaOH, pH 10 (tampón de STOP)
 6) Sobrenadantes de cultivo de amilasa diluidos ocho veces en 50 mM de MOPS con pH 7,15, 0,1 mM de CaCl₂ conteniendo 0-100 µg/ml de proteína

5 **[0353]** Se añadieron 80 µl de una solución de 10 % de detergente en una placa de PCR de 96 pocillos y se mezclaron con 20 µl del sobrenadante de cultivo diluido. Se diluyó una muestra de la placa de PCR 10X en tampón de dilución y se utilizó una alícuota de 5 µl de esta dilución para determinar la actividad de amilasa inicial. La placa de PCR se incubó en un bloque de PCR Tetrad a 80,5 °C durante 5 minutos. Tras la incubación, la mezcla detergente-enzima se diluyó 10X en tampón de dilución y se midió la actividad residual. La actividad de amilasa inicial ($t_{inicial}$) y residual ($t_{residual}$) se determinó por triplicado mediante el ensayo de α -amilasa Ceralpha utilizando muestras de 5 µl.

10 **[0354]** Para cada variante, se utilizó la proporción de las actividades de amilasa residual e inicial para calcular la estabilidad detergente del siguiente modo: Estabilidad detergente = [valor de $t_{residual}$] / [valor de $t_{inicial}$]. Se calculó el índice de rendimiento (PI) para cada muestra (variantes). El índice de rendimiento para la estabilidad detergente se determinó comparando la estabilidad detergente de la variante de enzima con la de la enzima CspAmy2-v1 tratada de forma similar. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Rendimiento de limpieza y estabilidad de variantes de CspAmy2

Variante	Índice de rendimiento	
	Limpieza	Estabilidad
CspAmy2-v1	1	1
CspAmy2-C16B	1,02	2,51
CspAmy2-C16D	1,32	2,37
CspAmy2-C16F	1,25	2,41
CspAmy2-C16H	1,2	1,17
CspAmy2-C16J	1,06	0,83

20 EJEMPLO 10

Generación de cepas de *Bacillus* que expresan variantes combinatorias de CspAmy2

A. Diseño de variantes combinatorias

25 **[0355]** Se construyó ADN sintético que codificaba dos variantes de CspAmy2 adicionales mediante GeneArt y se liberaron como plásmidos transformados en un huésped de *B. subtilis*, según se describe en el Ejemplo 2 para CspAmy2-v5 y CspAmy2-v6. CspAmy2 v171 es una variante de CspAmy2 que presenta las mutaciones T180D, E187P, I203Y, G476K, y que carece de R178 y G179. CspAmy2 v172 es una variante de CspAmy2 que presenta las mutaciones N126Y, T180D, E187P, I203Y, G476K, y que carece de R178 y G179.

[0356] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-v171 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 22:

30

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSSVGITAVWTPPAYKGT SQADVGYGPYDLYDL
 GEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVNTLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENVTAVEVNPSNRNQE
 TSGEYNIQAWTGFNFPGRGTTYSNFKWQWFHFDGTDWDQSRSLSRIFKFDGKAWDWPVSSSENGN
 YDYLMYADYDYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHIKFSFLKDWVDNARAATGKEM
 FTVGEYWQNDL GALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAASTGGGYDMRNILNNTLVASNPTKA
 VTLVENHDTQPGQSLESTVQPWFKPLAYAFILTRSGGYPSVFYGDYMGTKGTTTREPALKSKI
 EPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTREGDSTKAKSGLATVITDGPGGSKRMVVGTSNAGEI
 WYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPVKNKGSVSVWVQQ

[0357] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-v172 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 23:

5

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSSVGITAVWTPPAYKGT SQADVGYGPYDLYDL
 GEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVNTLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENVTAVEVNPSNRYQE
 TSGEYNIQAWTGFNFPGRGTTYSNFKWQWFHFDGTDWDQSRSLSRIFKFDGKAWDWPVSSSENGN
 YDYLMYADYDYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHIKFSFLKDWVDNARAATGKEM
 FTVGEYWQNDL GALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAASTGGGYDMRNILNNTLVASNPTKA
 VTLVENHDTQPGQSLESTVQPWFKPLAYAFILTRSGGYPSVFYGDYMGTKGTTTREPALKSKI
 EPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTREGDSTKAKSGLATVITDGPGGSKRMVVGTSNAGEI
 WYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPVKNKGSVSVWVQQ

Ejemplo 11

Análisis de estabilidad térmica de variantes combinatorias de CspAmy2

10 **[0358]** La estabilidad detergente de limpieza de CspAmy2-v171 y CspAmy2-v172 se comparó con la de CspAmy2-v5, y ACE-QK, según se describe en el Ejemplo 5. Los resultados se representan en la Figura 11. La estabilidad de CspAmy2-v172 era mayor que la del resto de enzimas analizadas.

Ejemplo 12

Beneficio de limpieza de una variante combinatoria de CspAmy2 en lavavajillas a mano

15 **[0359]** El beneficio de limpieza de una variante de CspAmy2 se comparó con el de una α -amilasa disponible comercialmente [STAINZYME® (Novozymes A/S)] en una aplicación de lavavajillas a mano. En un ensayo que pretende simular el lavado a mano, se añadió un 0,01 % (p/p) de enzima activa (CspAmy2-v6, STAINZYME®, o ninguna enzima como control) al detergente para ropa European Dreft (1 g/l en agua; Procter & Gamble, Cincinnati, Ohio, EE. UU.) y se incubó en presencia de monitor de almidón DM77 (es decir, placas de melamina
 20 ADW del Center for Test Materials CFT BV de Vlaardingen, Países Bajos) a 40 °C con agitación en un launderómetro. Los resultados se representan en la Figura 12. CspAmy2-v5 presentó un rendimiento de limpieza muy superior al de STAINZYME® por lo que respecta a la tasa de limpieza observada y al punto de finalización alcanzado. De forma significativa, la tasa de limpieza alcanzada por CspAmy2-v5 fue tan rápida que se
 25 observaron beneficios en un período de tiempo relevante para las aplicaciones de lavavajillas a mano (esto es, aproximadamente 30 segundos). Estos resultados indican que las variantes de CspAmy2 poseen potencial como aditivos para composiciones de lavavajillas a mano.

Ejemplo 13

Beneficio de limpieza de una variante combinatoria de CspAmy2 en lavavajillas automático

30 **[0360]** El beneficio de limpieza de una variante de CspAmy2 se comparó con el de dos α -amilasas de referencia comercial (esto es, STAINZYME® y POWERASE®) en una aplicación de lavavajillas automático (ADW). Los ensayos de limpieza se llevaron a cabo en un lavavajillas convencional Miele 6382 utilizando un ciclo normal (50 °C y 60 minutos) con agua que presentaba una dureza de 21 GH y 37,5 FH. Se utilizaron 20 g de detergente en

polvo ADW en cada ciclo del lavavajillas. El detergente era WfK de Tipo B o de Tipo C (Testgewebe GmbH, Brügger, Alemania), que se describen, respectivamente, en las Tablas A y B de la Figura 13.

5 [0361] Las muestras de ensayo eran platos manchados o bien de pasta o bien de mezcla de almidón. Las muestras de pasta se prepararon mezclando 150 g de pasta colada cocinada en agua de 17 GH con 200 ml de agua destilada en una mezcladora durante 5 minutos para obtener una suspensión chiclosa. Se aplicaron 3 g de la suspensión en la superficie de cada plato que iba a incluirse en el ensayo de limpieza, se dejaron secar durante 24 horas, se hornearon en los platos a 120 °C durante 2 horas, y se dejaron enfriar. Se evaluó el rendimiento de limpieza añadiendo yodo en los platos lavados y utilizando una clasificación de escala de imagen de 1-10. Las muestras con mezcla de almidón se prepararon mezclando 26 g de cada almidón de patata, de maíz, de arroz y de trigo en aproximadamente 4 l g de agua con 16 GH y calentándose a 95 °C durante 10 minutos. Tras enfriarse hasta la temperatura ambiente, se aplicaron aproximadamente 30 ml de la mezcla en la superficie de cada plato que iba a incluirse en el ensayo de limpieza, se dejaron secar en la superficie de los platos durante 48 horas a temperatura ambiente, se hornearon en los platos a 80°C durante 1 hora, y se dejaron enfriar. Se determinó el rendimiento de limpieza pesando los platos antes y después del ensayo de limpieza para determinar la cantidad de almidón eliminado.

10 [0362] Las Figuras 14 y 15 muestran el rendimiento de limpieza de CspAmy2-v6 (cuadrados) en comparación con POWERASE® (rombos), a dosis de 0, 1, 2, 4 u 8 ppm en aproximadamente 2,5 centavos/kg (cent/kg) de detergente WfK B contra la mancha de mezcla de almidón (Figura 14) y la mancha de pasta (Figura 15). CspAmy2-v6 presentó claramente un mejor rendimiento que POWERASE®, especialmente contra la mancha de mezcla de almidón. Las Figuras 16 y 17 muestran el rendimiento de limpieza de CspAmy2-v6 (cuadrados) en comparación con STAINZYME® (círculos), a dosis de 0, 1, 2, 4 u 8 ppm en aproximadamente 2,5 cent/kg de detergente WfK B contra la mancha de mezcla de almidón (Figura 16) y la mancha de pasta (Figura 17). CspAmy2-v6 presentó claramente un mejor rendimiento que STAINZYME®, especialmente a dosis bajas. Las Figuras 18 y 19 muestran el rendimiento de limpieza de CspAmy2-v6 (cuadrados) en comparación con POWERASE® (rombos), a dosis de 0, 1, 2, 4 u 8 ppm en aproximadamente 2,5 cent/kg de detergente WfK C contra la mancha de mezcla de almidón (Figura 18) y la mancha de pasta (Figura 19). CspAmy2-v6 presentó de forma evidente un mejor rendimiento que POWERASE® contra ambas manchas.

Ejemplo 14

30 **Cribado de biblioteca de evaluación de sitio de C18P e identificación de mutaciones que mejoran la actividad**

[0363] Las bibliotecas de evaluación de sitio (SEL, por sus siglas en inglés) se construyeron y se cribaron en 283 de 485 posiciones en la variante CspAmy2-C18P (esto es, CspAmy2 con las mutaciones N126Y, F153W, T180D, I203Y y S241Q, y que carecen de R178 y G179 (en referencia a la SEQ ID N.º 1 para la numeración) para identificar variantes adicionales con actividad mejorada en uno o más de los siguientes sustratos: amilopectina de maíz, almidón de maíz hinchado, almidón de maíz granular y micromuestras manchadas con almidón de maíz. Se descubrieron mutaciones a lo largo de la molécula que mejoraban la actividad. Se repitió la prueba en un subconjunto de estas variantes con diferentes respuestas a la dosis para confirmar la actividad mejorada.

35 [0364] La secuencia de aminoácidos de la forma madura del polipéptido de amilasa CspAmy2-C18P se muestra a continuación como SEQ ID N.º 24 (las sustituciones aparecen subrayadas):

40

```
AATNGTMMQY FEWYVPNDGQ QWNRLRTDAP YLSSVGITAV WTPPAYKGTS
QADVGYGPYD LYDLGEFNQK GTVRTKYGTK GELKSAVNLT HSNGIQVYGD
VVMNHKAGAD YTENVTAVEV NPSNRYQETS GEYNIQAWTG FNFPGRGTTY
SNWKQWFHF DGTDWDQSRS LSRIFKFuDGK AWDWEVSSSEN GNYDYLMYAD
YDYDHPDVVN EMKKWGVWYA NEVGLDGYRL DAVKHIKFuQF LKDWVDNARA
ATGKEMFTVG EYWQNDLGAL NNYLAKVNYN QSLFDAPLHY NFYAASGGG
YYDMRNILNN TLVASNPTKA VTLVENHDTQ PGQSLESTVQ PWFuKPLAYAF
ILTRSGGYPS VFYGDuMYGTK GTTTREIPAL KSKIEPLLKA RKDYAYGTQR
DYIDNPDVIG WTREGDSTKA KSGLATVITD GPGGSKRMV GTSNAGEIuWY
DLTGNRTDKI TIGSDGYATF PVNGGSVSVW VQQ
```

Ensayo de amilopectina de maíz

[0365] Se utilizó la hidrólisis de amilopectina de maíz soluble para medir la actividad específica de variantes de amilasa. La actividad se midió como extremos reductores generados mediante la hidrólisis enzimática de polímeros de amilopectina cuantificada empleando un ensayo de ácido bicinonínico (BCA). El equipo empleado para el ensayo incluía un robot Biomek FX (Beckman Coulter), un lector de microplacas SpectraMAX (tipo 340-Dispositivos moleculares), y una máquina de PCR Tetrad2DNA Engine (Biorad).

[0366] La amilopectina de maíz purificada (MP Biomedicals, LLC, cat. # 195048) se solubilizó hirviendo durante 5 minutos mientras se mezclaba como una suspensión de 1,5 % (p/p) en agua. El material se dejó enfriar hasta la temperatura ambiente y se añadieron soluciones madre concentradas y agua para obtener un sustrato de amilopectina final con un 1,25 % (p/p) de amilopectina, 6,25 ppm de calcio, 62,5 ppm de sodio, 62,5 mM de acetato de potasio (pH 5,0), y 0,005 % (v/v) de Tween 80.

[0367] Se añadieron 40 µl del sustrato de amilopectina en 3 microplacas de PCR. Se añadieron 10 µl de sobrenadante de cultivo diluido 1:2000 en agua/0,005 % de tween 80 en las placas, y posteriormente se mezclaron mediante pipeteo hacia arriba y hacia abajo. Las placas se sellaron y se colocaron a 70 °C durante 5 minutos, y después se redujo a 25 °C. La hidrólisis de amilopectina se concluyó añadiendo/mezclando inmediatamente 10 µl de NaOH 0,5 N.

[0368] Los productos de la reacción de hidrólisis de almidón se analizaron mediante el ensayo BCA. En pocas palabras, se preparó un reactivo proporcionado en un kit comercial (Pierce Chemical, n.º de cat. 23225) conforme a las instrucciones del fabricante. Se alicuotaron 90 µl en placas de PCR seguidos por 10 µl de la reacción de enzimas finalizada descrita anteriormente. Tras mezclar los componentes, las placas se sellaron y se colocaron en un termociclador, programado durante 3 minutos a 95 °C para desarrollar el color, y se enfrió a continuación hasta 30 °C. Las muestras de 70 µl de las mezclas de reacción BCA desarrolladas se transfirieron a una nueva placa, y se midió la absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro. Se realizó la media de los datos obtenidos en tres placas de replicación.

Ensayo de almidón de maíz

[0369] El material (harina o almidón) de almidón de maíz de Cargill se lavó minuciosamente con agua MilliQ repitiendo la suspensión y la centrifugación con anterioridad a su uso en el ensayo. El almidón de maíz lavado se suspendió en agua MilliQ con un contenido de 0,005 % de azida de sodio para obtener un 20 % (p/p) de soluciones madre, que se diluyeron después con una solución tampón madre 20X a 10,9 % p/v de soluciones de harina de maíz y almidón de maíz (concentración final de tampón de 55 mM de KOAc, pH 5).

[0370] Se añadieron 55 µl de los sustratos de harina de maíz o de almidón de maíz diluidos en microplacas de PCR junto con 5 µl de muestras de enzima diluida 1:10 empleando un depósito *bubble paddle*. Las placas se sellaron y se colocaron a 86 °C durante 5 minutos, y después se redujo la temperatura a 45 °C. La reacción de hidrólisis de almidón se concluyó añadiendo 70 µl de NaOH 0,1 N. Las placas se sellaron y se centrifugaron durante 3 minutos a 1610 RCF. Los productos de la reacción de hidrólisis de almidón se analizaron mediante el ensayo de BCA según se ha descrito anteriormente.

Ensayo de almidón de maíz hinchado (SCS)

[0371] El ensayo SCS mide la actividad de alfa-amilasa en gránulos de almidón hidratados pero intactos («hinchados»). El número total de reemplazos enzimáticos se analiza utilizando el ensayo de azúcares reductores BCA, mientras que la tendencia de la enzima a liberar fragmentos grandes de almidón en la solución se analiza utilizando tinción de yodo.

[0372] Se preparó un sustrato de 2 % (p/p) de almidón de maíz hinchado suspendiendo 2 g de almidón de maíz (almidón de maíz orgánico de Cargill Farms) en 90 g de agua MilliQ y calentándose en un baño de agua a sumergido a 80 °C durante 1 hora removiendo regularmente. Tras enfriarse durante la noche a temperatura ambiente, el volumen se elevó a 100 ml con la incorporación de tampón de acetato de potasio, cloruro de calcio, cloruro de sodio y Tween-80 para obtener concentraciones finales de 50 mM de KOAc (pH 5,5), 0,125 mM de CaCl₂, 2 mM de NaCl, y 0,005 % de Tween-80.

[0373] Se dispensaron 55 µl de sustrato de almidón de maíz hinchado en microplacas de poliestireno con fondo en V de NUNC empleando un depósito *bubble paddle*. La reacción se inició añadiendo 5 µl de solución de enzimas 12x en la placa para obtener una concentración final de enzimas de ~0,03 ppm en reacción. La placa de reacción se selló con un sellado de Nunc y se colocó inmediatamente en una incubadora iEMS. La incubación se llevó a cabo durante 10 min a 25 °C, o durante 4 min a 60 °C, con agitación a 1150 RPM. Tras la incubación, la reacción se concluyó con la incorporación de 70 µl de NaOH 0,1 N. Las placas se sellaron y se centrifugaron durante 3 min a 3000 RPM. Las reacciones de almidón de maíz hinchado se realizaron como una única placa, aunque se analizaron por triplicado para los posteriores ensayos de yodo y BCA.

[0374] A continuación, se describe el ensayo de BCA. Para la reacción de yodo, se añadieron 95 µl de reactivo de Lugol (recién diluido en agua 12 veces; Sigma-Aldrich L6146-1L) en microplacas de 96 pocillos Costar 9017.

Se añadieron 5 µl de muestra de sobrenadante en las placas y se mezclaron seis veces mediante pipeteo hacia arriba y hacia abajo. Las placas se agitaron entonces en un mezclador de microplacas de sobremesa durante 1 minuto a una velocidad de 6-7. Se leyó la absorbancia a 530 nm empleando un espectrofotómetro SpectraMax M5.

5 Ensayo de micromuestras de almidón de maíz CS-26

[0375] Los ensayos se llevaron a cabo según se ha descrito anteriormente, excepto por el hecho de que se añadieron 170 µl de tampón de acetato de potasio en cada pocillo de la microplaca que contenía las micromuestras y posteriormente se añadieron 10 µl de solución diluida de enzimas en cada pocillo, dando como resultado un volumen total de 180 µl/pocillo. Las microplacas se sellaron y se incubaron durante 20 minutos a 1150 rpm a 25 °C.

Análisis de viscosidad

[0376] Los experimentos de viscosidad se llevaron a cabo empleando un analizador rápido de viscosidad (Newport Scientific) con botes planos lavados de 38 mm x 68 mm (Parte n.º AA0384001) y una paleta de doble borde (Parte n.º NS101783). La obtención de datos y el análisis se realizaron con Thermocline para Windows (versión 3.11). Inmediatamente antes de cada operación, se prepararon 33 g de 25 % de sólidos secos (ds) de suspensión de harina de maíz en un bote de RVA del modo siguiente: se pesaron 9,17 g de harina de maíz (con un contenido de humedad del 11,8 %) en una balanza analítica y se mezclaron con 23,83 g de agua desionizada. Se ajustó el pH de la muestra con 0,0828 ml de ácido sulfúrico 1N (para pH 5,7) o 0,285 ml de ácido sulfúrico 1N (para pH 5,2). Se añadió la enzima en una dosis apropiada, y se colocó el bote en el viscosímetro. Todas las operaciones tuvieron una duración de 10 minutos, con una rampa de temperatura a 85 °C o a 95 °C durante 80 segundos y después se mantuvo a una temperatura de 85 °C o de 95 °C para el resto de la operación.

Resultados de cribado iniciales

[0377] Las mutaciones que dieron como resultado variantes con una expresión mayor de 250 µg/ml y con al menos un 110 % del rendimiento de CspAmy2-C18P en cualquiera de los ensayos indicados en cada ensayo se clasificaron como mutaciones mejoradoras del rendimiento. Las variantes de SEL de CspAmy2-C18P con mutaciones en las posiciones 6, 7, 8, 11, 14, 15, 20, 21, 23, 26, 27, 28, 37, 38, 39, 40, 42, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 58, 61, 62, 68, 70, 71, 72, 73, 79, 80, 81, 82, 84, 85, 87, 88, 89, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 101, 108, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 120, 122, 123, 124, 126, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 138, 140, 142, 143, 144, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 165, 167, 168, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 180, 181, 182, 187, 190, 191, 193, 199, 200, 201, 203, 206, 208, 210, 211, 212, 214, 215, 216, 219, 221, 223, 225, 226, 227, 235, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 252, 253, 254, 256, 257, 258, 260, 261, 262, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 273, 276, 277, 279, 280, 282, 284, 285, 286, 288, 296, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 307, 308, 310, 311, 312, 313, 316, 317, 318, 320, 321, 325, 327, 335, 338, 342, 348, 349, 352, 356, 357, 360, 362, 363, 368, 369, 377, 381, 382, 383, 384, 385, 388, 390, 392, 394, 395, 396, 397, 398, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 407, 408, 410, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 426, 428, 429, 430, 431, 434, 435, 436, 439, 441, 442, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 454, 455, 457, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 469, 470, 471, 473, 474, 475, 476, 477, 479, 480, 481, 482, 483 y 484 cumplieron con estos criterios. Entre las mutaciones específicas mejoradoras del rendimiento se incluyen T6A, T6D, T6E, T6G, T6K, T6M, T6N, T6Q, T6S, M7A, M7V, M8C, M8F, M8I, M8L, M8Y, F11V, Y14A, Y14I, Y14Q, Y14T, Y14V, V15C, V15D, V15I, V15N, V15T, Q20A, Q20C, Q20D, Q20H, Q20K, Q20M, Q20N, Q20R, Q20S, Q20Y, Q21F, Q21W, N23A, N23C, N23D, N23E, N23H, N23K, N23Q, N23R, N23S, N23T, N23V, R26C, R26E, R26G, R26K, R26M, R26S, R26T, T27A, T27C, T27D, T27E, T27F, T27H, T27I, T27K, T27L, T27M, T27N, T27Q, T27R, T27S, T27V, T27Y, D28A, D28C, D28T, I37F, I37V, T38D, T38N, A39L, V40A, V40C, V40D, V40G, V40H, V40I, V40K, V40M, V40P, V40Q, V40R, V40S, V40T, V40W, V40Y, T42A, T42C, T42I, T42M, T42V, A45C, A45G, Y46F, G48A, T49I, S50A, S50C, S50E, S50G, S50K, S50M, S50N, S50Q, S50R, S50T, S50Y, Q51C, Q51D, Q51E, Q51S, Q51V, A52C, A52D, A52E, A52F, A52G, A52H, A52K, A52L, A52M, A52R, A52S, A52T, A52V, A52Y, D53E, V54N, V54T, P58A, P58C, P58H, P58I, P58S, P58T, P58V, L61M, L61V, Y62A, Y62C, Y62D, Y62F, Y62G, Y62H, Y62I, Y62K, Y62L, Y62M, Y62N, Y62P, Y62Q, Y62R, Y62S, Y62V, N68C, N68D, N68E, N68F, N68H, N68L, N68P, N68Q, N68R, N68S, N68V, N68W, N68Y, K70R, G71A, G71C, G71D, G71E, G71K, G71R, G71S, T72G, T72S, V73S, T79F, T79I, T79L, T79M, T79N, T79S, T79Y, K80A, K80C, K80D, K80F, K80H, K80I, K80M, K80N, K80Q, K80R, K80S, K80T, K80V, K80Y, G81A, G81D, G81E, G81F, G81H, G81I, G81K, G81N, G81P, G81R, G81S, G81T, E82A, E82D, E82M, E82Q, K84A, K84C, K84E, K84I, K84Q, K84R, K84S, K84T, K84Y, S85A, S85C, S85D, S85E, S85G, S85H, S85I, S85L, S85M, S85N, S85Q, S85R, S85T, S85V, S85Y, V87I, V87T, N88C, N88D, N88E, N88G, N88H, N88I, N88K, N88L, N88M, N88Q, N88R, N88S, N88T, N88V, N88W, N88Y, T89A, T89D, T89E, T89F, T89H, T89I, T89K, T89L, T89M, T89N, T89Q, T89R, T89S, T89Y, S92A, S92C, S92D, S92E, S92F, S92G, S92H, S92I, S92J, S92K, S92L, S92M, S92N, S92Q, S92R, S92T, S92W, S92Y, N93A, N93C, N93E, N93F, N93H, N93I, N93K, N93L, N93Q, N93S, N93T, N93Y, G94A, G94C, G94N, I95M, Q96A, Q96E, Q96H, Q96I, Q96K, Q96L, Q96M, Q96N, Q96R, Q96V, Q96Y, V97I, V97T, Y98F, Y98I, Y98L, Y98V, V101C, V101T, G108A, G108S, Y111D, Y111E, Y111L, Y111N, Y111S, Y111T, Y111V, T112A, T112F, T112H, T112I, T112K, T112L, T112M, T112N, T112P, T112R, T112V, T112W, E113D, E113N, E113Q, E113T, N114A, N114C, N114D, N114E, N114F, N114G, N114H, N114I, N114L, N114P, N114Q,

ES 2 676 895 T3

N114R, N114S, N114T, N114V, N114W, N114Y, V115A, V115I, T116A, T116C, T116D, T116G, T116H, T116I,
 T116K, T116N, T116P, T116Q, T116R, T116S, A117C, A117I, A117S, A117V, V118A, V118C, V118E, V118F,
 V118H, V118I, V118L, V118M, V118N, V118Q, V118R, V118S, V118W, V118Y, V120A, V120C, V120I, V120M,
 5 V120T, P122A, P122D, P122E, P122G, P122H, P122N, P122R, P122S, P122T, P122W, S123A, S123C, S123G,
 S123K, S123L, N124A, N124D, N124F, N124G, N124L, N124R, N124S, N124V, Y126A, Y126C, Y126D, Y126E,
 Y126G, Y126H, Y126I, Y126K, Y126L, Y126M, Y126N, Y126Q, Y126R, Y126S, Y126T, Y126V, Y126W, Q127A,
 Q127C, Q127D, Q127E, Q127F, Q127H, Q127I, Q127K, Q127L, Q127M, Q127N, Q127R, Q127S, Q127T,
 Q127V, Q127W, Q127Y, T129A, T129C, T129D, T129E, T129F, T129G, T129I, T129K, T129L, T129M, T129N,
 T129Q, T129R, T129S, T129V, T129W, T129Y, S130A, S130G, S130I, S130K, S130L, S130M, S130N, S130P,
 10 S130R, S130T, S130V, S130W, G131A, G131C, G131D, G131F, G131H, G131I, G131K, G131L, G131M,
 G131P, G131Q, G131V, G131W, G131Y, E132A, E132C, E132D, E132F, E132G, E132H, E132I, E132K, E132L,
 E132M, E132N, E132P, E132Q, E132R, E132V, E132W, Y133A, Y133D, Y133E, Y133G, Y133K, Y133L,
 Y133M, Y133R, Y133S, Y133T, Y133W, N134A, N134D, N134F, N134G, N134H, N134I, N134K, N134L, N134M,
 N134R, N134S, N134W, N134Y, Q136A, Q136C, Q136D, Q136E, Q136F, Q136G, Q136H, Q136I, Q136J, Q136K,
 15 Q136L, Q136M, Q136N, Q136R, Q136S, Q136T, Q136V, Q136W, Q136Y, A137S, A137T, A137V, W138F, W138Y,
 G140A, G140M, N142F, N142K, N142L, N142M, N142P, N142V, N142W, N142Y, F143H, F143Y, P144C,
 P144D, P144E, P144G, P144H, P144I, P144K, P144L, P144M, P144N, P144Q, P144S, P144T, P144Y, G147A,
 G147C, G147H, G147K, G147L, G147M, G147N, G147Q, G147R, T148A, T148D, T148E, T148F, T148I, T148K,
 T148L, T148R, T148S, T148V, T148W, T149A, T149C, T149D, T149E, T149F, T149H, T149K, T149L, T149M,
 20 T149N, T149Q, T149V, T149W, T149Y, Y150H, S151A, S151E, S151F, S151H, S151I, S151K, S151L, S151M,
 S151Q, S151R, S151V, N152A, N152C, N152D, N152E, N152G, N152H, N152K, N152M, N152P, N152Q,
 N152R, N152S, N152T, W153F, W153H, W153Q, W153R, W153T, W153Y, K154A, K154C, K154D, K154E,
 K154G, K154I, K154L, K154M, K154N, K154R, K154T, K154Y, W155P, Q156A, Q156D, Q156E, Q156F, Q156G,
 Q156H, Q156I, Q156L, Q156M, Q156N, Q156R, Q156S, Q156Y, F158C, F158D, F158K, F158L, F158M, F158N,
 25 F158P, F158Q, F158R, F158S, F158V, H159M, H159Y, W165C, W165D, W165E, W165F, W165H, W165I,
 W165K, W165L, W165M, W165Q, W165R, W165T, W165Y, Q167A, Q167D, Q167E, Q167G, Q167H, Q167K,
 Q167M, Q167N, Q167P, Q167S, Q167T, Q167V, S168A, S168D, S168F, S168H, S168I, S168K, S168M, S168N,
 S168Q, S168R, S168T, S168V, S168W, S168Y, S170A, S170C, S170D, S170E, S170F, S170I, S170M, S170N,
 S170Q, S170R, S170T, L171A, L171C, L171F, L171G, L171H, L171I, L171N, L171Q, L171R, L171T, L171V,
 30 L171W, L171Y, S172A, S172D, S172H, S172R, S172T, F175M, F175Y, K176I, K176T, F177L, F177V, F177W,
 D180A, D180C, D180F, D180G, D180H, D180I, D180L, D180M, D180N, D180Q, D180R, D180S, D180T, D180V,
 D180W, D180Y, G181A, G181C, G181D, G181E, G181F, G181H, G181K, G181L, G181M, G181N, G181Q,
 G181R, G181S, G181T, G181V, G181Y, K182A, K182P, E187D, E187I, E187K, E187M, E187N, E187P, E187R,
 E187S, E187T, E187Y, S190A, S190C, S190D, S190F, S190L, S190N, S190P, S190Q, E191A, E191C,
 35 E191F, E191G, E191H, E191I, E191K, E191N, E191Q, E191R, E191S, E191T, E191W, E191Y, G193A, G193C,
 G193D, G193E, G193F, G193H, G193K, G193L, G193M, G193N, G193Q, G193R, G193S, G193T, G193V,
 G193W, M199L, Y200F, A201M, Y203I, Y203L, Y203V, D206A, D206E, D206G, D206H, D206M, D206N,
 D206Q, D206R, D206S, D206T, P208A, P208E, P208F, P208I, P208K, P208L, P208T, P208V, P208Y, V210A,
 V210E, V210H, V210K, V210N, V210Q, V210R, V210S, V210T, V211A, V211E, V211H, V211I, V211Q, V211R,
 40 N212E, N212F, N212G, N212L, N212M, N212R, N212V, M214I, M214L, K215C, K215E, K215F, K215M, K215N,
 K215R, K215Y, K216F, V219I, V219T, Y221F, Y221I, Y221L, N223C, N223E, N223I, N223K, N223Q, N223R,
 N223S, N223T, N223V, N223W, N223Y, V225A, V225I, V225L, V225M, G226D, G226M, G226Q, G226R,
 G226S, L227F, L227I, L227K, L227L, L227Y, V235A, I238A, I238L, I238M, K239D, K239E, K239P, K239Q, K239R,
 K239S, K239T, F240K, F240L, F240M, F240Q, F240R, Q241A, Q241C, Q241D, Q241E, Q241G, Q241H,
 45 Q241K, Q241L, Q241M, Q241N, Q241P, Q241R, Q241S, Q241T, Q241V, Q241W, Q241Y, F242V, L243C,
 L243Y, D245A, D245C, D245E, D245G, D245L, D245M, D245N, W246F, V247I, V247L, D248E, D248H, D248N,
 D248T, D248V, N249A, N249E, N249G, N249H, N249Q, N249Y, A250M, A250S, A250V, A252C, A252D,
 A252E, A252G, A252H, A252I, A252K, A252L, A252M, A252N, A252Q, A252S, A252V, A252W, A252Y, A253E,
 A253I, A253K, A253L, A253M, A253Q, A253S, A253T, A253V, A253Y, T254F, T254K, T254S, K256A, K256M,
 50 K256N, K256S, E257Q, E257S, M258L, T260A, T260C, T260S, T260V, V261I, V261W, G262A, Q266A, Q266D,
 Q266E, Q266H, Q266I, Q266M, Q266N, Q266S, Q266T, Q266V, Q266Y, N267H, N267I, N267Q, N267R,
 N267S, N267T, N267V, N267Y, D268G, D268N, L269C, L269D, L269I, L269K, L269Q, L269S, L269T, L269Y,
 G270A, G270D, G270E, G270F, G270H, G270I, G270L, G270M, G270Q, G270T, G270V, G270Y, A271C,
 A271D, A271E, A271H, A271K, A271M, A271Q, A271R, A271S, A271T, A271V, A271Y, N273C, N273G, N273H,
 55 N273I, N273K, N273R, L276I, L276M, A277C, A277D, A277E, A277F, A277G, A277I, A277K, A277L, A277M,
 A277N, A277Q, A277R, A277S, A277T, A277V, A277W, A277Y, V279C, V279T, N280A, N282S, N282T, S284T,
 S284Y, L285A, L285C, L285I, L285V, F286M, A288C, A296C, A296D, A296E, A296F, A296G, A296H, A296I,
 A296L, A296M, A296N, A296Q, A296R, A296S, A296V, A296W, A296Y, T299A, T299D, T299E, T299F, T299G,
 T299K, T299L, T299M, T299R, T299S, T299V, T299W, G300A, G300C, G300D, G300E, G300F, G300H,
 60 G300K, G300M, G300Q, G300R, G300V, G300W, G301A, G301C, G301D, G301E, G301F, G301H, G301K,
 G301L, G301M, G301Q, G301R, G301S, G301T, G301V, G301W, G301Y, G302S, Y303A, Y303C, Y303D,
 Y303E, Y303F, Y303G, Y303H, Y303I, Y303K, Y303L, Y303M, Y303N, Y303Q, Y303R, Y303S, Y303T, Y303V,
 Y303W, Y304F, Y304K, Y304W, R307A, R307C, R307E, R307G, R307H, R307K, R307M, R307N, R307Q,
 R307S, R307T, N308C, N308D, N308E, N308G, N308L, N308M, N308T, N308V, L310A, L310C, L310D, L310E,

L310H, L310I, L310M, L310P, L310W, L310Y, N311C, N311E, N311G, N311H, N311K, N311Q, N311R, N311S,
 N311V, N311W, N311Y, N312D, N312F, N312G, N312H, N312K, N312Q, N312R, T313A, T313S, A316D,
 A316E, A316G, A316H, A316K, A316Q, A316R, A316Y, S317C, S317D, S317G, S317H, S317K, S317L, S317N,
 S317Q, S317R, S317T, S317W, S317Y, N318A, N318C, N318F, N318G, N318I, N318K, N318L, N318M, N318Q,
 5 N318R, N318S, N318T, N318V, N318W, T320A, T320C, T320D, T320E, T320G, T320H, T320I, T320K, T320N,
 T320P, T320Q, T320R, T320V, T320W, T320Y, K321C, K321F, K321H, K321N, K321S, K321Y, L325A, L325C,
 L325F, L325I, L325M, L325Q, L325V, E327D, E327L, E327R, Q335C, Q335E, E338A, E338D, E338F, E338G, E338H,
 E338I, E338K, E338P, E338Q, E338R, E338T, E338V, E338Y, Q342A, Q342C, Q342G, Q342L, Q342M, Q342R,
 Q342S, Q342T, Q342V, Q342W, L348A, L348C, L348H, L348I, L348M, L348Q, L348S, L348T, A349G, A349R,
 10 F352I, F352L, F352M, F352T, F352V, R356Q, S357A, S357C, S357D, S357E, S357F, S357H, S357I, S357K,
 S357L, S357N, S357Q, S357T, S357V, S357W, S357Y, Y360F, Y360I, Y360L, Y360M, Y360V, S362A, S362C,
 S362E, S362I, S362T, S362V, V363I, V363L, M368F, M368I, M368L, M368Y, Y369A, Y369E, Y369I, Y369L,
 Y369N, Y369V, R377A, R377C, R377D, R377E, R377F, R377G, R377H, R377I, R377K, R377L, R377M, R377N,
 R377S, R377T, R377V, R377W, R377Y, A381C, A381E, A381G, A381H, A381K, A381L, A381M, A381N, A381P,
 15 A381Q, A381V, A381W, A381Y, L382F, L382H, L382Q, L382S, K383A, K383C, K383D, K383E, K383H, K383I,
 K383L, K383M, K383N, K383Q, K383R, K383S, K383W, K383Y, S384A, S384C, S384D, S384F, S384G, S384H,
 S384I, S384L, S384N, S384R, S384V, S384Y, K385A, K385D, K385E, K385F, K385G, K385H, K385L, K385M,
 K385Q, K385R, K385T, K385V, K385Y, P388A, P388C, P388D, P388I, P388L, P388N, P388R, P388S, P388T,
 P388V, L390M, L390V, A392C, A392S, K394A, K394C, K394E, K394F, K394G, K394H, K394I, K394L, K394Q,
 20 K394R, K394S, K394T, K394V, K394W, K394Y, D395A, D395E, D395S, D395T, Y396A, Y396D, Y396F,
 Y396K, Y396M, Y396N, Y396Q, Y396T, Y396V, Y396W, A397D, A397E, A397H, A397I, A397M, A397N,
 A397Q, A397V, Y398A, Y398C, Y398F, Y398H, Y398I, Y398L, Y398W, T400A, T400C, T400D, T400F, T400G,
 T400I, T400K, T400L, T400M, T400N, T400Q, T400R, T400W, T400Y, Q401A, Q401C, Q401F, Q401H, Q401I,
 Q401L, Q401M, Q401N, R402C, R402D, R402F, R402K, R402L, R402M, R402N, R402Q, R402S, R402W,
 25 D403E, D403N, D403S, Y404E, Y404G, Y404K, Y404M, Y404N, Y404R, Y404W, I405C, I405F, I405L, I405M,
 I405V, N407A, N407C, N407D, N407E, N407G, N407K, N407M, N407Q, N407R, P408A, P408C, P408D, P408I,
 P408K, P408L, P408M, P408N, P408Q, P408V, P408W, V410A, V410C, V410D, V410E, V410F, V410H, V410I,
 V410L, V410M, V410N, V410Q, V410S, V410T, T414A, T414I, T414S, T414V, R415M, E416C, E416D, E416F,
 E416H, E416I, E416K, E416L, E416M, E416N, E416Q, E416R, E416T, E416V, E416W, E416Y, D418A, D418E,
 30 D418G, D418H, D418I, D418K, D418L, D418M, D418N, D418Q, D418S, D418T, D418V, D418W, S419A,
 S419C, S419E, S419G, S419L, S419M, S419N, S419R, S419V, S419W, S419Y, T420A, T420C, T420D, T420E,
 T420G, T420H, T420I, T420K, T420M, T420P, T420S, T420V, T420W, T420Y, K421A, K421D, K421E, K421H,
 K421I, K421L, K421M, K421N, K421P, K421Q, K421R, K421T, K421V, K421W, K421Y, A422C, A422D, A422E,
 A422F, A422G, A422I, A422L, A422N, A422P, A422Q, A422R, A422S, A422Y, K423A, K423D, K423E, K423F,
 35 K423H, K423I, K423L, K423M, K423N, K423Q, K423R, K423S, K423T, K423V, K423W, K423Y, S424A, S424C,
 S424G, S424K, S424N, S424Q, S424R, S424T, L426S, L426T, L426V, T428G, T428V, V429A, V429C, V429I,
 V429L, I430C, I430G, I430L, I430M, I430Q, I430V, T431A, T431C, T431S, P434A, P434C, P434D, P434E,
 P434F, P434H, P434I, P434K, P434L, P434M, P434N, P434Q, P434R, P434S, P434V, P434Y, G435A, G435C,
 G435D, G435E, G435F, G435H, G435I, G435K, G435M, G435N, G435P, G435Q, G435R, G435S, G435T,
 40 G435W, G436F, G436I, G436M, G436N, G436Q, G436S, G436V, R439A, R439D, R439G, R439H, R439K,
 R439M, R439N, R439P, R439Q, R439S, R439V, R439W, R439Y, Y441A, Y441C, Y441D, Y441F, Y441G,
 Y441H, Y441K, Y441L, Y441M, Y441N, Y441P, Y441R, Y441S, Y441T, Y441W, V442A, V442C, V442I, V442T,
 T444C, T444D, T444E, T444F, T444G, T444H, T444I, T444K, T444L, T444M, T444N, T444P, T444R, T444S,
 T444W, S445A, S445C, S445E, S445G, S445H, S445K, S445L, S445M, S445N, S445T, S445V, N446A, N446C,
 45 N446H, N446K, A447C, A447D, A447F, A447H, A447L, A447M, A447N, A447Q, A447R, A447S, A447Y, G448A,
 G448C, G448D, G448E, G448H, G448K, G448L, G448M, G448N, G448Q, G448R, G448S, G448T, G448W,
 E449D, E449H, E449K, E449T, I450A, I450C, I450D, I450E, I450G, I450K, I450L, I450M, I450N, I450Q, I450S,
 I450T, I450W, I450Y, W451Y, L454A, L454I, L454K, L454M, L454W, T455A, T455I, T455L, T455S, N457H,
 N457K, N457R, N457T, N457V, N457Y, D460A, D460E, D460G, D460M, D460N, D460Q, D460S, D460V,
 50 K461C, K461H, K461L, K461M, K461N, K461Q, K461T, K461Y, I462A, I462L, I462M, I462Q, I462T, I462V,
 T463D, T463E, T463H, T463P, T463Q, T463R, T463V, T463Y, I464P, I464T, G465A, G465C, G465D, G465E,
 G465K, G465L, G465M, G465N, G465Q, G465W, G465Y, S466A, S466C, S466D, S466G, S466H, S466K,
 S466L, S466M, S466N, S466T, S466W, S466Y, D467E, D467G, D467L, Y469A, Y469D, Y469E, Y469I, Y469M,
 Y469N, Y469R, Y469S, Y469T, Y469V, Y469W, A470S, A470V, T471A, T471C, T471E, T471G, T471H, T471I,
 55 T471L, T471M, T471N, T471S, T471V, T471W, P473C, P473D, P473E, P473G, P473I, P473K, P473L, P473R,
 P473T, P473V, V474A, V474C, V474L, V474S, N475A, N475C, N475E, N475F, N475H, N475K, N475L, N475M,
 N475P, N475Q, N475R, N475S, N475T, N475V, G476A, G476D, G476E, G476F, G476H, G476I, G476L,
 G476M, G476N, G476P, G476Q, G476R, G476S, G476T, G476V, G476W, G476Y, G477A, G477D, G477F,
 G477H, G477I, G477K, G477L, G477M, G477Q, G477S, G477T, G477V, G477W, G477Y, V479C, V479D,
 60 V479E, V479F, V479H, V479I, V479N, V479P, V479Y, S480A, S480C, S480H, V481A, V481C, V481N, W482Y,
 V483A, V483G, V483I, V483K, V483L, V483M, V483R, V483Y, Q484A, Q484C, Q484F, Q484G, Q484H, Q484K,
 Q484L, Q484M, Q484P, Q484R, Q484T y Q484Y.

Resultados de cribado de respuesta a la dosis

[0378] Se analizó de forma más precisa un subconjunto de las variantes con mutaciones mejoradoras del rendimiento para mostrar actividad mejorada frente al tipo natural a múltiples concentraciones de proteínas (esto es, actividad específica mejorada). La Figura 20 muestra ejemplos de variantes con mejor hidrólisis de almidón de maíz a altas temperaturas. La Figura 21 muestra ejemplos de variantes con mejor hidrólisis de amilopeptina de maíz. La Figura 22 muestra ejemplos de variantes con mejor generación de azúcares reductores de almidón. La Figura 23 muestra ejemplos de variantes con mejor liberación de material de tinción de yodo de almidón. En las Figuras 20-23, las leyendas situadas junto a los gráficos indican las mutaciones presentes, además de las que están presentes en la variante control, CspAmy2-C18P. La Figura 24 muestra ejemplos de variantes que muestran una mejor reducción de la viscosidad de la suspensión de maíz en comparación con la CspAmy2-C18P control. A efectos de comparación, se incluye también CspAmy2-C16F.

Ejemplo 15

Pares de combinaciones de mutaciones en las posiciones 476 y 477

[0379] Las bibliotecas de evaluación de sitio se construyeron y cribaron para determinar el efecto de los pares de combinaciones de mutaciones en las posiciones 476 y 477 en la variante CspAmy2-C16F (CspAmy2 con las mutaciones N126Y, F153W, T180H, I203Y y S241Q, y sin R178 and G179). La matriz de la Figura 25 muestra los valores de PI para las variantes de la posición 476/477 de CspAmy2-C16F en comparación con una CspAmy2-C16F control (con un valor de PI establecido en 1) en un ensayo de micromuestras de almidón de maíz CS-26, según se ha descrito anteriormente. Los residuos de aminoácido en las posiciones 476 y 477 se indican, respectivamente, en las partes izquierda y superior de la matriz. Un revertido «natural», esto es, G476G/G477G presentaba una calificación de PI de 1,01 obtenida experimentalmente, lo cual sugiere que el ensayo produce resultados muy fiables. La ausencia de un número en una posición en la matriz indica una expresión pobre de la variante concreta o que la variante no estaba presente entre aquellas que se analizaron. La matriz de la Figura 26 muestra los valores de PI para las mismas variantes en un ensayo de hidrólisis de amilosa, según se ha descrito anteriormente. De nuevo, un revertido «natural», esto es, G476G/G477G, presentaba una calificación de PI obtenida experimentalmente que se corresponde con la del control.

[0380] Cabe destacar que los resultados sugieren que prácticamente cualquier combinación de residuos en las posiciones 476 y 477, distinta del par de glicina que se origina de forma natural en CspAmy2 (y en muchas α -amilasas), aumenta el rendimiento de la α -amilasa en cuanto a que aumenta la hidrólisis de amilopeptina insoluble y mejora la liberación de material de tinción de yodo de almidón hidratado. Aunque no se vincula a ninguna teoría, se piensa que los residuos GG adyacentes al C-terminal de α -amilasas contribuyen a la unión del almidón. Aunque puede ser deseable que se esta se una firmemente a un sustrato en la naturaleza cuando el sustrato es limitante, en aplicaciones industriales puede ser más deseable que la enzima se libere desde una molécula de almidón tras hidrolizarse y encuentre moléculas de un almidón distinto para hidrolizar, en lugar de permanecer asociada a la primera molécula de almidón e hidrolizarla gradualmente.

Ejemplo 16

Variantes adicionales de base C18P con mejor rendimiento en la licuefacción secundaria

[0381] Se construyeron bibliotecas de evaluación de sitio (SEL) y se cribaron para determinar el efecto de las mutaciones en las posiciones E132, Q167, A277 y T400 en CspAmy2-C18P. Los residuos presentes en estas posiciones en las mejores variantes analizadas se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Combinaciones de mutaciones analizadas

Nombre	E132	A277	Q167	T400
C16F	E	A	Q	T
C25F	H	F	Q	T
C25B	H	F	E	T
C25A	H	F	E	K

[0382] En la Figura 27, se muestra el rendimiento relativo de CspAmy2-C25A, B, y F en un ensayo de licuefacción en comparación con C18F. Las mutaciones en las posiciones 132 y 277 aumentan el rendimiento. Se observa un beneficio adicional de las mutaciones en las posiciones 167. En posteriores experimentos, se demostró que C25B mostraba un mejor rendimiento de licuefacción que C16F en pH 5,2 y 5,8, y con o sin calcio

adicional. Todas las variantes CspAmy2-C25A, B, y F presentaron mejor rendimiento que la variante CspAmy2-C18P (no representada).

[0383] La secuencia de aminoácidos de la forma madura del polipéptido de amilasa CspAmy2-C25A se muestra a continuación como SEQ ID N.º 25 [las sustituciones relevantes aparecen subrayadas]:

5

```
AATNGTMMQY FEWYVPNDGQ QWNRLRTDAP YLSSVGITAV WTPPAYKGTG
QADVGYGPYD LYDLGEFNQK GTVRTKYGTK GELKSAVNLT HSNGIQVYGD
VVMNHKAGAD YTENVTAVEV NPSNRYQETS GHYNIQAWTG FNFPGRGTTY
SNWKWQWFHF DGTDWDESRS LSRIFKFDGK AWDWEVSSSEN GNYDYLMYAD
YDYDHPDVVN EMKKWGVWYA NEVGLDGYRL DAVKHIKFQF LKDWVDNARA
ATGKEMFTVG EYWQNDLGAL NNYLFKVNYN QSLFDAPLHY NFYAASSTGGG
YYDMRNILNN TLVSNPTKA VTLVENHDTQ PGQSLESTVQ PWFKPLAYAF
ILTRSGGYPS VFYGDMYGTK GTTTREIPAL KSKIEPLLKA RKDYAYGKQR
DYIDNPDVIG WTREGDSTKA KSGLATVITD GPGGSKRMVYV GTSNAGEIYW
DLTGNRTDKI TIGSDGYATF PVNGGSVSVW VQQ
```

[0384] La secuencia de aminoácidos de la forma madura del polipéptido de amilasa CspAmy2-C25B se muestra a continuación como SEQ ID N.º 26 [las sustituciones relevantes aparecen subrayadas]:

10

```
AATNGTMMQY FEWYVPNDGQ QWNRLRTDAP YLSSVGITAV WTPPAYKGTG
QADVGYGPYD LYDLGEFNQK GTVRTKYGTK GELKSAVNLT HSNGIQVYGD
VVMNHKAGAD YTENVTAVEV NPSNRYQETS GHYNIQAWTG FNFPGRGTTY
SNWKWQWFHF DGTDWDESRS LSRIFKFDGK AWDWEVSSSEN GNYDYLMYAD
YDYDHPDVVN EMKKWGVWYA NEVGLDGYRL DAVKHIKFQF LKDWVDNARA
ATGKEMFTVG EYWQNDLGAL NNYLFKVNYN QSLFDAPLHY NFYAASSTGGG
YYDMRNILNN TLVSNPTKA VTLVENHDTQ PGQSLESTVQ PWFKPLAYAF
ILTRSGGYPS VFYGDMYGTK GTTTREIPAL KSKIEPLLKA RKDYAYGTQR
DYIDNPDVIG WTREGDSTKA KSGLATVITD GPGGSKRMVYV GTSNAGEIYW
DLTGNRTDKI TIGSDGYATF PVNGGSVSVW VQQ
```

[0385] La secuencia de aminoácidos de la forma madura del polipéptido de amilasa CspAmy2-C25F se muestra a continuación como SEQ ID N.º 27 [las sustituciones relevantes aparecen subrayadas]:

15

AATNGTMMQY FEWYVPNDGQ QWNRLRTDAP YLSSVGITAV WTPPAYKGTG
 QADVGYGPYD LYDLGEFNQK GTVRTKYGTK GELKSAVNLT HSNGIQVYGD
 VVMNHKAGAD YTENVTAVEV NPSNRYQETS GHYNIQAWTG FNFPGRGTTY
 SNWKWQWFHF DGTDWDQSRS LSRIFKFDGK AWDWEVSSSEN GNYDYLMYAD
 YDYDHPDVVN EMKKWGVWYA NEVGLDGYRL DAVKHIFQF LKDWDNARA
 ATGKEMFTVG EYWQNDLGAL NNYLFKVNYN QSLFDAPLHY NFYAASTGGG
 YYDMRNILNN TLVASNPTKA VTLVENHDTQ PGQSLESTVQ PWFKPLAYAF
 ILTRSGGYPS VFYGDMYGTK GTTTREIPAL KSKIEPLLKA RKDYAYGTQR
 DYIDNPDVIG WTREGDSTKA KSGLATVITD GPGGSKRMVYV GTSNAGEIWI
 DLTGNRTDKI TIGSDGYATF PVNGGSVSVW VQQ

Ejemplo 17

Variantes adicionales de base CspAmy2-v5 con mejor rendimiento en aplicaciones de limpieza

5 **[0386]** Las variantes adicionales de base CspAmy2-v5 se realizaron en un esfuerzo para mejorar además el rendimiento en aplicaciones de limpieza. Las variantes y las mutaciones se muestran en la Tabla 7. CspAmy2-v171 y CspAmy2-172 se habían descrito anteriormente en el Ejemplo 11. Todas las variantes incluían delecciones en las posiciones R178 y G179, que se señalan como «del (R178, G179)».

10

Tabla 7. Variantes adicionales de base CspAmy2-v5

Variante	Mutaciones
CspAmy2-v5	del (R178, G179) + E187P + I203Y + G476K
CspAmy2-v171	del (R178, G179) + T180D + E187P + I203Y + G476K
CspAmy2-v172	del (R178, G179) + N126Y + T180D + E187P + I203Y + G476K
CspAmy2-v179	del (R178, G179) + N126Y + T180D + E187P + I203Y + Y303D + G476T + G477E
CspAmy2-v180	del (R178, G179) + N126Y + T180D + E187P + I203Y + Y303D + N475E + G477Q
CspAmy2-v181	del (R178, G179) + N126Y + T180D + E187P + I203Y + Y303R + N475E + G476T + G477R
CspAmy2-v186	del (R178, G179) + T38N + N88H + N126Y + T129I + N134M + F153W + L171R + T180D + E187P + I203Y + G476K + G477E
CspAmy2-v191	del (R178, G179) + N126Y + E132H + T180D + E187P + I203Y + Y303D + G476T + G477E

15

20

[0387] Se analizó el rendimiento de limpieza de las variantes purificadas en un ensayo de limpieza de micromuestras llevado a cabo fundamentalmente según se ha descrito anteriormente. Las muestras CS-28 de CFT se perforaron para formar discos que medían 5,5 mm de diámetro. Se colocaron dos discos en cada pocillo de cada una de las 3 placas de ensayo de no unión de 96 pocillos con fondo plano. Las variantes de CspAmy2, STAINZYME® y ACE-QK se diluyeron, cada una, a 0,5 mg/ml en tampón de dilución (50 mM de MOPS (pH 7,2) y 0,005 % de Tween), y se diluyeron posteriormente a 18 ppm en una microplaca. Se realizaron diversas diluciones en las microplacas, hasta bajar a 0,27 ppm. Se añadieron 10 µl de cada una de estas muestras en las tres placas de muestras, y se incorporaron 170 µl de tampón HEPES (25 mM de HEPES, pH 8,0 con 2 mM de CaCl₂ y 0,005 % de Tween-80) en cada pocillo para un volumen final de 180 µl. Las concentraciones de enzimas finales oscilaban desde 1 ppm hasta 0,015 ppm. Las placas se incubaron a 25 °C con agitación a 1150 rpm

durante 15 minutos. El rendimiento de enzima fue evaluado según la cantidad de color liberado a la solución de lavado. La liberación de color se cuantificó espectrofotométricamente a 488 nm transfiriendo 140 µl de la solución final de lavado en nuevas microplacas de unión al medio, y se sustrajo el blanco de las lecturas triplicadas y se realizaron las medias.

- 5 **[0388]** Los resultados de los ensayos de limpieza de micromuestras llevados a cabo a 0,015 ppm de enzima se muestran en la Figura 28. Las variantes CspAmy2-v179, v186 y v191 mostraron todas un mejor rendimiento de limpieza en comparación con CspAmy2-v5, y todas las variantes combinatorias de CspAmy2 fueron considerablemente mejores que STAINZYME®. Los resultados de los ensayos de limpieza llevados a cabo con todas las concentraciones de enzimas se muestran en la Tabla 8. Todas las CspAmy2 mostraron un mejor
10 rendimiento de limpieza a menores concentraciones en comparación con STAINZYME®.

Tabla 8. Resultados de los ensayos de limpieza llevados a cabo utilizando variantes de CspAmy2

Enzima	Concentración de enzimas (ppm)								
	0,015	0,032	0,045	0,063	0,090	0,125	0,25	0,5	1,0
CspAmy2-v179	0,25	0,31	0,32	0,35	0,35	0,37	0,37	0,36	0,38
CspAmy2-v186	0,28	0,33	0,34	0,35	0,38	0,38	0,39	0,39	0,39
CspAmy2-v191	0,22	0,30	0,31	0,35	0,37	0,38	0,39	0,39	0,40
CspAmy2-v5	0,19	0,26	0,30	0,34	0,35	0,37	0,38	0,39	0,38
STAINZYME®	0,07	0,12	0,14	0,19	0,19	0,25	0,30	0,34	0,38
ACE-QK	0,30	0,33	0,36	0,34	0,35	0,36	0,36	0,38	0,38

- 15 **[0389]** Los ensayos de estabilidad térmica se llevaron a cabo fundamentalmente según se ha descrito. Los materiales de partida de las variantes de CspAmy2, STAINZYME® y ACE-QK a 0,5 mg/ml se diluyeron a 5 ppm, 10 ppm o 1 ppm, respectivamente, en tampón de dilución (50 mM de MOPS (pH 7,2) y 0,005 % de Tween) para representar sus actividades específicas relativas en el sustrato soluble. Se añadieron 50 µl de cada enzima en cada uno de los 12 tubos para PCR y se sellaron. Se incubaron las muestras «no estresadas» a temperatura ambiente a lo largo de la duración del experimento. Las otras muestras se incubaron en un termociclador en un
20 gradiente de 77 °C a 97 °C durante 15 minutos. Las muestras se transfirieron a microplacas por triplicado, y se midió la actividad de α-amilasa en todas las muestras no sometidas a estrés y sometidas a estrés empleando el reactivo Ceralpha (Megazyme, Inc.). Se calculó la actividad residual dividiendo la actividad de cada amilasa tras el estrés térmico por la actividad de esa amilasa no estresada.

- 25 **[0390]** Los resultados del ensayo de estabilidad térmica se muestran en la Figura 29. Tanto la variante CspAmy2-v186 como la variante v191 mostraron una mejor estabilidad térmica en comparación con CspAmy2-v5. Todas las variantes de CspAmy2 mostraron una mejor estabilidad térmica en comparación con STAINZYME® y ACE-QK.

- 30 **[0391]** La estabilidad de almacenamiento dentro del detergente de las variantes de CspAmy2 se analizó en varios detergentes comerciales, esto es, HDL normal de TIDE® y TIDE® PODS™ (Procter & Gamble) para el mercado de EE. UU., HDL de ARIEL™ (Procter & Gamble) y HDL de OMO Color (Unilever) para el mercado europeo, y OMO™ (Unilever) y HDL de LIBY™ (Liby) para el mercado chino. Todos los detergentes se inactivaron por calor a 90 °C durante 4 horas para eliminar las actividades de enzimas existentes. La actividad de enzimas en los detergentes inactivados por calor se midió por medio de los ensayos de Suc-AAPF-pNA y Ceralpha para medir, respectivamente, la actividad de proteasa y de amilasa.

- 35 **[0392]** Para preparar las muestras de estabilidad, se añadió un 2 % p/p de proteasa (PURAFFECT® Prime HA, DuPont Industrial Biosciences) y 0,5 % p/p de amilasa en cada muestra de detergente y se mezclaron. Las muestras se almacenaron en una incubadora de CO₂ (Sanyo) a 37 °C durante 28 días. Se extrajeron las alícuotas de cada muestra de reacción en diversos puntos temporales, diluidas en 50 mM de tampón MOPS (pH

7,15) con un 1 % añadido de BSA, y se midió la actividad de alfa-amilasa utilizando el sustrato de Ceralpha (Megazyme, Inc). La actividad de cada muestra se determinó utilizando un analizador fotométrico Arena 20XT (Thermo Scientific) utilizando un estándar calibrado. La actividad restante tras la incubación durante 28 días se presentó como un porcentaje de la actividad total determinada en el momento cero.

5 **[0393]** La cantidad de actividad residual de las variantes de CspAmy2 en comparación con STAINZYME® y ACE-QK se muestra en las Figuras 30-35. CspAmy2-v179 era especialmente estable en comparación con el resto de variantes analizadas y los controles.

[0394] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-v179 se muestra, a continuación, como SEQ ID N.º 28:

10

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSSVGITAVWTPPAYKGT SQADVGYGPY
 DLYDLGEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVN TLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENV TAV
 EVNPSNRYQETS GEYNIQAWTGFNF PGRGTTYSNFKWQWFHFDGTDWDQSRSL SRIFKF
 DGKAWDWPVSS ENGYDYL MYADYD YDHPDVVNEMKKWGVYANEVGLDGYRLDAVKHI
 KFSFLKDWVDNARAATGKEMFTVGEYWQNDLGALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAA
 STGGGDYDMRNILNNTLVASNP TKAVTLVENHDTQPGQSLESTVQPWFKPLAYAFILTR
 SGGYPSV FYGDMYGTGTTREIPAL KSKIEPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTR
 EGDSTKAKSGLATVITDGP GSKRMYVGT SNAGEIWYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPV
 NTE SVSVWVQQ

[0395] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-v180 se muestra, a continuación, como SEQ ID N.º 29:

15

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSSVGITAVWTPPAYKGT SQADVGYGPY
 DLYDLGEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVN TLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENV TAV
 EVNPSNRYQETS GEYNIQAWTGFNF PGRGTTYSNFKWQWFHFDGTDWDQSRSL SRIFKF
 DGKAWDWPVSS ENGYDYL MYADYD YDHPDVVNEMKKWGVYANEVGLDGYRLDAVKHI
 KFSFLKDWVDNARAATGKEMFTVGEYWQNDLGALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAA
 STGGGDYDMRNILNNTLVASNP TKAVTLVENHDTQPGQSLESTVQPWFKPLAYAFILTR
 SGGYPSV FYGDMYGTGTTREIPAL KSKIEPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTR
 EGDSTKAKSGLATVITDGP GSKRMYVGT SNAGEIWYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPV
 EGQSVSVWVQQ

[0396] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-v181 se muestra, a continuación, como SEQ ID N.º 30:

20

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSSVGITAVWTPPAYKGT SQADVGYGPY
 DLYDLGEFNQKGTVRTKYGTKGELKSAVN TLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENV TAV

EVNPSNRYQETSGEYNIQAWTGFNFPRGTTYSNFKWQWFHFDGTDWDQSRSLSRIFKF
 DGKAWDWPVSSSENGNYDYLMYADYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHI
 KFSFLKDWVDNARAATGKEMFTVGEYWQNDLGALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAA
 STGGGDYDMRNILNNTLVASNP TKAVTLVENHDTQPGQSLESTVQPFKPLAYAFILTR
 SGGYPSVFYGDYMGTKGTTTREIPALKSKIEPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTR
 EGDSTKAKSGLATVITDGPGGSKRMYVGT SNAGEIWYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPV
 ETRSVSVWVQQ

[0397] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-v186 se muestra, a continuación, como SEQ ID N.º 31:

5

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSVGINAVWTPPAYKGTSQADVGYGPY
 DLYDLGEFNQKGTVRTKYGKTELKSAVHTLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENVTA
 EVNPSNRYQEISGEYMIQAWTGFNFPRGTTYSNWKWQWFHFDGTDWDQSRSRSRIFKF
 DGKAWDWPVSSSENGNYDYLMYADYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHI
 KFSFLKDWVDNARAATGKEMFTVGEYWQNDLGALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAA
 STGGGYDMRNILNNTLVASNP TKAVTLVENHDTQPGQSLESTVQPFKPLAYAFILTR
 SGGYPSVFYGDYMGTKGTTTREIPALKSKIEPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTR
 EGDSTKAKSGLATVITDGPGGSKRMYVGT SNAGEIWYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPV
 NKESVSVWVQQ

[0398] La secuencia de aminoácidos de la forma madura de CspAmy2-v191 se muestra, a continuación, como SEQ ID N.º 32:

10

AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSVGITAVWTPPAYKGTSQADVGYGPY
 DLYDLGEFNQKGTVRTKYGKTELKSAVNTLHSNGIQVYGDVVMNHKAGADYTENVTA
 EVNPSNRYQETS GHYNIQAWTGFNFPRGTTYSNFKWQWFHFDGTDWDQSRSLSRIFKF
 DGKAWDWPVSSSENGNYDYLMYADYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHI
 KFSFLKDWVDNARAATGKEMFTVGEYWQNDLGALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHYNFYAA
 STGGGDYDMRNILNNTLVASNP TKAVTLVENHDTQPGQSLESTVQPFKPLAYAFILTR
 SGGYPSVFYGDYMGTKGTTTREIPALKSKIEPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPDVIGWTR
 EGDSTKAKSGLATVITDGPGGSKRMYVGT SNAGEIWYDLTGNRTDKITIGSDGYATFPV
 NTESVSVWVQQ

Ejemplo 18

Variantes combinatorias de PcuAmy1

15

[0399] Para determinar si las mutaciones combinatorias equivalentes daban como resultado aumentos de rendimiento similares en una molécula de α -amilasa distinta, se realizaron mutaciones equivalentes en una α -amilasa de *Paenibacillus curdlanolyticus* (esto es, PcuAmy1). La secuencia de aminoácidos de la forma madura del polipéptido PcuAmy1 se muestra a continuación (SEQ ID N.º 3):

ADNGTIMQYFEWYLPNDGAHWNRLNNDQAQNLKKNVGITAVWIPPAYKGGSSADVGYGVYD
 TYDLGEFNGKGTVRTKYGTKSELISAVNNLHAKGIAVYGDVVLNHRMNADATELVDAVE
 VDPNNRNVETTSTYQIQAWTQYDFPGRGNTYSSFKWRWYHFDGVDWDQSRGLNRIYKLR
 GDGKDWDWEVDSEYGNIDYLMGADLDFNHPDVVNETKTWGWKFVNTVNLGDVRLDAVKH
 IKFDFMRDWNVNRSTTGKNLFAVGEYWHYDVNKLNSYITKTNGTMSLFDVPLHFRFYD
 ASNGGGGYDMRNLNNTLMSSNPMKAVTFVENHDTQPTQALQSTVQSWFKPLAYATILT
 REQGYPCVIFYGDYYGTSDGKISSYKPIMDKLLNARKVYAYGTQRDYFDHPDIVGWTREG
 DAAHAGSGLATLITDGPGGSKWMYVGTSKAGQVWTDKTGNRSGTVTIDANGWGNFWVNG
 GSVSVWAK

5 **[0400]** Las mutaciones se realizaron en las posiciones N125, F152, R177, G178, E186, G472 y G473 utilizando
 SEQ ID N.º 3 para la numeración), correspondientes a las mutaciones en las posiciones N126, F153, R178,
 G179, E187P, G476 y G477, respectivamente, en CspAmy2 (SEQ ID N.º 1). Se introdujo una mutación adicional
 en la posición N205. A efectos de coherencia con la nomenclatura anterior, «del (R177, G178)» hace referencia a
 10 deleciones, en este caso en las posiciones R177 y G178. Además de las mutaciones mencionadas
 anteriormente, las variantes de PcuAmy1 incluyeron además mutaciones en la posición T333, A335 y Q337E.
 Estas mutaciones, especialmente en T333, aportan a PcuAmy1 resistencia a la proteasa, aunque no afectan al
 rendimiento (véase Ejemplo 19). Las variantes se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Variantes combinatorias de la amilasa PcuAmy1

Variante	Mutaciones
PcuAmy1-v1A	del (R177, G178) + N125Y + E186P + T333G + A335S + Q337E + G472K
PcuAmy1-v6	del (R177, G178) + N125Y + F152W + E186P + T333G + A335S + Q337E + G472K
PcuAmy1-v8	del (R177, G178) + N125Y + F152W + E186P + T333G + A335S + Q337E + G472R + G473R
PcuAmy1-v16	del (R177, G178) + N125Y + F152W + E186P + N205D + T333G + A335S + Q337E + G472K

15 **[0401]** La secuencia de nucleótidos con codón optimizado del gen *PcuAmy1* se expone como SEQ ID N.º: 33:

GCCGACAACGGCACAATCATGCAGTATTTTCGAGTGGTACCTGCCGAACGACGGAGCGCA
 CTGGAACAGACTTAATAACGACGCACAAAACCTGAAAAATGTGGGCATCACGGCAGTGT
 GGATTCCTCCGGCATAACAAGGGCGGCAGCTCAGCAGATGTTGGCTACGGAGTTTACGAT

ACATACGACCTGGGCGAGTTCAATCAGAAAGGCACGGTCAGAACAAAGTACGGAACGAA
 GAGCGAACTGATTTTCAGCGGTCAACAATCTTCACGCAAAGGGCATTGCGGTTTACGGCG
 ACGTGGTCCTGAACCATAGAATGAATGCGGATGCAACGGAGCTTGTGGATGCGGTTGAG
 GTGGATCCGAACAACAGAAACGTCGAGACGACAAGCACGTATCAGATCCAGGCATGGAC
 GCAATACGATTTCCCGGGCAGAGGCAACACGTACAGCAGCTTTAAATGGAGATGGTATC
 ACTTCGACGGCGTCTGACTGGGACCAGAGCAGAGGCCTGAACAGAATCTATAAGCTGAGA
 GCGGATGGCAAGGATTGGGACTGGGAGGTCGACAGCGAGTACGGCAACTACGATTACCT
 GATGGGAGCGGACCTGGACTTCAACCACCCGGATGTGGTTAACGAAACAAAGACATGGG
 GCAAATGGTTTGTGAACACGGTGAACCTGGATGGCGTCAGACTGGACGCGGTTAAGCAC
 ATCAAGTTCGACTTCATGAGAGACTGGGTGAACAACGTGAGAAGCACGACGGGCAAGAA
 CCTTTTCGCAGTTGGCGAGTATTGGCACTACGACGTGAACAAACTGAACAGCTACATCA
 CGAAGACGAATGGCAGCATGAGCCTGTTTCGACGTGCCGCTGCACCTTTAGATTTTATGAT
 GCAAGCAACGGCGGAGGCGGCTACGACATGAGAAACCTGCTGAATAACACGCTGATGAG
 CAGCAACCCGATGAAGGCGGTTACATTCGTTGAGAACCATGACACACAACCGACGCAGG
 CCCTGCAATCAACGGTCCAAAGCTGGTTTAAGCCGCTTTCGCTATGCTACAATCCTGACG
 AGAGAGCAAGGCTACCCGTGCGTTTTCTACGGCGACTATTATGGAACAAGCGACGGCAA
 AATTAGCAGCTACAAGCCGATCATGGATAAGCTTCTTAACGCGAGAAAGGTGTACGCCT
 ACGGCACGCAGAGAGATTACTTCGATCATCCGGACATCGTTGGCTGGACAAGAGAAGGC
 GATGCAGCACATGCTGGCTCAGGACTGGCAACGCTTATCACAGATGGCCCTGGCGGAAG
 CAAGTGGATGTATGTTGGAACGTCAAAGGCAGGCCAGGTCTGGACGGATAAAACAGGAA
 ACAGAAGCGGAACGGTGACGATTGATGCCAATGGCTGGGGAAACTTTTGGGTTAATGGC
 GGATCAGTTAGCGTTTGGGCAAAATAA

[0402] La secuencia de aminoácidos de la forma madura del polipéptido PcuAmy1-v1A se muestra a continuación como SEQ ID N.º 34:

5

ADNGTIMQYFEWYLPNDGAHWNRLNDAQNLIKNVGITAVWIPPAYKGGSSADVGYGVYD
 TYDLGEFNQKGTVRTKYGTKSELI SAVNNLHAKGIAVYGDVVLNHRMNADATELVDAVE
 VDPNNRYVETTSTYQIQAWTQYDFPGRGNTYSSFKWRWYHFDGVDWDQSRGLNRIYKLD
 GKDWDPVDSEYGNIDYLMGADLDFNHPDVVNETKTWGWKWFVNTVNLGVRDLDAVKHIK
 FDFMRDWNVNRSTTGKNLFAVGEYWHYDVNKLNSYITKTNGTMSLFDVPLHFRFYDAS
 NGGGGYDMRNLNNTLMS SNPMKAVTFVENHDTQPGQSLESTVQSWFKPLAYATILTRE
 QGYPCVIFYGDYYGTS DGKISSYKPIMDKLLNARKVYAYGTQRDYFDHPDIVGWTREGDA
 AHAGSLATLITDGPGGSKWYVGT SKAGQVWTDKGTGNRSGTVTIDANGWGNFVWNKGS
 VSVWAK

[0403] La secuencia de aminoácidos de la forma madura del polipéptido PcuAmy1-v6 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 35:

10

ADNGTIMQYFEWYLPNDGAHWNRLNNDQAQLKKNVGITAVWIPPAYKGGSSADVGYGVD
 TYDLGEFNQKGTVRTKYGTKSELISAVNNLHAKGIAVYGDVVLNHRMNADATELVDAVE
 VDPNNRYVETTSTYQIQAWTQYDFPGRGNTYSSWKWRWYHFDGVDWDQSRGLNRIYKLD
 GKDWDPVDSEYGNIDYLMGADLDFNHPDVVNETKTWGKWFVNTVNLGDVRLDAVKHIK
 FDFMRDWNVRSTTGKNLFAVGEYWHYDVNKLNSYITKTNGTMSLFDVPLHFRFYDAS
 NGGGGYDMRNLNNTLMSSNPMKAVTFVENHDTQPGQSLESTVQSWFKPLAYATILTRE
 QGYPCVFGDYGTSDGKISSYKPIDMKLLNARKVYAYGTQRDYFDHPDIVGWTREGDA
 AHAGSGLATLITDGPGGSKWMYVGTSKAGQVWTDKGTGNRSGTVTIDANGWGNFVWNKGS
 VSVWAK

[0404] La secuencia de aminoácidos de la forma madura del polipéptido PcuAmy1-v8 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 36:

5

ADNGTIMQYFEWYLPNDGAHWNRLNNDQAQLKKNVGITAVWIPPAYKGGSSADVGYGVD
 TYDLGEFNQKGTVRTKYGTKSELISAVNNLHAKGIAVYGDVVLNHRMNADATELVDAVE
 VDPNNRYVETTSTYQIQAWTQYDFPGRGNTYSSWKWRWYHFDGVDWDQSRGLNRIYKLD
 GKDWDPVDSEYGNIDYLMGADLDFNHPDVVNETKTWGKWFVNTVNLGDVRLDAVKHIK
 FDFMRDWNVRSTTGKNLFAVGEYWHYDVNKLNSYITKTNGTMSLFDVPLHFRFYDAS
 NGGGGYDMRNLNNTLMSSNPMKAVTFVENHDTQPGQSLESTVQSWFKPLAYATILTRE
 QGYPCVFGDYGTSDGKISSYKPIDMKLLNARKVYAYGTQRDYFDHPDIVGWTREGDA
 AHAGSGLATLITDGPGGSKWMYVGTSKAGQVWTDKGTGNRSGTVTIDANGWGNFVWNRRS
 VSVWAK

[0405] La secuencia de aminoácidos de la forma madura del polipéptido de PcuAmy1-v16 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 37:

10

ADNGTIMQYFEWYLPNDGAHWNRLNNDQAQLKKNVGITAVWIPPAYKGGSSADVGYGVD
 TYDLGEFNQKGTVRTKYGTKSELISAVNNLHAKGIAVYGDVVLNHRMNADATELVDAVE
 VDPNNRYVETTSTYQIQAWTQYDFPGRGNTYSSWKWRWYHFDGVDWDQSRGLNRIYKLD
 GKDWDPVDSEYGNIDYLMGADLDFDHPDVVNETKTWGKWFVNTVNLGDVRLDAVKHIK
 FDFMRDWNVRSTTGKNLFAVGEYWHYDVNKLNSYITKTNGTMSLFDVPLHFRFYDAS
 NGGGGYDMRNLNNTLMSSNPMKAVTFVENHDTQPGQSLESTVQSWFKPLAYATILTRE
 QGYPCVFGDYGTSDGKISSYKPIDMKLLNARKVYAYGTQRDYFDHPDIVGWTREGDA
 AHAGSGLATLITDGPGGSKWMYVGTSKAGQVWTDKGTGNRSGTVTIDANGWGNFVWNKGS
 VSVWAK

[0406] El rendimiento de limpieza de PcuAmy1-v1, PcuAmy1-v6, y PcuAmy1-v16, en comparación con STAINZYME® y ACE-QK, se muestra en la Figura 36. El ensayo de micromuestras se llevó a cabo según se ha descrito en el Ejemplo 17. PcuAmy1-v6 y PcuAmy1-v16 presentaron mejor rendimiento que PcuAmy1-v1 y STAINZYME® a dosis bajas (p. ej., 0,1 ppm de enzima o menos).

15

[0407] La estabilidad térmica de PcuAmy1-v1, PcuAmy1-v6, y PcuAmy1-v16, en comparación con STAINZYME®, se muestra en la Figura 37. Los ensayos se llevaron a cabo según se ha descrito en el Ejemplo 17. PcuAmy1-v16 presentaba una mayor estabilidad térmica que el resto de moléculas analizadas utilizando los mismos detergentes y dosis de enzimas.

5 **Ejemplo 19**

Variantes combinatorias en BASE

[0408] Al igual que en el Ejemplo 18, para determinar si las mutaciones combinatorias equivalentes daban como resultado aumentos de rendimiento similares en una molécula de α -amilasa distinta, se realizaron mutaciones equivalentes en una α -amilasa derivada de TS-23 de *Bacillus* sp. La secuencia de aminoácidos de BASE, una versión de C-terminal truncado de la α -amilasa TS-23 de *Bacillus* sp. (véase, p. ej., US20120045817 y WO2010/115028), se muestra a continuación como SEQ ID N.º 5:

NTAPINETMMQYFEWDLPN DGLWTKVKNEAANLSSSLGITALWLPAYKGT SQ
SDVGYGVYDLYDLGEF NQKGTIRTKYGTKTQYIQAIQA AKAAGMQVYADV VFN
HKAGADGTEFVDAVEVDPSNRNQETS GTYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSFKWRW
YHFDGTDWDESRKLNRIYKFRSTGKAWDWEVDTENGN YDYL MFADLDMDHPEV
VTELKNWGTWYVNTTNIDGFR L DAVKHIKYSFFPDWLT YVRNQ TGKNLFAVGE
FWSYDVNKLHNYITKTNGSMSLFDAPLHNNFYTASKSSGYFDMRYLLNNTLMK
DQPSLAVTLVDNHDTQPGQSLQSWVEPWFKPLAYAFILTRQEGYPCV FYGDYY
GIPKYNIPGLKSKIDPLLIARRDYAYGTQRDYIDHQDIIGWTREGIDTKPNSG
LAALITDGP GSKWMYVGK KHAGKVFYDLTGNRSDTVTINADGWGEFKVNGGS
VSIWVAK

15 [0409] La secuencia de ácido nucleico de codón modificado que codifica la forma madura de BASE (AmyTS23t) se expone como SEQ ID N.º 38:

TCTGCAGCT	TCAGCA AAC	ACCGCGCCG	ATTAACGAA	ACCATGATG
CAGTATTTT	GAATGGGAT	CTGCCGAAC	GATGGCACC	CTGTGGACC
AAAGTGAAA	AACGAAGCG	GCGAACCTG	AGCAGCCTG	GGCATTACC
GCGCTGTGG	CTGCCGCCG	GCATATAAA	GGCACCAGC	CAGAGCGAT
GTGGGCTAT	GGCGTGTAT	GATCTGTAC	GATCTGGGC	GAATTTAAC
CAGAAAGGC	ACCATTCGT	ACCAAATAT	GGCACCAA	ACCCAGTAT
ATTCAGGCG	ATCCAGGCG	GCGAAAGCG	GCGGGTATG	CAGGTGTAT
GCGGATGTG	GTGTTTAAC	CATAAAGCG	GGTGCGGAT	GGCACCGAA
TTTGTGGAT	GCGGTGGAA	GTGGATCCG	AGCAACCGT	AACCAGGAA
ACCAGCGGC	ACCTATCAG	ATTCAGGCG	TGGACCAA	TTTGATTTT
CCCGGCCGT	GGCAACACC	TATAGCAGC	TTTAAATGG	CGCTGGTAT
CATTTTGAT	GGCACCGAT	TGGGATGAA	AGCCGTAAA	CTGAACCGC
ATCTATAAA	TTTCGTAGC	ACCGGCAA	GCGTGGGAT	TGGGAAGTG
GATACCGAA	AACGGCAAC	TATGATTAC	CTGATGTTC	GCAGACCTG
GATATGGAT	CATCCGGAA	GTGGTGACC	GAACGTAAA	AACTGGGGC
ACCTGGTAT	GTGAACACC	ACCAACATT	GATGGCTTT	CGTCTGGAT

```

GCGGTGAAA CACATCAAA TACAGCTTT TTTCCGGAT TGGCTGACC
TATGTGCGT AACAGACC GGCAAAAAC CTGTTTGCG GTGGGCGAA
TTTTGGAGC TATGATGTG AACAAACTG CACAACACTAC ATCACCAAA
ACCAACGGC AGCATGAGC CTGTTTGAT GCGCCGCTG CATAACAAC
TTTTATAACC GCGAGCAAA AGCAGCGGC TATTTTGAT ATGCGTTAT
CTGCTGAAC AACACCCTG ATGAAAGAT CAGCCGAGC CTGGCCGTG
ACCCTGGTG GATAACCAT GATACCCAG CCGGGCCAG AGCCTGCAA
AGCTGGGTG GAACCGTGG TTTAAACCG CTGGCCTAC GCGTTTATT
CTGACCCGT CAAGAGGGC TATCCGTGC GTTTTTTAT GGCGATTAT
TACGGCATC CCGAAATAT AACATTCCG GGCCTGAAA AGCAAAATT
GATCCGCTG CTGATTGCG CGTCGTGAT TATGCGTAT GGCACCCAG
CGTGATTAT ATTGATCAC CAGGATATT ATTGGCTGG ACCCGTGAA
GGCATTGAT ACCAAACCG AACAGCGGC CTGGCCGCG CTGATTACC
GATGGCCCG GGTGGCAGC AAATGGATG TATGTGGGC AAAAAACAT
GCGGGCAAA GTGTTTTAT GATCTGACC GGCAACCGT AGCGATACC
GTGACCATT AACGCGGAT GGCTGGGGT GAGTTTAAA GTGAACGGC
GGCAGCGTG AGCATTTGG GTGGCGAAA TAAGTTAAC AGA
    
```

5 **[0410]** Se realizaron mutaciones en las posiciones N128, T134, F155, T182, R180, S181, E189 y G475 en BASE (utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración), que se corresponden con mutaciones en las posiciones N126, E132, F153, R178, G179, E187P, y G476, respectivamente, en CspAmy2 (SEQ ID N.º 1). Las variantes se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Variantes combinatorias de la amilasa BASE

Variante	Mutaciones
BASE-V28	del (R180, G181) + N128Y + E189P + G475R
BASE-V29	del (R180, G181) + F155W + E189P + G475R
BASE-V30	del (R180, G181) + T134E + T182H + E189P + G475R
BASE-V31	del (R180, G181) + N128Y + T134E + T182H + E189P + G475R
BASE-V32	del (R180, G181) + N128Y + F155W + E189P + G475R
BASE-V33	del (R180, G181) + T134E + F155W + T182H + E189P + G475R
BASE-V34	del (R180, G181) + N128Y + T134E + F155W + T182H + E189P + G475R
BASE-V35	del (R180, G181) + N128Y + T134H + F155W + T182D + E189P + G475R
BASE-V36	del (R180, G181) + N128Y + T134E + F155W + T182G + E189P + G475R
ACE-QK	del (R180, G181) + S243Q + G475K

10 **[0411]** La secuencia de aminoácidos de BASE-V28 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 39:

ES 2 676 895 T3

NTAPINETMMQYFEWDLPNMGTLWTKVKNEAANLSSLGITALWLPPAYKGTSSQS
DVGYGVDLYDLGFEFNQKGTIRTKYGTQTQYIQAIQAACAAGMQVYADVVFVNHK
AGADGTEFVDAVEVDPSNRYQETSGTYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSFKWRWYHF
DGTDWDESRLNRIYKFTGKAWDWPVDTENGNYDYLMFADLDMDHPEVVTELKN
WGTWYVNTTNIDGFRLDAVKHIKYSFFPDWLT YVRNQTGKNLFAVGEFWSYDVN
KLHNYITKTNGSMSLFDAPLHNNFYTASKSSGYFDMRYLLNNTLMKDQPSLAVT
LVDNHDTQPGQSLQSWVEPWFKPLAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPKYNIPG
LKSKIDPLLIARRDYAYGTQRDYIDHQDIIGWTREGIDTKPNSGLAALITDGPG
GSKWMYVGKKHAGKVFDLGTNRSDTVTINADGWGEFKVNRGSVSIWVAK

[0412] La secuencia de aminoácidos de BASE-V29 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 40:

5

NTAPINETMMQYFEWDLPNMGTLWTKVKNEAANLSSLGITALWLPPAYKGTSSQS
DVGYGVDLYDLGFEFNQKGTIRTKYGTQTQYIQAIQAACAAGMQVYADVVFVNHK
AGADGTEFVDAVEVDPSNRNQEETSGTYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSWKWRWYHF
DGTDWDESRLNRIYKFTGKAWDWPVDTENGNYDYLMFADLDMDHPEVVTELKN
WGTWYVNTTNIDGFRLDAVKHIKYSFFPDWLT YVRNQTGKNLFAVGEFWSYDVN
KLHNYITKTNGSMSLFDAPLHNNFYTASKSSGYFDMRYLLNNTLMKDQPSLAVT
LVDNHDTQPGQSLQSWVEPWFKPLAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPKYNIPG
LKSKIDPLLIARRDYAYGTQRDYIDHQDIIGWTREGIDTKPNSGLAALITDGPG
GSKWMYVGKKHAGKVFDLGTNRSDTVTINADGWGEFKVNRGSVSIWVAK

[0413] La secuencia de aminoácidos de BASE-V30 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 41:

10

NTAPINETMMQYFEWDLPNMGTLWTKVKNEAANLSSLGITALWLPPAYKGTSSQS
DVGYGVDLYDLGFEFNQKGTIRTKYGTQTQYIQAIQAACAAGMQVYADVVFVNHK
AGADGTEFVDAVEVDPSNRNQEETSGEYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSFKWRWYHF
DGTDWDESRLNRIYKFHGKAWDWPVDTENGNYDYLMFADLDMDHPEVVTELKN
WGTWYVNTTNIDGFRLDAVKHIKYSFFPDWLT YVRNQTGKNLFAVGEFWSYDVN
KLHNYITKTNGSMSLFDAPLHNNFYTASKSSGYFDMRYLLNNTLMKDQPSLAVT
LVDNHDTQPGQSLQSWVEPWFKPLAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPKYNIPG
LKSKIDPLLIARRDYAYGTQRDYIDHQDIIGWTREGIDTKPNSGLAALITDGPG
GSKWMYVGKKHAGKVFDLGTNRSDTVTINADGWGEFKVNRGSVSIWVAK

[0414] La secuencia de aminoácidos de BASE-V31 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 42:

NTAPINETMMQYFEWDLPNMGTLWTKVKNEAANLSSLGITALWLPPAYKGTSSQS
DVGYGVDLYDLGFEFNQKGTIRTKYGTQYIQAIQAACAAGMQVYADVVFVNHK
AGADGTEFVDAVEVDPSNRYQETSSEYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSFKWRWYHF
DGTDWDESRLNRIYKFHGKAWDWPVDTENGNYDYLMAFADLDMDHPEVVTELKN
WGTWYVNTTNIDGFRLDAVKHIKYSFFPDWLTYYVRNQTGKNLFAVGEFWSYDVN
KLHNYITKTNGSMSLFDAPLHNNFYTASKSSGYFDMRYLLNNTLMKDQPSLAVT
LVDNHDTQPGQSLQSWVEPWFKPLAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPKYNIPG
LKSKIDPLLIARRDYAYGTQRDYIDHQDIIGWTREGIDTKPNSGLAALITDGPG
GSKWMYVGKKHAGKVFDLGTNRSDTVTINADGWGEFKVNRGSVSIWVAK

[0415] La secuencia de aminoácidos de BASE-V32 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 43:

NTAPINETMMQYFEWDLPNMGTLWTKVKNEAANLSSLGITALWLPPAYKGTSSQS
DVGYGVDLYDLGFEFNQKGTIRTKYGTQYIQAIQAACAAGMQVYADVVFVNHK
AGADGTEFVDAVEVDPSNRYQETSSEYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSWKWRWYHF
DGTDWDESRLNRIYKFTGKAWDWPVDTENGNYDYLMAFADLDMDHPEVVTELKN
WGTWYVNTTNIDGFRLDAVKHIKYSFFPDWLTYYVRNQTGKNLFAVGEFWSYDVN
KLHNYITKTNGSMSLFDAPLHNNFYTASKSSGYFDMRYLLNNTLMKDQPSLAVT
LVDNHDTQPGQSLQSWVEPWFKPLAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPKYNIPG
LKSKIDPLLIARRDYAYGTQRDYIDHQDIIGWTREGIDTKPNSGLAALITDGPG
GSKWMYVGKKHAGKVFDLGTNRSDTVTINADGWGEFKVNRGSVSIWVAK

5

[0416] La secuencia de aminoácidos de BASE-V33 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 44:

NTAPINETMMQYFEWDLPNMGTLWTKVKNEAANLSSLGITALWLPPAYKGTSSQS
DVGYGVDLYDLGFEFNQKGTIRTKYGTQYIQAIQAACAAGMQVYADVVFVNHK
AGADGTEFVDAVEVDPSNRNQETSSEYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSWKWRWYHF
DGTDWDESRLNRIYKFHGKAWDWPVDTENGNYDYLMAFADLDMDHPEVVTELKN
WGTWYVNTTNIDGFRLDAVKHIKYSFFPDWLTYYVRNQTGKNLFAVGEFWSYDVN
KLHNYITKTNGSMSLFDAPLHNNFYTASKSSGYFDMRYLLNNTLMKDQPSLAVT
LVDNHDTQPGQSLQSWVEPWFKPLAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPKYNIPG
LKSKIDPLLIARRDYAYGTQRDYIDHQDIIGWTREGIDTKPNSGLAALITDGPG
GSKWMYVGKKHAGKVFDLGTNRSDTVTINADGWGEFKVNRGSVSIWVAK

10

[0417] La secuencia de aminoácidos de BASE-V34 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 45:

NTAPINETMMQYFEWDLPNMGTLWTKVKNEAANLSSLGITALWLPPAYKGTSSQSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTIRTKYGTQYIQAIQAACAAGMQVYADVVFVNHKAGADGTEFVDAVEVDPSNRYQETSSEYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSWKWRWYHFDGTDWDESRLNRIYKFHGKAWDWPVDTENGNYDYLMFADLDMDHPEVVTELKNWGTWYVNTTNIDGFRLDAVKHIKYSFFPDWLTYYVRNQTGKNLFAVGEFWSYDVNKLHNYITKTNGSMSLFDAPLHNNFYTASKSSGYFDMRYLLNNTLMKDQPSLAVTLVDNHDTQPGQSLQSWVEPWFKPLAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPKYNIPGLKSKIDPLLIARRDYAYGTQRDYIDHQDIIGWTREGIDTKPNSGLAALITDGPGGSKWMYVGKKHAGKVFDLTGNRSDTVTINADGWGEFKVNRGSVSIWVAK

[0418] La secuencia de aminoácidos de BASE-V35 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 46:

NTAPINETMMQYFEWDLPNMGTLWTKVKNEAANLSSLGITALWLPPAYKGTSSQSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTIRTKYGTQYIQAIQAACAAGMQVYADVVFVNHKAGADGTEFVDAVEVDPSNRYQETSSEYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSWKWRWYHFDGTDWDESRLNRIYKFDGKAWDWPVDTENGNYDYLMFADLDMDHPEVVTELKNWGTWYVNTTNIDGFRLDAVKHIKYSFFPDWLTYYVRNQTGKNLFAVGEFWSYDVNKLHNYITKTNGSMSLFDAPLHNNFYTASKSSGYFDMRYLLNNTLMKDQPSLAVTLVDNHDTQPGQSLQSWVEPWFKPLAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPKYNIPGLKSKIDPLLIARRDYAYGTQRDYIDHQDIIGWTREGIDTKPNSGLAALITDGPGGSKWMYVGKKHAGKVFDLTGNRSDTVTINADGWGEFKVNRGSVSIWVAK

5

[0419] La secuencia de aminoácidos de BASE-V36 se muestra a continuación como SEQ ID N.º 47:

NTAPINETMMQYFEWDLPNMGTLWTKVKNEAANLSSLGITALWLPPAYKGTSSQSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTIRTKYGTQYIQAIQAACAAGMQVYADVVFVNHKAGADGTEFVDAVEVDPSNRYQETSSEYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSWKWRWYHFDGTDWDESRLNRIYKFGGKAWDWPVDTENGNYDYLMFADLDMDHPEVVTELKNWGTWYVNTTNIDGFRLDAVKHIKYSFFPDWLTYYVRNQTGKNLFAVGEFWSYDVNKLHNYITKTNGSMSLFDAPLHNNFYTASKSSGYFDMRYLLNNTLMKDQPSLAVTLVDNHDTQPGQSLQSWVEPWFKPLAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPKYNIPGLKSKIDPLLIARRDYAYGTQRDYIDHQDIIGWTREGIDTKPNSGLAALITDGPGGSKWMYVGKKHAGKVFDLTGNRSDTVTINADGWGEFKVNRGSVSIWVAK

10

[0420] La estabilidad térmica de BASE-V28, V29, V30, V31, V32, V33, V34 y V35, en comparación con ACE-QK (p. ej., US20120045817 y WO2010/115028), se muestra en la Figura 38. Todas las variantes de BASE eran más estables que ACE-QK, aunque BASE-V28 era solo ligeramente más estable.

Ejemplo 19

15 **Interacciones entre residuos en moléculas con delección de RG**

[0421] Una interacción estructural entre los residuos 132 y 180 (en referencia a SEQ ID N.º 1 para la numeración) explica el aumento de la estabilidad en algunas de las variantes. Los detalles de la estructura cristalina de CspAmy2-v1 se muestran en las Figuras 39-42. Según se muestra en la Figura 39, la cadena lateral

de glutamato que se origina de forma natural en la posición 132 se orienta hacia la cadena lateral de treonina que se origina de forma natural en la posición 180. No obstante, la distancia de 5,4 ángstroms es demasiado elevada para la formación de cualquier interacción estabilizante. Como se muestra en la Figura 40, una variante de T180H (p. ej., CspAmy2-vC16C) presenta el grupo NH de imidazol de histidina próximo al carboxilato de glutamato E132. La distancia de 3,2 ángstroms permite la formación de un enlace de hidrógeno estabilizante. A un pH de aproximadamente 4,5 a 7,0, también es probable que tenga lugar una interacción de cargas favorable (esto es, un puente salino) entre estos residuos. En referencia, por ejemplo, a los Ejemplos 6 y 7 y a las Figuras 8-10, las observaciones de que CspAmy2-C16E es más estable que CspAmy2-C16C, CspAmy2-C16F es más estable que CspAmy2-C16D, CspAmy2-C16I es más estable que CspAmy2-C16G, y de que CspAmy2-C16J es más estable que CspAmy2-C16H, cuyos pares de variantes difieren únicamente por la presencia o ausencia de la mutación T180H, respaldan esta hipótesis. Del mismo modo, en referencia, p. ej., a los Ejemplos 17 y a la Figura 29, la observación de que CspAmy2-v191 es más estable que CspAmy2-v179, cuyos pares de variantes difieren únicamente por la presencia o ausencia de la mutación E132H, respaldan esta hipótesis.

[0422] Según se muestra en la Figura 41, un ácido aspártico en la posición 180 también puede ser capaz de formar enlace de hidrógeno con el glutamato en la posición 132, aunque el enlace de hidrógeno puede presentar demasiadas interacciones de carga de tipo no favorable. Sin embargo, la presencia de histidina en la posición 132, en combinación con un aspartato en la posición 180, restablece la posibilidad de que exista una interacción favorable creada por una mutación T180D (Figura 42). El efecto estabilizador de la mutación E132H en CspAmy2-v191 y CspAmy2-C25A, B, y F, que presentan todos una mutación T180D, respalda esta hipótesis (p. ej., el Ejemplo 16 y la Figura 27).

[0423] En BASE, la posición E132 se corresponde con la posición T134, y la posición T180 se corresponde con la posición T182. Las observaciones de que BASE-V31 es más estable que BASE-V28 y de que BASE-V33 es más estable que BASE-V29 respaldan además esta hipótesis en el contexto de una α -amilasa distinta. En ambos casos, las mutaciones T134E y T180H parecen funcionar conjuntamente para permitir la formación de una interacción estabilizante, probablemente un puente salino. De forma similar, V34 es más estable que V36, debido a la interacción estabilizante entre el glutamato y la histidina en V34, que no tiene lugar entre el glutamato y la glicina en V36.

[0424] Aunque la interacción entre las posiciones 132-180 se mostró utilizando una delección «RG», se puede esperar que funcione completamente en el contexto de una delección «DG» o «TG» adyacente. Hay que entender que el motivo de la secuencia de aminoácidos conservada $X_1G/S_1X_2G_2$ (SEQ ID N.º 48), como se ejemplifica por RGTG (SEQ ID N.º 49) en la α -amilasa CspAmy2 (SEQ ID N.º 1), es adyacente al lazo de unión al calcio en α -amilasas. X1 es normalmente arginina. Más frecuentemente, G/S1 es glicina, aunque en el caso de BASE es serina. X2 varía, aunque normalmente es aspartato o treonina. G2 está muy conservado. El hecho de realizar una delección de la TG en la α -amilasa CspAmy2, en lugar de RG, significaría que los residuos restantes serían RG en lugar de TG. Aunque la arginina se derivaría de la posición 178, al contrario que la treonina, que se deriva de la posición 180, la estructura tridimensional de la variante resultante no se puede distinguir de una que presente una delección de RG más una sustitución de R a G, y el hecho de estabilizar la molécula resultante es simplemente una cuestión de seleccionar un residuo adecuado en la posición 132 para formar una interacción estabilizante con cualquier residuo que quede en la posición equivalente en el motivo $X_1G/S_1X_2G_2$, ya se corresponda originalmente con la posición 180 o con la posición 178 en la molécula original (utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración). Para mayor comodidad, se puede hacer referencia a este residuo como el residuo no G restante en el motivo mencionado anteriormente.

[0425] Por consiguiente, en general, si la posición 132 presenta carga negativa (esto es, D o E), el residuo no G restante debería presentar, por tanto, carga positiva (esto es, H, R, o K). Si la posición 132 presenta carga positiva (esto es, H, R o K), entonces el residuo no G restante debería presentar, por tanto, carga negativa (esto es, D o E).

Ejemplo 19

Escisión proteolítica de PcuAmy1 y variantes

[0426] La incubación de la amilasa PcuAmy1 natural, o de la variante PcuAmy-v1, con proteasas de subtilisina, deriva en la escisión de las proteínas, como se puede observar cuando los productos de reacción se someten a la electroforesis SDS/PAGE. La Figura 43 es una imagen de un gel SDS/PAGE que muestra la escisión de 20 μ g de PcuAmy1-v1 en presencia de cantidades crecientes de proteasa GG36, (de 0 a 40 μ g, según se indica en la parte superior del gel). Las letras situadas a la derecha del gel indican (A) PcuAmy1-v1 intacta de longitud completa, (B) un primer producto de escisión de PcuAmy1-v1, (C) proteasa GG36, (D) un contaminante en la preparación de proteína GG36, y (E) un segundo producto de escisión de PcuAmy1-v1. Los principales productos de degradación observados tras la incubación de la amilasa PcuAmy-v1 con una proteasa de subtilisina poseen un peso molecular de aproximadamente 38 y 16 kDa (B y E, respectivamente). La cantidad de degradación proteolítica depende de la concentración de proteasa utilizada. Este hecho provoca que la amilasa PcuAmy1 sea insuficiente para su inclusión en formulaciones de detergente con enzimas que contengan proteasas de subtilisina utilizadas habitualmente.

[0427] Se incubó una muestra de proteína PcuAmy-v1 con proteasa GG36 (subtilisina de *Bacillus lentis*) y se analizaron los productos de reacción mediante espectroscopia de masas. Los resultados fueron coherentes con la hidrólisis que tuvo lugar entre los residuos Q334 y L336 (no mostrados).

5 **[0428]** Para determinar si las variantes de PcuAmy de proteasa estable podrían modificarse, se construyeron y se analizaron tanto PcuAmy1-v3 como las variantes de 3A a 3L. PcuAmy1-v3 es una variante de PcuAmy1 con las mutaciones E186P, G472K, y que carece de R177 y G178 (utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración). La sustitución E186P y las deleciones en R177 y G178 aumentan la estabilidad detergente de PcuAmy1. La sustitución G472K mejora el rendimiento de limpieza. Ninguna de estas mutaciones presenta ningún efecto en la sensibilidad de la proteasa (datos no representados). Por consiguiente, el hecho de incluir estas mutaciones en
10 variantes realizadas para explorar el efecto de otras mutaciones en la estabilidad de la proteasa no interfiere en los resultados.

[0429] La forma madura de PcuAmy1-v3 se muestra, a continuación, como (SEQ ID N.º 50):

ADNGTIMQYFEWYLPNDGAHWNRLNNDQAQNLKNVGITAVWIIPPAYKGGSSADVG
YGVYDITYDLGEFNGKGTVRTKYGTKSELISAVNNLHAKGIAVYGDVVLNHRMNA
DATELVDAVEVDPNNRNVEETTSTYQIQAWTQYDFPGRGNTYSSFKWRWYHFDGV
15 DWDQSRGLNRIYKLDGKDWDWVPVSEYGNVDYLMGADLDFNHPDVVNETKTWGK
WFWNTVNLDGVRLDAVKHIKDFMIRDWVNNVRSTTGKNLFAVGEYWHYDVNKLN
SYITKTNGTMSLFDVPLHFRFYDASNGGGGYDMRLLNNTLMSSNPMKAVTFVE
NHDTQPTQALQSTVQSWFKPLAYATILTREQGYPCVFYGDYYGTSDGKISSYKP
IMDKLLNARKVYAYGTQRDYFDHPDIVGWTREGDAAHAGSGLATLITDGPGGSK
WMYVGTSKAGQVWTDKGTGNRSGTVTIDANGWGNFVWNKGSVSVWAK

20 **[0430]** Para identificar el motivo de la sensibilidad de la proteasa PcuAmy1, se comparó la secuencia de aminoácidos de PcuAmy1 con la de otras amilasas GH-13 de la familia CAZy que muestran resistencia a la proteasa, como PURASTAR® ST (amilasa o AmyL de *B. licheniformis*), SPEZYME® XTRA (amilasa o AmyS de *Geobacillus stearothermophilus*), ACE-QK (WO2010/115021), y STAINZYME® (Novozymes). Basándose en las diferencias observadas en la secuencia, se diseñaron las variantes de PcuAmy1 PcuAmy1-v3A a PcuAmy1-v3L (esto es, 3A-3L) y se analizaron para la resistencia a la proteasa. Las mutaciones presentes en cada variante se listan en la Tabla 11. Se introdujeron en PcuAmy1-v3 (SEQ ID N.º 49) utilizando métodos estándar, muchos de
25 los cuales se describen anteriormente.

Tabla 11. Lista de mutaciones introducidas en PcuAmy1-v3 que dan como resultado las variantes 3A a 3L

Posición	Peso	3A	3B	3C	3D	3E	3F	3G	3H	3I	3J	3K	3L
319	M									T			
333	T	G	G	G	G							G	G
335	A		S	S	S		S					S	S
337	Q		E	E	E			E					E
339	T											W	
341	Q											E	
342	S			P	P				P			P	T

Posición	Peso	3A	3B	3C	3D	3E	3F	3G	3H	3I	3J	3K	3L
351	T			F		F					W		

[0431] Las 12 variantes de PcuAmy1 se expresaron en *B. subtilis* según se ha descrito anteriormente. Se incubaron 40 µl de sobrenadante filtrado de cada caldo de cultivo de variante de PcuAmy1 con 100 µg de proteasa GG36 durante 6 horas a temperatura ambiente, y posteriormente se analizaron para determinar la actividad de amilasa restante utilizando el ensayo de sustrato Ceralpha de Megazyme (Megazyme International Ireland, CO. Wicklow, Irlanda). La actividad residual tras la incubación con proteasa se comparó con la actividad de amilasa de cada muestra tras la incubación únicamente con tampón. Los resultados se muestran en la Figura 44. Asimismo, se analizó un subconjunto de las muestras mediante SDS-PAGE (Figura 45), con el estándar de proteína, SEEBLUE® Plus2 (Invitrogen). Las amilasas disponibles comercialmente se incluyeron para fines de comparación.

[0432] Las variantes de PcuAmy1 3A, 3B, 3C, 3D y 3L mantuvieron >70 % de su actividad enzimática tras la incubación con proteasa GG36. Las variantes de PcuAmy1 3J y 3K mantuvieron >65 % de su actividad enzimática tras la incubación con proteasa GG36. Las variantes de PcuAmy1 3E, 3F, 3G, 3H y 3I no mostraron un incremento notable de la estabilidad en comparación con la enzima natural. Las muestras de las incubaciones de 3B, 3C, 3D, y 3L se analizaron mediante SDS/PAGE y mostraron una reducción significativa de los productos de degradación al incubarse con proteasa GG36, confirmando que el incremento en la actividad de amilasa residual se debía a la reducción de la escisión proteolítica.

[0433] Estos resultados del experimento a pequeña escala indican que la introducción de una mutación en la posición T333 reduce significativamente la escisión proteolítica de PcuAmy1, y que las mutaciones adicionales en A335, Q337, y S342 reducen además la escisión proteolítica. La mutación T351W, al contrario que la mutación T351F, también parece reducir la escisión proteolítica de PcuAmy1.

[0434] Para caracterizar de mejor forma las contribuciones relativas de estas mutaciones a la resistencia a la proteasa, se realizaron las siguientes variantes adicionales:

PcuAmy1-v10: del (R177, G178) + E186P + T333G + Q337E + G472K
PcuAmy1-v11: del (R177, G178) + E186P + T333G + A335S + G472K
PcuAmy1-v12: del (R177, G178) + E186P + A335S + Q337E + G472K
PcuAmy1-v13: del (R177, G178) + E186P + T333G + A335S + Q337E + T351W + G472K

[0435] Las variantes PcuAmy1-v10, PcuAmy1-v11, y PcuAmy1-v12 incluyen pares de combinaciones de mutaciones en las posiciones T333, A335, y Q337. PcuAmy1-v3-v13 incluye mutaciones en todas las posiciones mencionadas anteriormente e incluye la mutación adicional T351W. Estas variantes se compararon en un ensayo de estabilidad detergente a gran escala con las siguientes variantes descritas anteriormente:

PcuAmy1-v3B: del (R177, G178) + E186P + T333G + A335S + Q337E + G472K
PcuAmy1-v3L: del (R177, G178) + E186P + T333G + A335S + Q337E + S342T + G472K

[0436] Los detergentes comerciales Total Color (MIFA Ag Frenkendorf, Suiza) y Omo (Unilever, Londres, Reino Unido) se inactivaron por calor a 90 °C durante 4 horas para eliminar las actividades de enzimas existentes. La actividad de enzimas en los detergentes inactivados por calor se midió empleando los ensayos de Suc-AAPF-pNA y Ceralpha para medir, respectivamente, la actividad de proteasa y de amilasa. Para preparar las muestras de estabilidad, se añadió un 2 % p/p de proteasa (PURAFFECT® Prime 4000L, Danisco US Inc.) y un 0,5 % p/p de amilasa en cada muestra de detergente y se mezclaron. Las muestras se almacenaron en una incubadora de CO₂ (Sanyo) a 37 °C durante 14 días. Se extrajeron las alícuotas de cada muestra de reacción en diversos puntos temporales, se diluyeron en 50 mM de tampón MOPS con pH 7,15 con un 1 % añadido de BSA, y la actividad de alfa-amilasa se midió utilizando el sustrato de Ceralpha (Megazyme, Inc). Se determinó la actividad de cada muestra utilizando un analizador fotométrico Arena 20XT (Thermo Scientific) por medio de un estándar calibrado. La actividad restante en cada punto temporal se presentó como un porcentaje (%) de la actividad total determinada en el momento cero.

[0437] Los resultados de los ensayos de estabilidad detergente llevados a cabo en MIFA Total (MIFA Ag Frenkendorf, Suiza) y OMO de Unilever (Unilever, Londres, Reino Unido) se muestran en las Figuras 46-50. Las Figuras 46 y 48 muestran la actividad residual de las variantes de PcuAmy1 a lo largo del tiempo en MIFA Total y en Omo de Unilever, respectivamente, complementados con proteasa FNA. Las Figuras 47 y 49 resumen los datos de los puntos temporales de 3 y 14 días. Las variantes de PcuAmy1 que incluyen la mutación T333, esto es, 3B, 3L, v10, v13, y a menor escala, v11, fueron las más estables. Las variantes que no incluían la mutación T333, esto es, V1 y v12, fueron las menos estables. Tal como se refleja en v10 y v11, la presencia de una mutación en Q337E mejora además la estabilidad.

- 5 [0438] El rendimiento de limpieza de PcuAmy1-v3B y PcuAmy1-v3L purificadas se analizó en un ensayo de limpieza de micromuestras. Se perforó el almidón de arroz CS-28 en muestras de algodón del CFT (Center for Testmaterials, BV, Vlaardingen, Países Bajos) que contenían un tinte indicador ligado al almidón para formar discos que medían 5,5 mm de diámetro. Se colocaron dos discos en cada pocillo de tres placas de ensayo de 96 pocillos de no unión con fondo plano.
- 10 [0439] Ambas enzimas y los dos productos de amilasa comerciales: PURASTAR® ST (alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*; DuPont Industrial Biosciences, Palo Alto, California, EE. UU.), y STAINZYME® (Novozymes, Copenhague, Dinamarca) se diluyeron a 0,5 mg/ml en tampón de dilución (50 mM de MOPS, pH 7,2, 0,005 % de Tween), y a continuación se diluyeron a 2 ppm en una microplaca. Se transfirieron 200 µl de estas muestras a la primera fila de cada una de las tres placas de muestras. A continuación, se añadieron 100 µl de tampón de HEPES (25 mM de HEPES, pH 8,0 con 2 mM de CaCl₂ y 0,005 % de Tween-80) en cada pocillo de las siguientes cinco filas de las placas de muestras, y se realizaron diluciones en serie para dar como resultado concentraciones de enzimas finales de 2, 1, 0,5, 0,25 y 0,125 ppm, así como una fila de pocillos con blanco (únicamente tampón) con 200 µl en cada pocillo. Las placas se incubaron a 25 °C con agitación a 1150 rpm durante 15 minutos. La solución de lavado se transfirió a microplacas nuevas y el rendimiento de enzima se evaluó mediante la cantidad de color liberado en la solución de lavado. La liberación de color se cuantificó espectrofotométricamente a 488 nm, y se sustrajo el blanco de las lecturas triplicadas y se calcularon las medias.
- 15 [0440] Los resultados se muestran en la Figura 50. Tanto PcuAmy1-v3B como PcuAmy1-v3L mostraron un excelente rendimiento de limpieza.
- 20 [0441] El detergente comercial Universal Gel Gold de Persil (Henkel, Düsseldorf, Alemania) se inactivó por calor a 90 °C durante 4 horas para eliminar las actividades de enzimas existentes. Tras la inactivación, se midió la actividad de enzimas en los detergentes inactivados por calor utilizando el ensayo Suc-AAPF-pNA basado en el sustrato y el ensayo Ceralpha (Megazyme, Wicklow, Irlanda) para asegurar que cualquier actividad de proteasa y de amilasa, respectivamente, había sido suprimida. Se realizó a continuación una solución de 10 % de detergente en agua.
- 25 [0442] Se añadieron 100 µl de cada material de partida de enzima (a 0,5 mg/ml) a 400 µl de las soluciones de 10 % de detergente. Las enzimas analizadas fueron PURASTAR®, STAINZYME®, PcuAmy1-v3B y PcuAmy-v3L. Se añadieron 50 µl de solución madre de enzimas en los tubos para PCR y se incubaron a 60, 70, 80, o 90 °C durante 15 minutos. Con anterioridad a la incubación, se extrajeron 10 µL y se incubaron a temperatura ambiente a lo largo de la duración del experimento para funcionar como muestras «no estresadas». Tras la incubación, se realizó una dilución 1:10 adicional de cada muestra en tampón de dilución. Las muestras se transfirieron entonces a microplacas por triplicado, y se midió la actividad de α-amilasa en todas las muestras no sometidas a estrés y sometidas a estrés empleando el ensayo Ceralpha. Se calculó la actividad residual dividiendo la actividad de cada amilasa tras el estrés térmico por la actividad de la amilasa no sometida a estrés.
- 30 [0443] Los resultados se muestran en las Figuras 51 y 52. PcuAmy1-v3B y PcuAmy-v3L mostraron una estabilidad térmica similar en comparación con STAINZYME®, y una estabilidad significativamente mejor que PURASTAR®.
- 35 [0444] Aunque las composiciones y métodos anteriores se han descrito con algo de detalle a modo ilustrativo y con ejemplos para mejorar la claridad y la comprensión, los expertos en la materia podrán observar que se pueden realizar ciertos cambios y modificaciones. Por consiguiente, la descripción no debería interpretarse como limitativa en cuanto al alcance de la invención, que se encuentra delimitado por las reivindicaciones adjuntas.
- 40

REIVINDICACIONES

1. Variante recombinante de una α -amilasa original que comprende:

i) una mutación en un residuo de aminoácido E187 utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y al menos una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en N126, Y150, F153, L171, T180, y 1203 utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración; donde la variante de α -amilasa presenta al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a SEQ ID N.º 1; o

ii) una mutación en un residuo de aminoácido E186 utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y al menos una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en N125, Y149, F152, L170, D179, y L202 utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; donde la variante de α -amilasa presenta al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a SEQ ID N.º 3; o

iii) una mutación en un residuo de aminoácido E189 utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y al menos una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en N128, Y152, F155, L173, T182, y L205 utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración; donde la variante de α -amilasa presenta al menos un 70 % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a SEQ ID N.º 5;

donde la variante presenta un aumento de la estabilidad térmica, estabilidad detergente, actividad de licuefacción de almidón, y/o rendimiento de limpieza en comparación con la α -amilasa original o una α -amilasa de referencia que difiera de la variante de α -amilasa únicamente por la ausencia de las mutaciones.

2. Variante de α -amilasa de la reivindicación 1(i), que comprende:

(a) al menos dos mutaciones en los residuos de aminoácido N126, Y150, F153, L171, y 1203, utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y/o

(b) una delección de al menos un residuo de aminoácido seleccionado de entre R178, G179, T180, y G181, utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y/o

(c) delecciones de los residuos de aminoácido R178 y G179, o T180 y G181 utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y/o

(d) una mutación en el residuo de aminoácido G476 y/o G477 utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y/o

(e) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en E132, Q167, T180, y A277, utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y/o

(f) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R458, T459, y D460, utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y/o

(g) una mutación en el residuo de aminoácido T180, utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y/o

(h) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en 6, 7, 8, 11, 14, 15, 20, 21, 23, 26, 27, 28, 37, 38, 39, 40, 42, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 58, 61, 62, 68, 70, 71, 72, 73, 79, 80, 81, 82, 84, 85, 87, 88, 89, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 101, 108, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 120, 122, 123, 124, 126, 127, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 136, 137, 138, 140, 142, 143, 144, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 158, 159, 165, 167, 168, 170, 171, 172, 175, 176, 177, 180, 181, 182, 187, 190, 191, 193, 199, 200, 201, 203, 206, 208, 210, 211, 212, 214, 215, 216, 219, 221, 223, 225, 226, 227, 235, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 252, 253, 254, 256, 257, 258, 260, 261, 262, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 273, 276, 277, 279, 280, 282, 284, 285, 286, 288, 296, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 307, 308, 310, 311, 312, 313, 316, 317, 318, 320, 321, 325, 327, 335, 338, 342, 348, 349, 352, 356, 357, 360, 362, 363, 368, 369, 377, 381, 382, 383, 384, 385, 388, 390, 392, 394, 395, 396, 397, 398, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 407, 408, 410, 414, 415, 416, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 426, 428, 429, 430, 431, 434, 435, 436, 439, 441, 442, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 454, 455, 457, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 469, 470, 471, 473, 474, 475, 476, 477, 479, 480, 481, 482, 483, y 484, utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y/o

(i) una combinación de mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en:

E187P + I203Y + G476K,
 E187P + I203Y + G476K + R458N + T459S + D460T,
 T180D + E187P + I203Y + G476K,
 N126Y + T180D + E187P + I203Y + G476K,
 N126Y + T180D + E187P + I203Y + Y303D + N475E + G477Q,
 N126Y + E187P + G476K,
 N126Y + F153W + E187P + G476K,
 N126Y + F153W + E187P + G4726 + G477R,
 N126Y + E187P + I203Y,
 N126Y + T180H + E187P + I203Y,
 N126Y + F153W + T180H + E187P + I203Y,
 N126Y + Y150H + F153W + L171N + E187P + I203Y, y
 N126Y + Y150H + F153W + L171N + T180H + E187P + I203Y,

donde la variante presenta un aumento de la estabilidad térmica, estabilidad detergente, estabilidad de actividad de licuefacción de almidón, y/o rendimiento de limpieza en comparación con la original y donde se utiliza SEQ ID N.º 1 para la numeración.

- 5 **3. Variante de α -amilasa de la reivindicación 1(ii), que comprende:**
- (a) al menos dos mutaciones en los residuos de aminoácido N125, Y149, F152, L170, y L202, utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o
- (b) una delección de al menos un residuo de aminoácido seleccionado de entre R177, G178, D179, y G180, empleando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o
- 10 (c) delecciones de los residuos de aminoácido R177 y G178, o D179 y G180 utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o
- (d) una mutación en el residuo de aminoácido G472 y/o G473, utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o
- (e) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T131, Q166, D179, y T276, utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o
- 15 (f) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R454, S455, y G456, utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o
- (g) una mutación en el residuo de aminoácido D179, utilizando SEQ ID N.º 1 para la numeración; y/o
- (h) una mutación en el residuo de aminoácido N205, utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o
- 20 (i) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T333G, A335S, y Q337E, utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o
- (j) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en 5, 6, 7, 10, 13, 14, 19, 20, 22, 25, 26, 27, 36, 37, 38, 39, 41, 44, 45, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 57, 60, 61, 67, 69, 70, 71, 72, 78, 79, 80, 81, 83, 84, 86, 87, 88, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 100, 107, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 119, 121, 122, 123, 125, 126, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 135, 136, 137, 139, 141, 142, 143, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 157, 158, 164, 166, 167, 169, 170, 171, 174, 175, 176, 179, 180, 181, 186, 189, 190, 192, 198, 199, 200, 202, 205, 207, 209, 210, 211, 213, 214, 215, 218, 220, 222, 224, 225, 226, 234, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 251, 252, 253, 255, 256, 257, 259, 260, 261, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 272, 275, 276, 278, 279, 281, 283, 284, 285, 287, 295, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 306, 307, 309, 310, 311, 312, 315, 316, 317, 319, 320, 324, 326, 334, 337, 341, 347, 348, 351, 355, 356, 359, 361, 362, 367, 368, 373, 377, 378, 379, 380, 381, 384, 386, 388, 390, 391, 392, 393, 394, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 403, 404, 406, 410, 411, 412, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 422, 424, 425, 426, 427, 430, 431, 432, 435, 437, 438, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 450, 451, 453, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 465, 466, 467, 469, 470, 471, 472, 473, 475, 476, 477, 478, 479, y 480, utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración; y/o
- 35 (k) una combinación de mutaciones seleccionadas de entre el grupo que consiste en:
- N125Y + E186P + T333G + A335S + Q337E + G472K
 N125Y + F152W + E186P + T333G + A335S + Q337E + G472K
- 40 N125Y + F152W + E186P + N205D + T333G + A335S + Q337E + G472K, utilizando SEQ ID N.º 3 para la numeración.

4. Variante de α -amilasa de la reivindicación 1(iii), que comprende:

- (a) al menos dos mutaciones en los residuos de aminoácido N128, Y152, F155, L173, y L205, utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y/o
- 45 (b) una delección de al menos un residuo de aminoácido seleccionado de entre R180, S181, T182, y G183, utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y/o
- (c) delecciones de los residuos de aminoácido R180 y S181, o T182 y G183 utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y/o
- 50 (d) una mutación en el residuo de aminoácido G475 y/o G476, utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y/o
- (e) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en T134, E169, T182, y T279, utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y/o
- (f) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R457, S458, y D459, utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y/o
- 55 (g) una mutación en el residuo de aminoácido T182, utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y/o
- (h) una mutación en un residuo de aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en 8, 9, 10, 13, 16, 17, 22, 23, 25, 28, 29, 30, 39, 40, 41, 42, 44, 47, 48, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 60, 63, 64, 70, 72, 73, 74, 75, 81, 82, 83, 84, 86, 87, 89, 90, 91, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 103, 110, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 122, 124, 125, 126, 128, 129, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 138, 139, 140, 142, 144, 145, 146, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 160, 161, 167, 169, 170, 172, 173, 174, 177, 178, 179, 182, 183, 184, 189, 192, 193, 195, 201, 202, 203, 205, 208, 210, 212, 213, 214, 216, 217, 218, 221, 223, 225, 227, 228, 229, 237, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 254, 255, 256, 258, 259, 260, 262, 263, 264,
- 60

- 268, 269, 270, 271, 272, 273, 275, 278, 279, 281, 282, 284, 286, 287, 288, 290, 298, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 309, 310, 312, 313, 314, 315, 318, 319, 320, 322, 323, 327, 329, 337, 340, 344, 350, 351, 354, 358, 359, 362, 364, 365, 370, 371, 376, 380, 381, 382, 383, 384, 387, 389, 391, 393, 394, 395, 396, 397, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 406, 407, 409, 413, 414, 415, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 425, 427, 428, 429, 430, 433, 434, 435, 438, 440, 441, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 453, 454, 456, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 468, 469, 470, 472, 473, 474, 475, 476, 478, 479, 480, 481, 482, y 483, utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración; y/o
- (i) una combinación de mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en:
- 10 N128Y + E189P + G475R
F155W + E189P + G475R
T134E + T182H + E189P + G475R
N128Y + T134E + T182H + E189P + G475R
- 15 N128Y + F155W + E189P + G475R
T134E + F155W + T182H + E189P + G475R
N128Y + T134E + F155W + T182H + E189P + G475R
N128Y + T134H + F155W + T182D + E189P + G475R
N128Y + T134E + F155W + T182G + E189P + G457R, utilizando SEQ ID N.º 5 para la numeración.
5. Variante de amilasa de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la α -amilasa original no es de una especie de *Bacillus*; opcionalmente donde la α -amilasa original es de una especie de *Cytophaga* o de una especie de *Paenibacillus*.
6. Variante de amilasa de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la α -amilasa original o la variante de α -amilasa presenta al menos 70 %, 80 % o 90 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N.º 1, SEQ ID N.º 3, o SEQ ID N.º 5.
7. Variante de amilasa de la reivindicación 1(i), que es una variante recombinante de una α -amilasa original de SEQ ID N.º 1, presentando dicha variante mutaciones que consisten en una combinación de mutaciones E187P + I203Y + G476K + R458N + T459S + D460T y una delección de los residuos de aminoácido R178 y G179.
8. Composición que comprende la variante de α -amilasa de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
9. Composición de la reivindicación 8, donde:
- 30 (a) la composición resulta efectiva para eliminar manchas de almidón en ropa sucia, platos, o tejidos; y/o
(b) la composición comprende además un tensioactivo.
10. Composición de la reivindicación 8 o de la reivindicación 9, donde la composición:
- (a) es una composición de detergente, o
(b) es un detergente para ropa o un aditivo de detergente para ropa, o
35 (c) es un detergente de lavavajillas a mano o automático, o
(d) comprende además una o más enzimas adicionales seleccionadas del grupo que consiste en proteasa, hemicelulasa, celulasa, peroxidasa, enzima lipolítica, enzima metalolipolítica, xilanasas, lipasa, fosfolipasa, esterasa, perhidrolasa, cutinasa, pectinasa, pectato liasa, mananasa, queratinasa, reductasa, oxidasa, fenoloxidasas, lipoxigenasa, ligninasa, pululanasa, tanasa, pentosanasa, malanasa, β -glucanasa,
40 arabinosidasa, hialuronidasa, condroitinasa, lacasa, metaloproteinasa, amadoriasa, glucoamilasa, arabinofuranosidasa, fitasa, isomerasa, transferasa, y una amilasa distinta de la amilasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
11. Composición de la reivindicación 8, donde la composición es para:
- (a) licuar almidón, o
45 (b) sacarificar una composición que comprende almidón, para la SSF posterior a la licuefacción, o para la SSF directa sin licuefacción previa, o
(c) producir una bebida fermentada, o
(d) producir un producto alimentario de panadería, o
(e) desencolar tejidos.
- 50 12. Método para eliminar una mancha de almidón o suciedad de una superficie, que comprende:
poner en contacto la superficie en presencia de una composición que comprenda una cantidad efectiva de la variante de amilasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, y
permitir que el polipéptido hidrolice componentes de almidón presentes en la mancha de almidón para
producir moléculas derivadas de almidón más pequeñas que se disuelvan en la composición acuosa,
55 eliminando así la mancha de almidón de la superficie.
13. Método de la reivindicación 12, donde:

- (a) la composición acuosa comprende además un tensioactivo; y/o
 (b) la superficie es una superficie textil o una superficie de la vajilla; y/o
 (c) la composición comprende además al menos una enzima adicional seleccionada del grupo que consiste en proteasa, hemicelulasa, celulasa, peroxidasa, enzima lipolítica, enzima metalolipolítica, xilanasas, lipasa, fosfolipasa, esterasa, perhidrolasa, cutinasa, pectinasa, pectato liasa, mananasa, queratinasa, reductasa, oxidasa, fenoloxidasa, lipoxigenasa, ligninasa, pululanasa, tanasa, pentosanasa, malanasa, β -glucanasa, arabinosidasa, hialuronidasa, condroitinasa, lacasa, metaloproteinasa, amadoriasa, glucoamilasa, arabinofuranosidasa, fitasa, isomerasa, transferasa, y una amilasa distinta de la amilasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 5
- 10 **14.** Método para sacarificar una composición que comprende almidón para producir una composición que comprende glucosa, donde el método comprende:
- (i) poner en contacto la solución que comprende almidón con una cantidad efectiva de la variante de amilasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-7; y
 (ii) sacarificar la solución que comprende almidón para producir la composición que comprende glucosa; donde la variante de amilasa cataliza la sacarificación de la solución de almidón a glucosa o a otros jarabes de carbohidratos enriquecidos.
- 15
- 15.** Método de la reivindicación 14, donde:
- (a) la composición que comprende almidón comprende almidón licuado, almidón gelatinizado, almidón granular, o almidón tratado térmicamente por debajo de su temperatura de gelatinización, y/o
 (b) la fermentación es una reacción de sacarificación y fermentación simultánea (SSF); y/o
 (c) el método comprende además poner en contacto una pulpa y/o un mosto con una amilasa; y/o
 (d) el método comprende además añadir glucoamilasa, hexoquinasa, xilanasas, glucosa isomerasa, xilosa isomerasa, fosfatasa, fitasa, pululanasa, β -amilasa, α -amilasa que sea la variante de α -amilasa, proteasa, celulasa, hemicelulasa, lipasa, cutinasa, isoamilasa, enzima redox, esterasa, transferasa, pectinasa, alfa-glucosidasa, betaglucosidasa, o una combinación de las mismas, en la solución de almidón; y/o
 (e) la amilasa es expresada y secretada por una célula huésped, donde opcionalmente:
- 20
- (i) la composición que comprende almidón está en contacto con la célula huésped; y/o
 (ii) la célula huésped expresa y secreta además una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en glucoamilasa, hexoquinasa, xilanasas, glucosa isomerasa, xilosa isomerasa, fosfatasa, fitasa, pululanasa, β -amilasa, α -amilasa que no sea la variante de α -amilasa, proteasa, celulasa, hemicelulasa, lipasa, cutinasa, isoamilasa, enzima redox, esterasa, transferasa, pectinasa, alfa-glucosidasa, y beta-glucosidasa; y/o
 (iii) la célula huésped expresa y secreta además una glucoamilasa; y/o
 (iv) la célula huésped es capaz de fermentar la composición.
- 25
- 16.** Uso de una amilasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 en la producción de una composición que comprende glucosa, en la producción de un almidón licuado, en la producción de una bebida fermentada, en la limpieza de manchas de almidón, o en desencolado textil.
- 17.** Método de desencolado de un tejido que comprende poner en contacto una composición de desencolado con un tejido encolado durante un tiempo suficiente para desencolar el tejido, donde la composición de desencolado comprende una variante de α -amilasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 30
- 18.** Polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 19.** Vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 18.
- 20.** Célula huésped que comprende el vector de expresión de la reivindicación 19.
- 35
- 40

Alineamiento múltiple de secuencias con CLUSTAL 2.0.10

```

CspAmy2      --AATNGTMMQYFEWYVPNDGQQWNRLRTDAPYLSVVGITAVWTPPAYKGTSDVGYGP
PcuAmy1      ---ADNGTIMQYFEWYLPNDGAHWNRLLNDAQNLLKNVGITAVWVIPPAYKGSADVGYGV
BASE         NTAPINETMMQYFEWDLPNLDTLWTKVKNAAANLSSLGITALWLPPAYKGTSDVGYGV
              . * * :***** :**** * . : . . : * * . :***** : ***** * . :*****

CspAmy2      YDLYDLGEEFNQKGTVRRTKYGTKGELKSAVNTLHNSGIQVYGDVVMNHKAGADYTVNTAV
PcuAmy1      YDLYDLGEEFNQKGTVRRTKYGTKSELISAVNNLHAKGIAVYGDVVLNHRMNADATELVDAV
BASE         YDLYDLGEEFNQKGTIRTKYGTQYIQAIQAQAAGMOMVYADVVFNHKAGADGTEFVDAV
              ** ***** :***** : . * : : : * : * . * : * : . * * * *

CspAmy2      EVNPSNRNQETSGEYNIQAWTGFNFPGRGTTYSNFKWQWFHFDGTDWDQSRSLSRIFKFR
PcuAmy1      EVDPNRRNVETTSTYQIQAWTQYDFPGRGNTYSSFKWRWYHFDGVDWDQSRGLNRIYKLR
BASE         EVDPSNRNQETSGTYQIQAWTKFDFPGRGNTYSSFKWRWYHFDGTDWDESRLNRIYKFR
              ** : * . * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *

CspAmy2      GTGKAWDWEVSSSENGNYDYLMIADIDYDHPDVVNEMKKWGVWYANEVGLDGYRLDAVKHI
PcuAmy1      GDGKDWDEVDSEYGNIDYLMGADLDFNHPDVVNETKTWKWVNTVNLGVRRLDAVKHI
BASE         STGKAWDWEVDTENGNIDYLMFADLDMDHPEVVTTELKNWGTWYVNTTNIDGFRRLDAVKHI
              . * * * * * . : * * * * * * * : * : * : * * * * * . * * * * *

CspAmy2      KFSFLKDWVDNARAATGKEMFTVGEYWQNDLALNNYLAKVNYNQSLFDAPLHNFYFAAS
PcuAmy1      KDFMRDWNVRSTTGKNLFAVGEYWHYDVNKLNSYITKTNGTMSLFDVPLHFRFYDAS
BASE         KYSFFPDWLTYYVRNQTGKNLFAVGEFWSYDVNKLHNYITKTNGSMSLFDAPLHNNFYFAS
              * : . * : * * : . * * * : * : * : * * * * * * * . * * * * *

CspAmy2      TGGGYDMRNILNNTLVASNPTKAVTLVENHDTQPGQSLSTVQPFWKPLAYAFILTRSG
PcuAmy1      NGGGYDMRNLLNNTLMSNPMKAVTFVENHDTQPTQALQSTVQSWFKPLAYATILTREQ
BASE         KSSGYFDMRYLLNNTLMKDQPSLAVTLVDNHDTQPGQSLQSWVEPWFKPLAYAFILTRQE
              . . . * : * * : * * * : . : * * * : * : * : * * * * * * * * *

CspAmy2      GYPSVFGDMYGTGKTTREIPALKSKIEPLLKARKDYAYGTQRDYIDNPVIGWTREGD
PcuAmy1      GYPCVFYGDYYGT---SDGKISSYKPIMDKLLNARKVYAYGTQRDYFDHPDIVGWTREGD
BASE         GYPCVFYGDYYGI---PKYNIPLKSKIDPLLIARRDYAYGTQRDYIDHQDIIGWTREGI
              * * . * * * * * * . : * . * . : : * * * : * * * * * * : * : * * * *

CspAmy2      STKAKSGLATVITDGPGGSKRMVVGTSNAGEIWDLTGNRTDKITIGSDGYATFPVNGGS
PcuAmy1      AAHAGSGLATLITDGPGGSKWYVVGTSKAGQVWTDKTCNRSQVTTIDANGWGNFVNGGS
BASE         DTKPNSGLAALITDGPGGSKWYVVGKKGKAGVYDVTGNRSDTVTINADGWGEFVNGGS
              : : . * * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

CspAmy2      VSVWVQQ- (SEQ ID N.º 1)
PcuAmy1      VSVWAK-- (SEQ ID N.º 3)
BASE         VSIWVAKK (SEQ ID N.º 5)
              ** : * .
    
```

FIG. 1

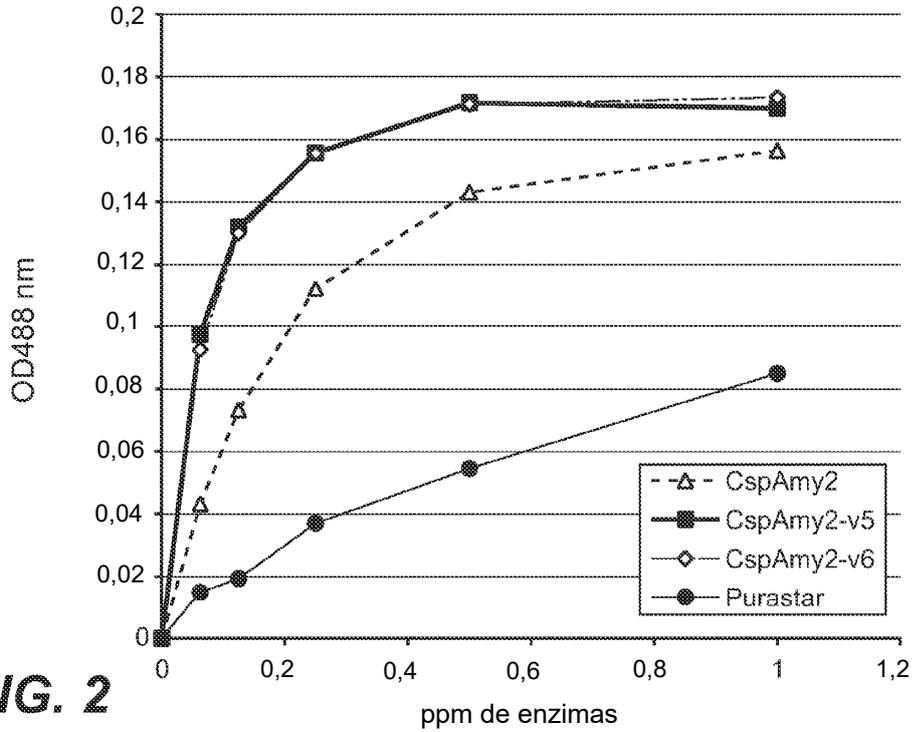


FIG. 2

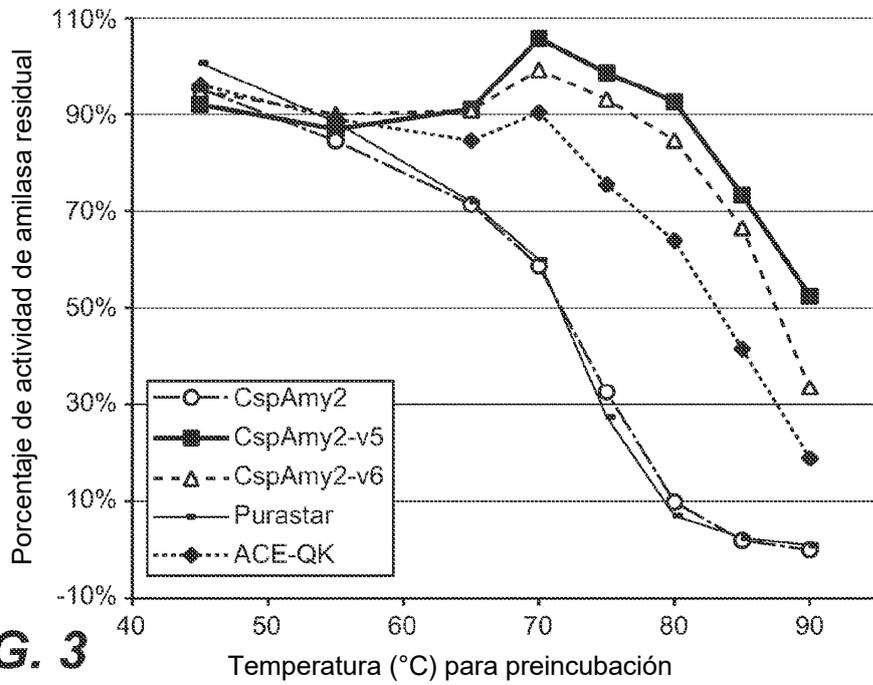


FIG. 3

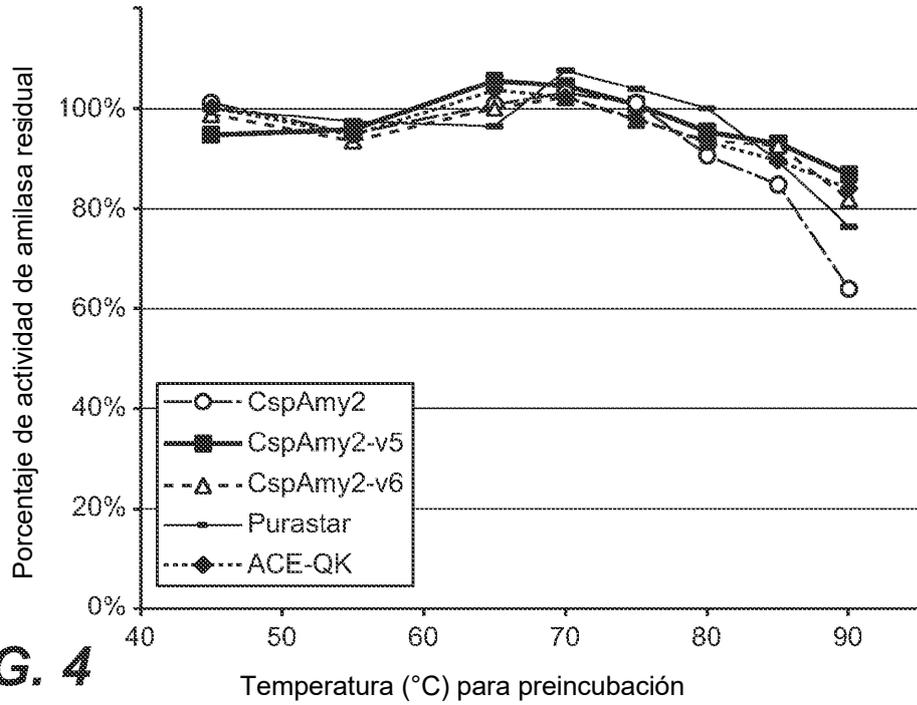


FIG. 4

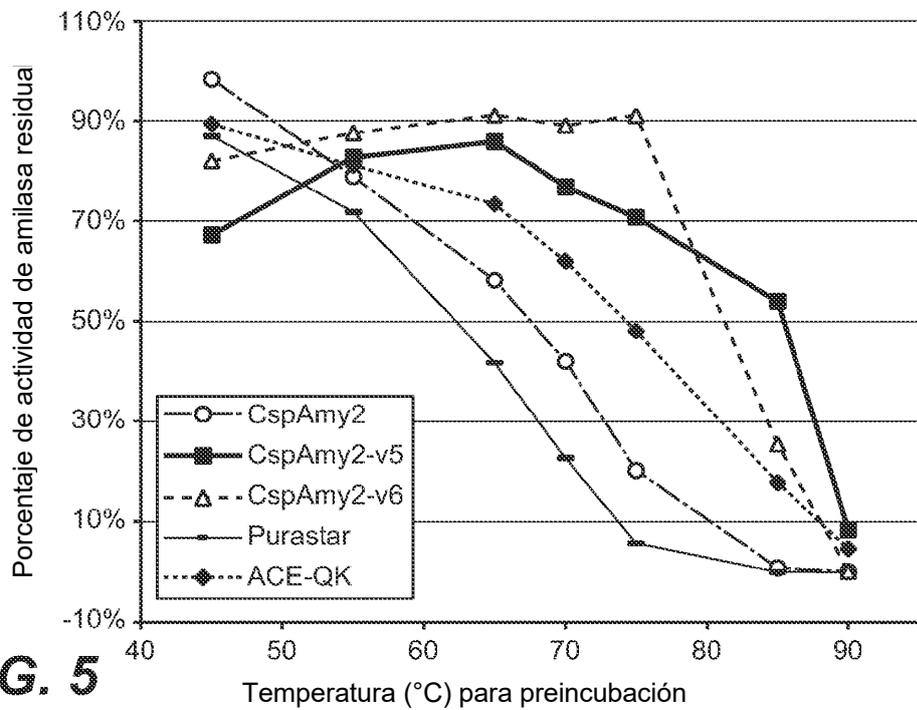


FIG. 5

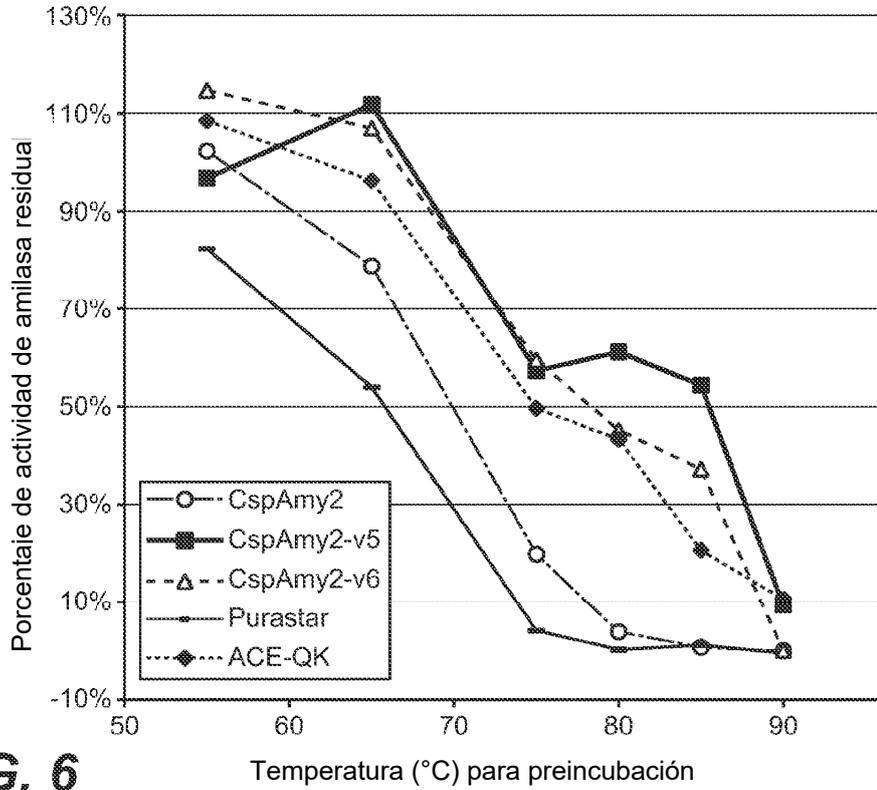


FIG. 6

Variante	pH 4,5 (65 °C)		pH 5,0 (70 °C)		pH 5,7 (85 °C)	
	Semi-vida (min)	PI	Semi-vida (min)	PI	Semi-vida (min)	PI
C16A	28,3	11,3	95,0	7,9	45,9	3,4
C16B	15,2	3,2	29,6	4,5	27,9	4,0
C16C	31,3	12,5	104,3	8,6	52,4	3,9
C16D	20,0	4,2	36,5	5,5	34,6	4,9
C16E	42,1	16,8	132,7	11,0	67,2	4,9
C16F	26,4	5,5	54,1	8,2	46,8	6,7
C16G	28,6	11,4	102,7	8,5	47,0	3,5
C16H	21,7	4,5	39,3	6,0	34,2	4,9
C16I	37,7	15,1	124,0	10,2	57,5	4,2
C16J	28,4	5,9	56,2	8,5	44,4	6,3
S241Q	4,8	1,0	6,6	1,0	7,0	1,0
E187P	2,5	1,0	12,1	1,0	13,6	1,0

FIG. 7

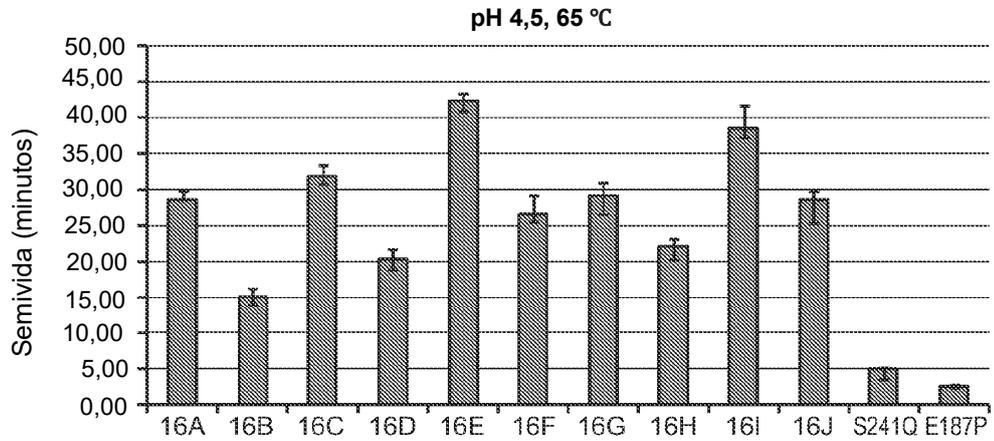


FIG. 8

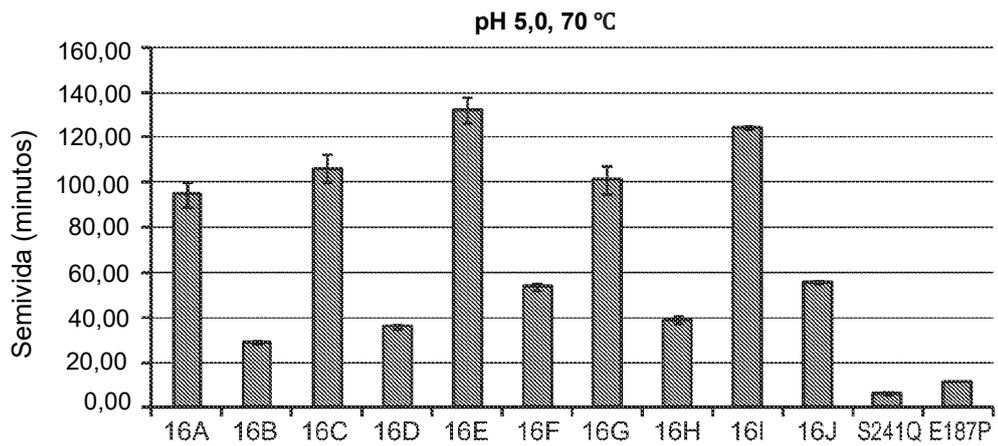


FIG. 9

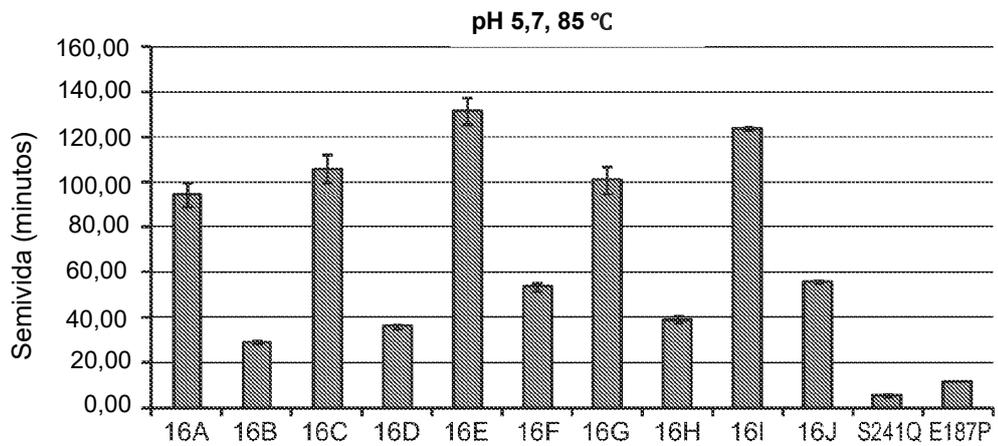


FIG. 10

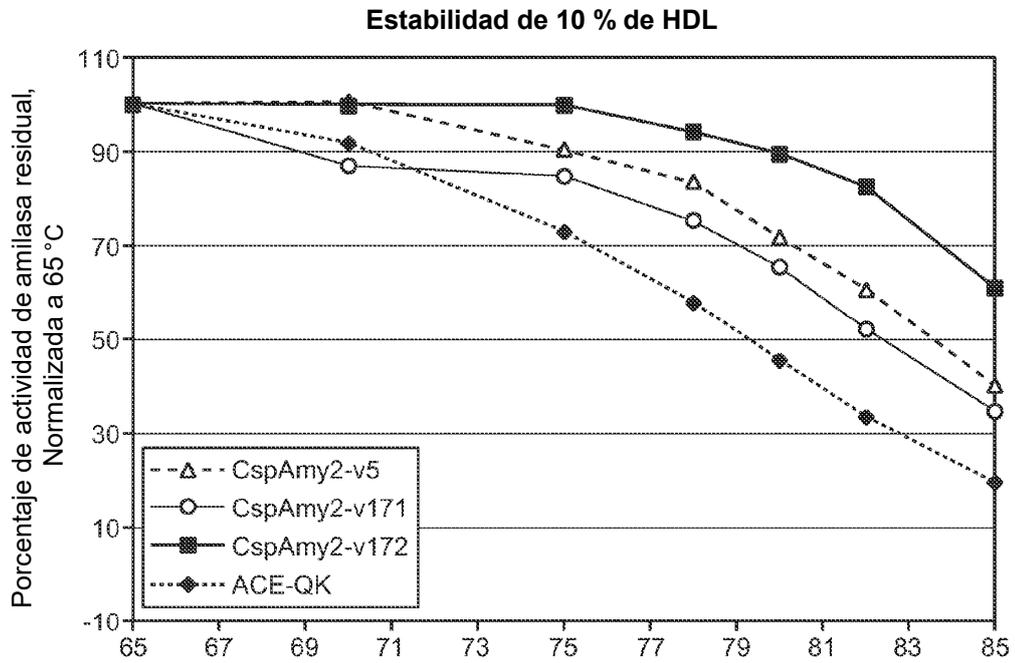


FIG. 11 Temperatura (°C) para incubación durante 15 minutos

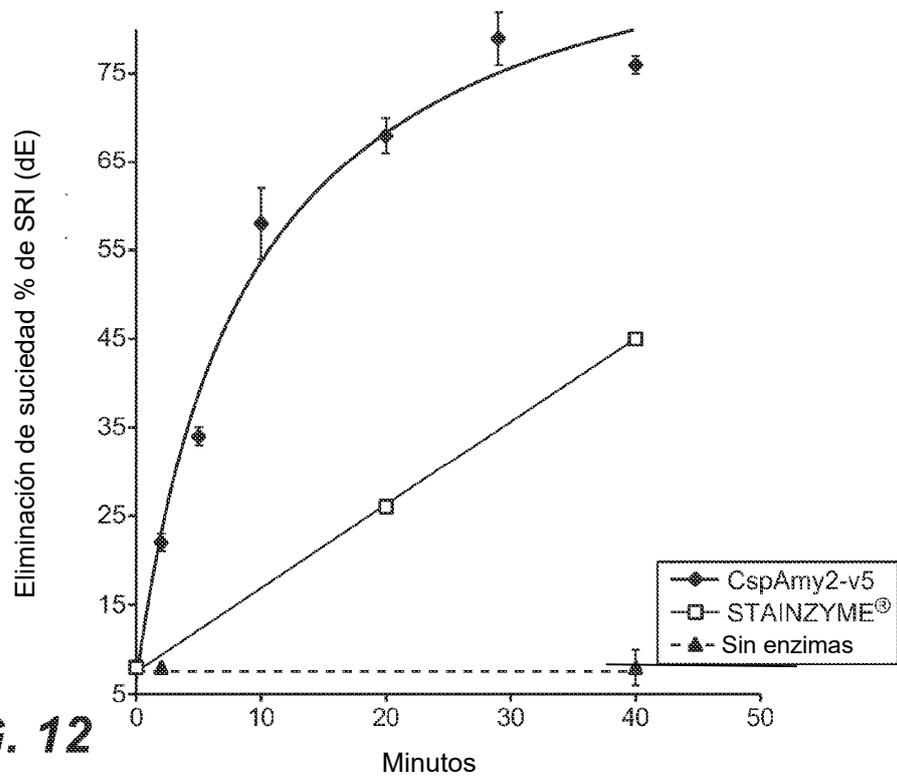


FIG. 12

Detergente sin fosfato IEC-60436 WFK Tipo B (pH = 10,4 en 3g/l)		
COMPONENTE	% EN PESO	PROPIEDADES
Dihidrato de citrato de sodio	30,0	Mejorador
Sal sódica de copolímero de ácido maleico/ácido acrílico (SOKALAN® CPF; BASF)	12,0	Mejorador
Monohidrato de perborato de sodio	5,0	Mejorador
TAED	2,0	Blanqueo (Fuente de oxígeno activo)
Disilicato de sodio: Prottil A (Cognis)	25,0	Blanqueo
Etoxilato de alcohol graso lineal	2,0	
Carbonato de sodio anhidro	Suma hasta 100,0	Agente tampón

FIG. 13A

Detergente con fosfato IEC-60436 WFK Tipo C (pH = 10,3 en 3g/l)		
COMPONENTE	% EN PESO	PROPIEDADES
Tripolifosfato de sodio	23	Mejorador
Dihidrato de citrato de sodio	22,3	Mejorador
Sal sódica de copolímero de ácido maleico/ácido acrílico	4	Mejorador
Monohidrato de perborato de sodio	6	Blanqueo (Fuente de oxígeno activo)
TAED	2	Blanqueo
Disilicato de sodio: Prottil A (Cognis)	5	Agente tampón

FIG. 13B

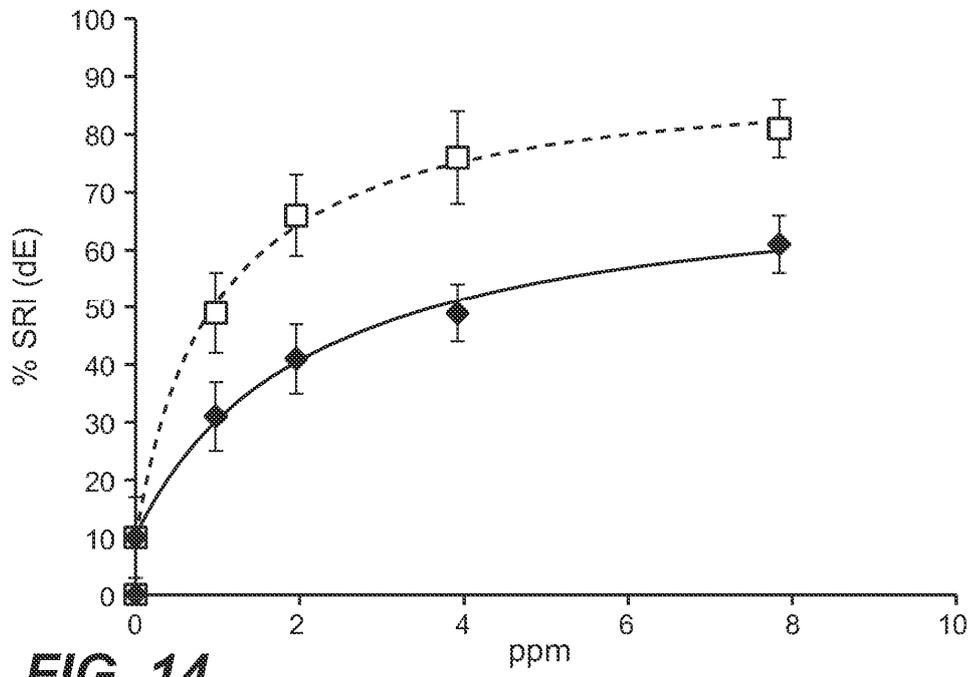


FIG. 14

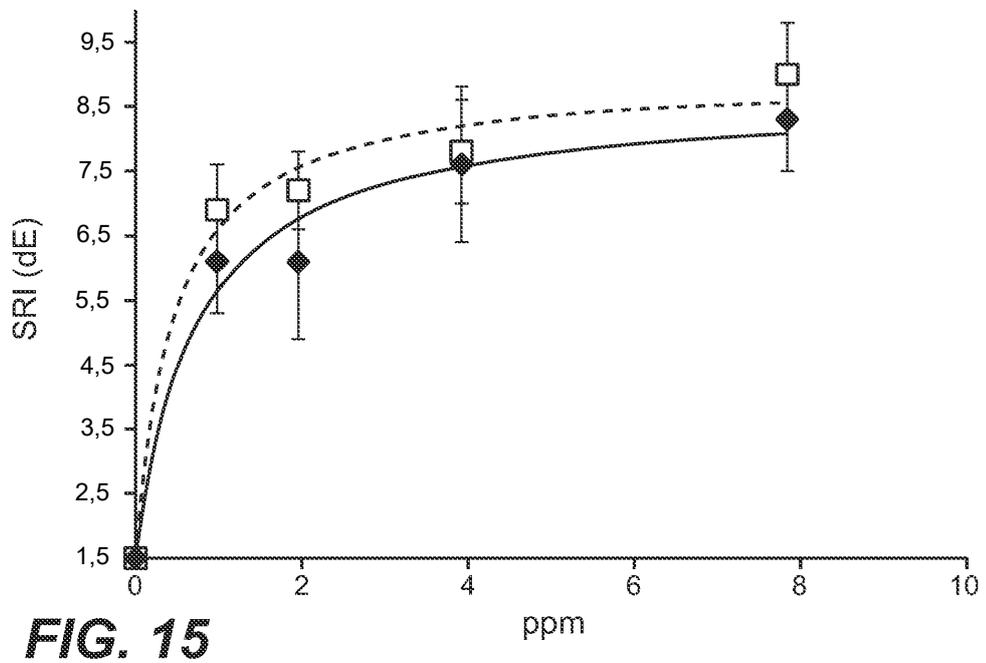
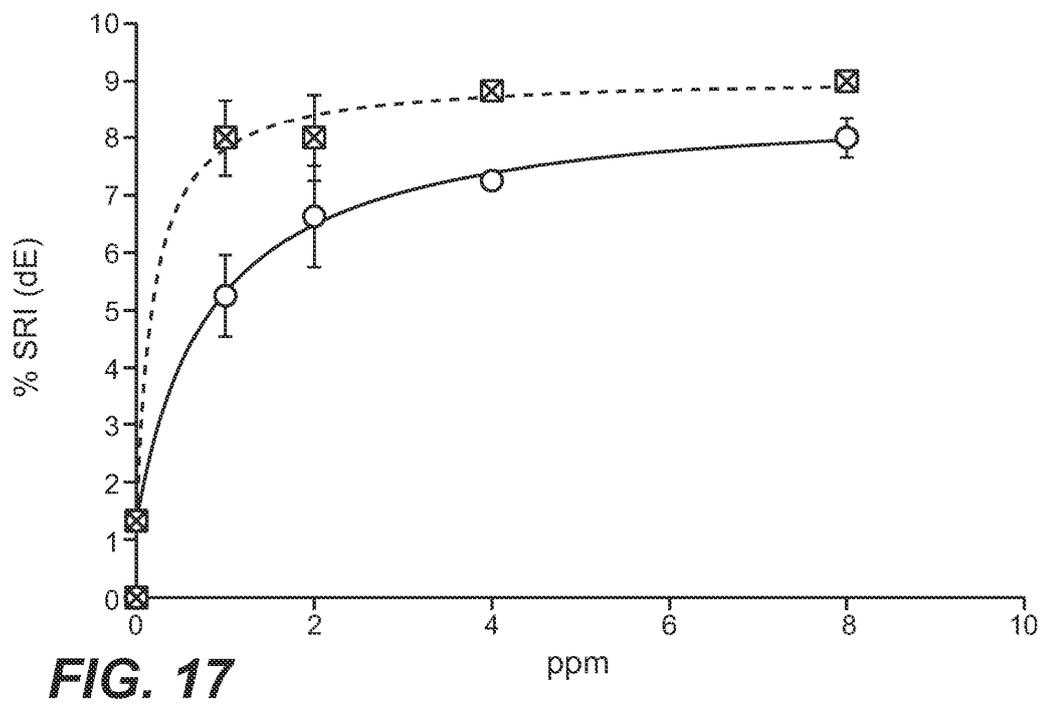
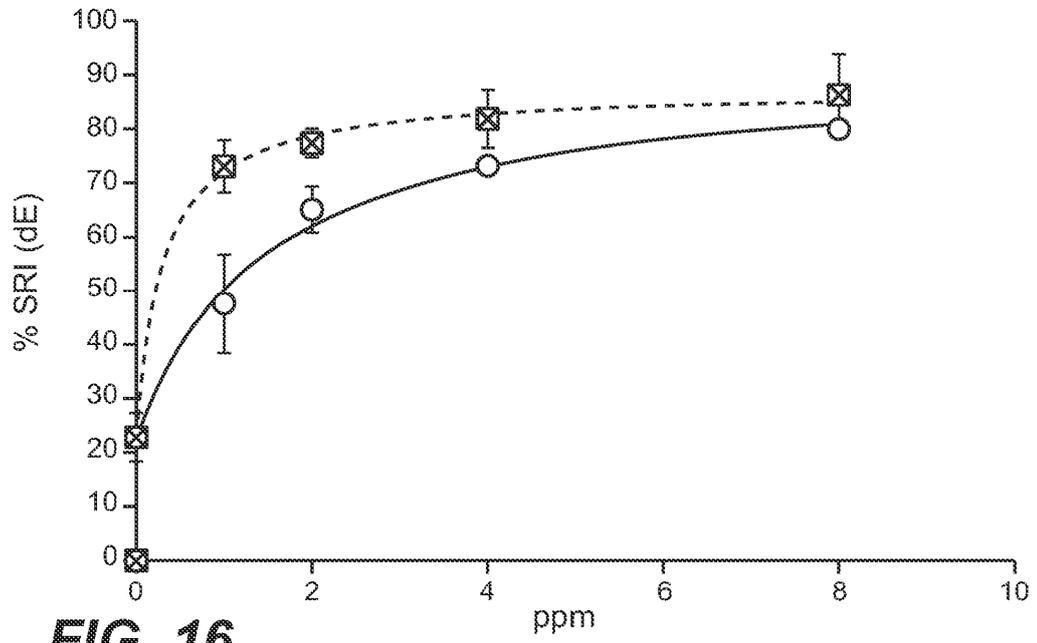


FIG. 15



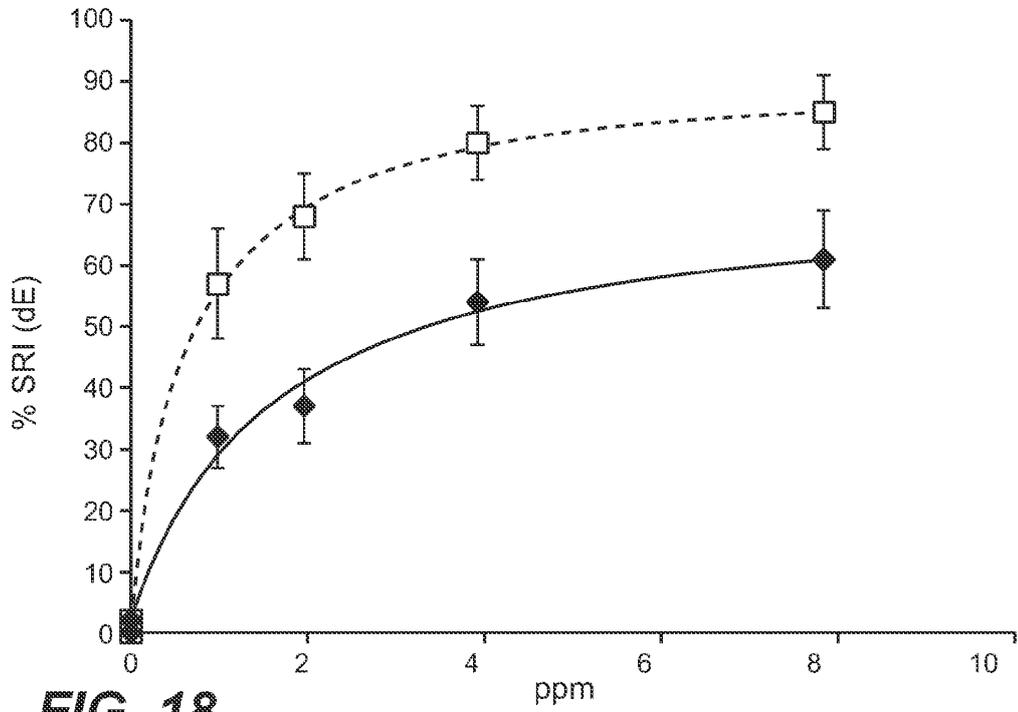


FIG. 18

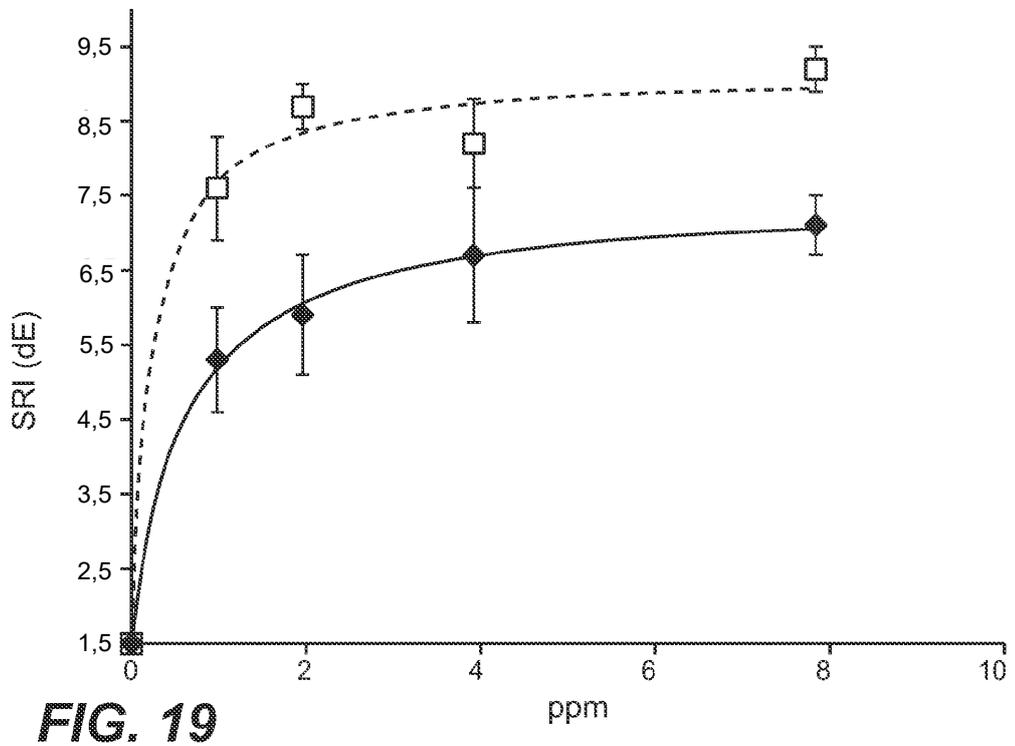
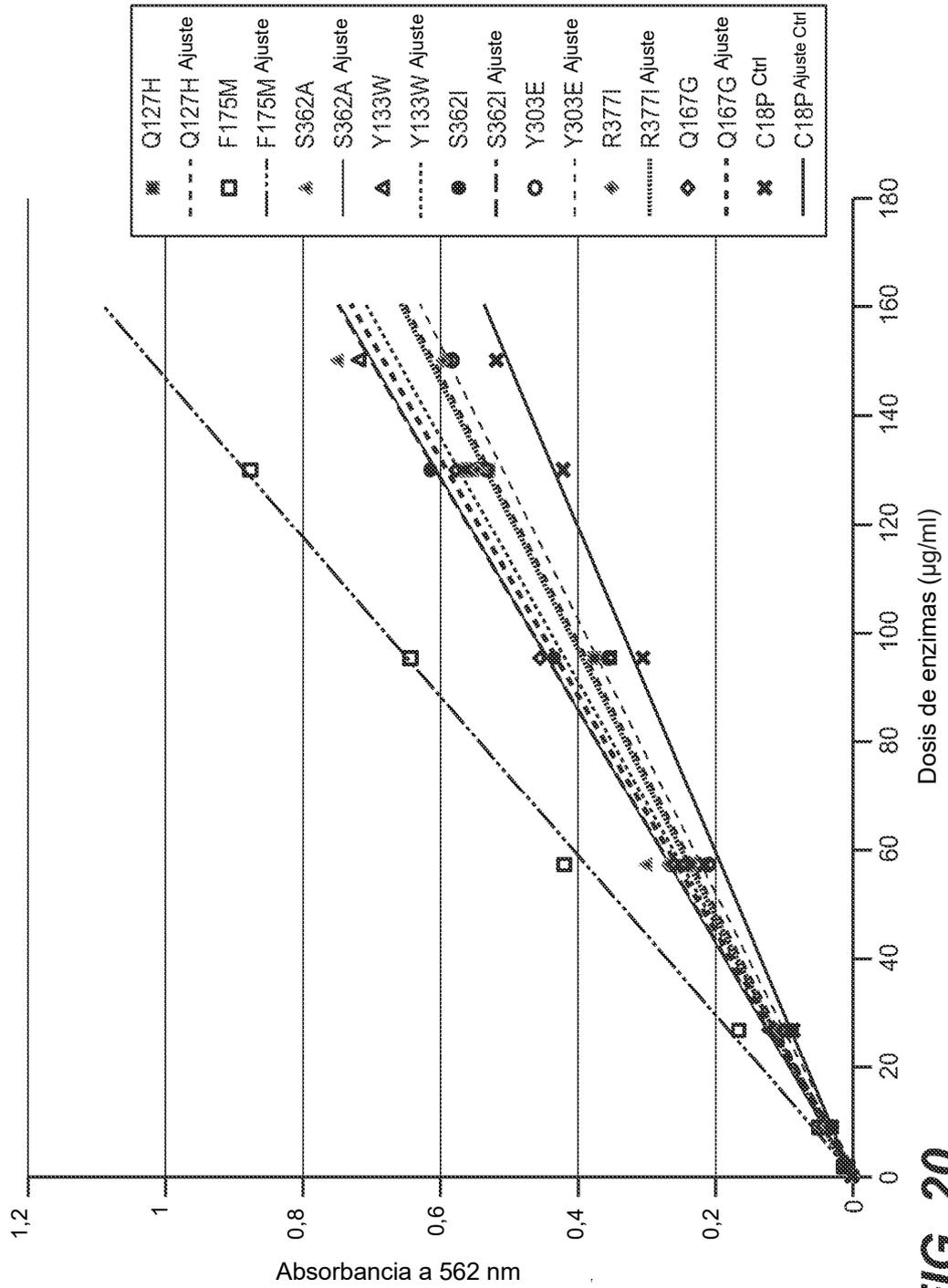
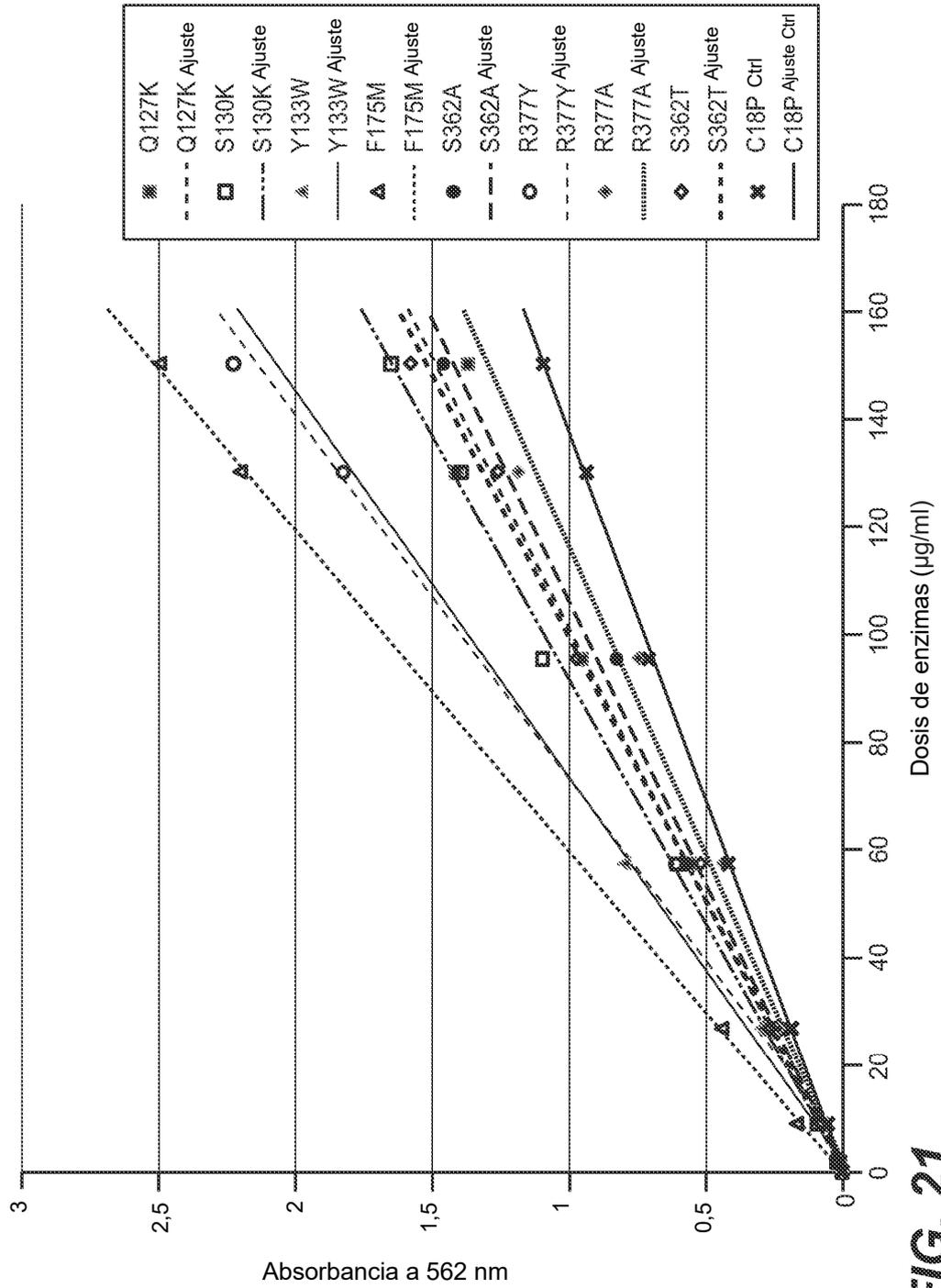
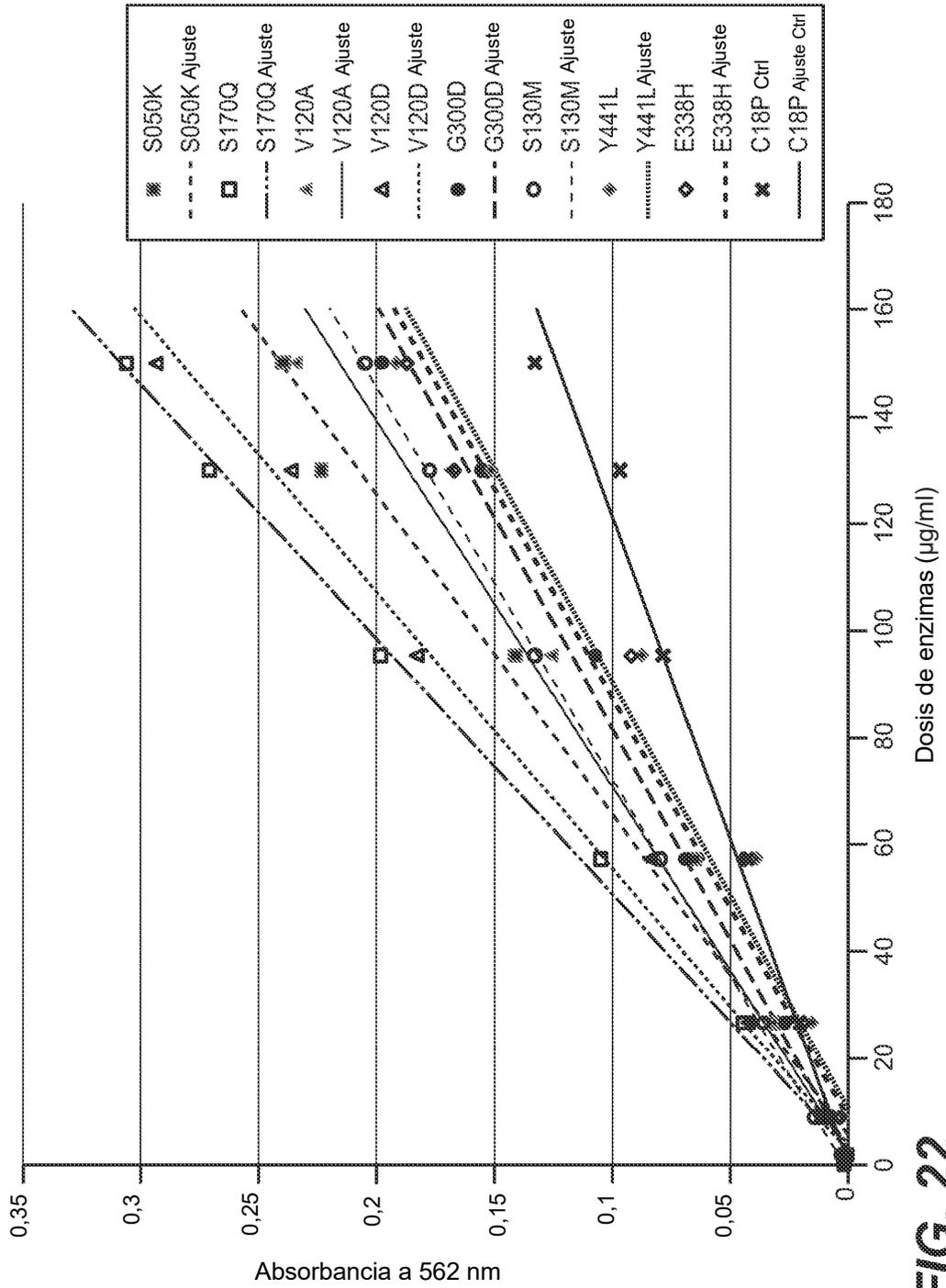
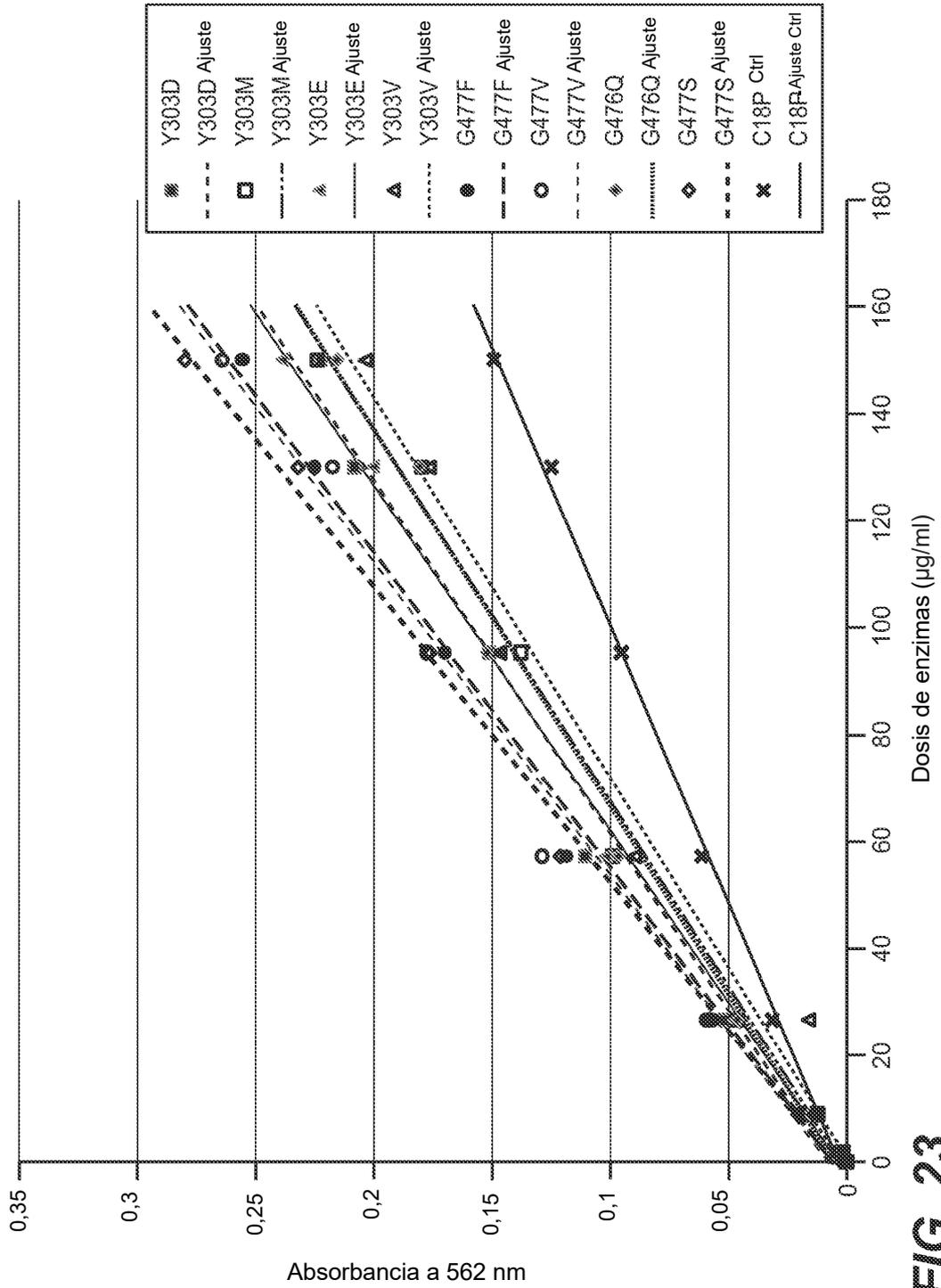


FIG. 19









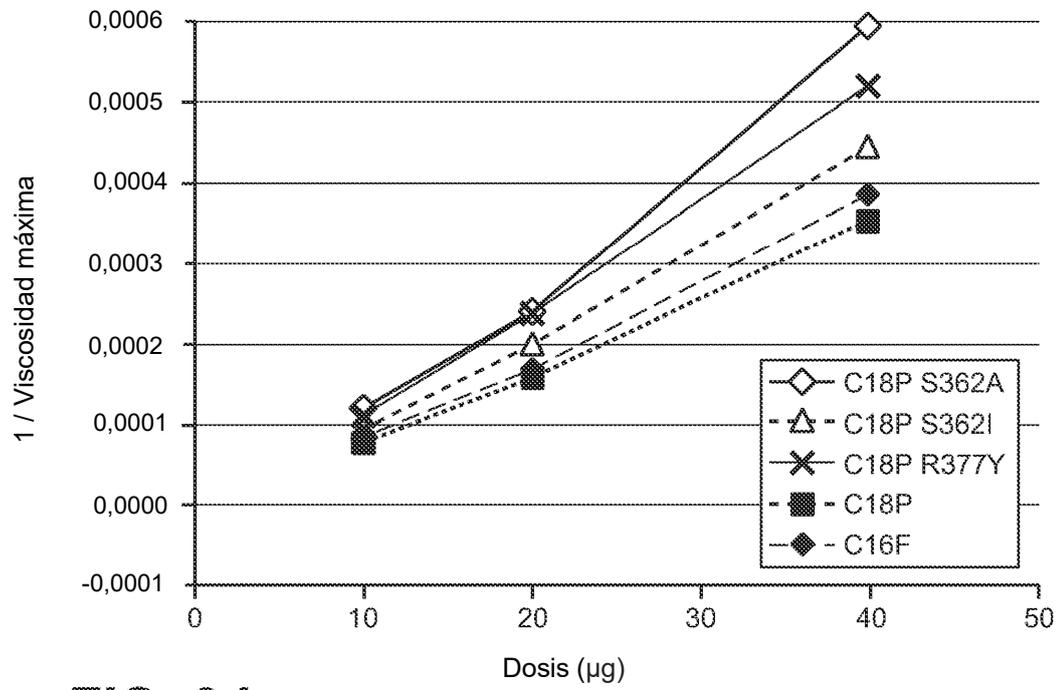


FIG. 24

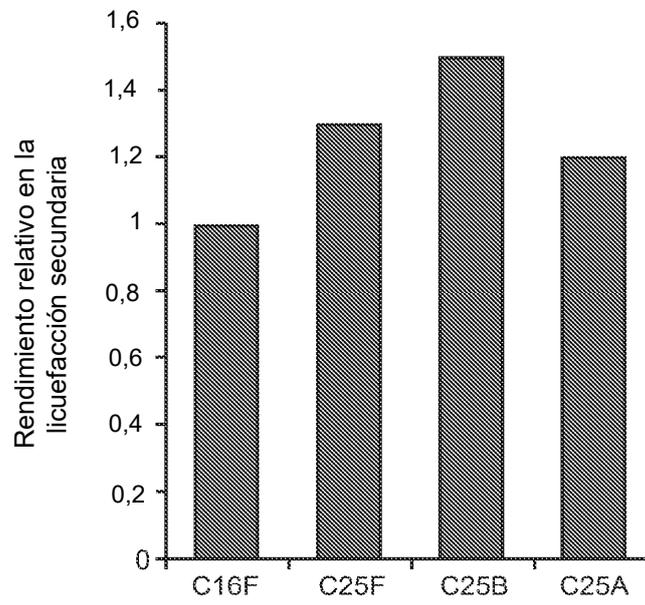


FIG. 27

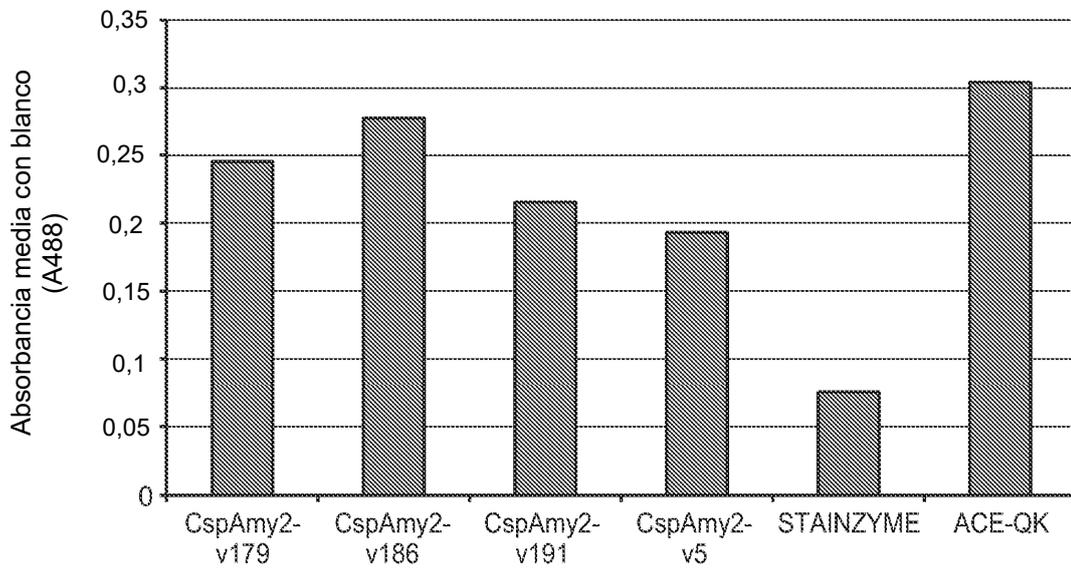


FIG. 28

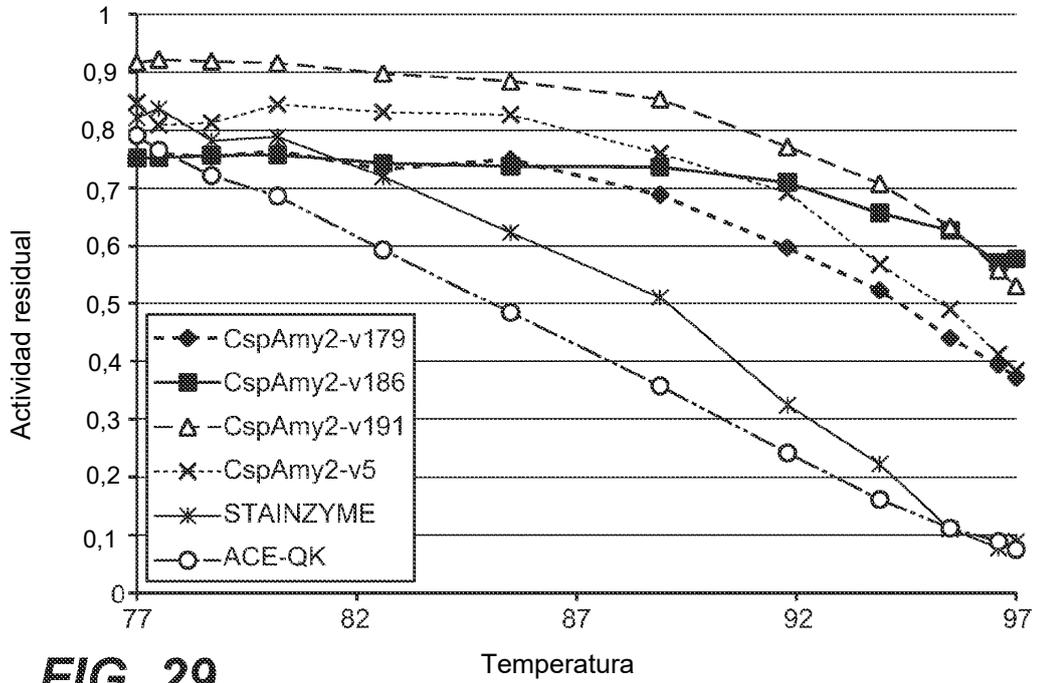


FIG. 29

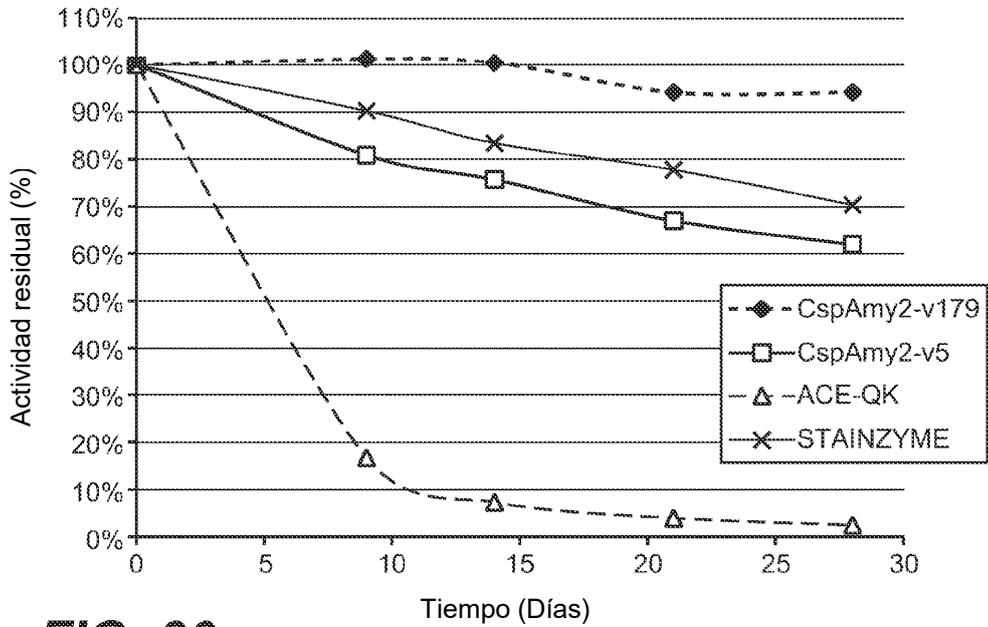


FIG. 30

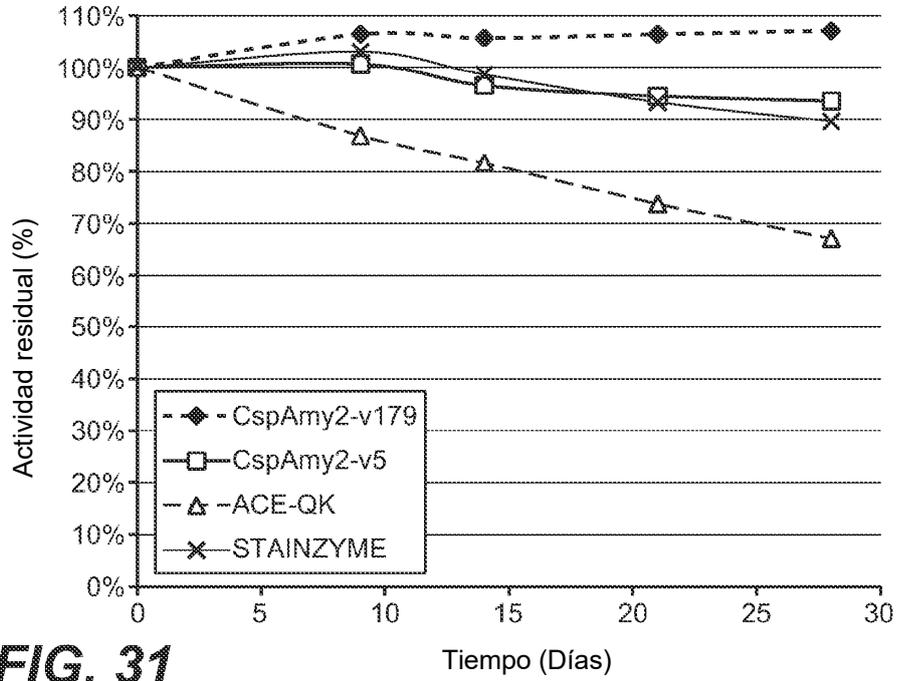


FIG. 31

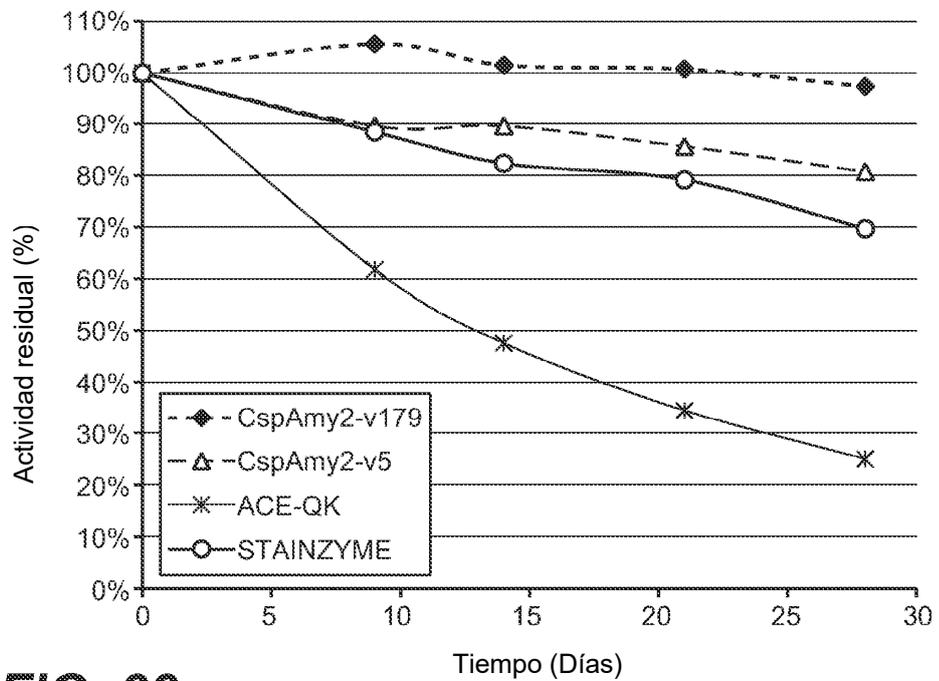
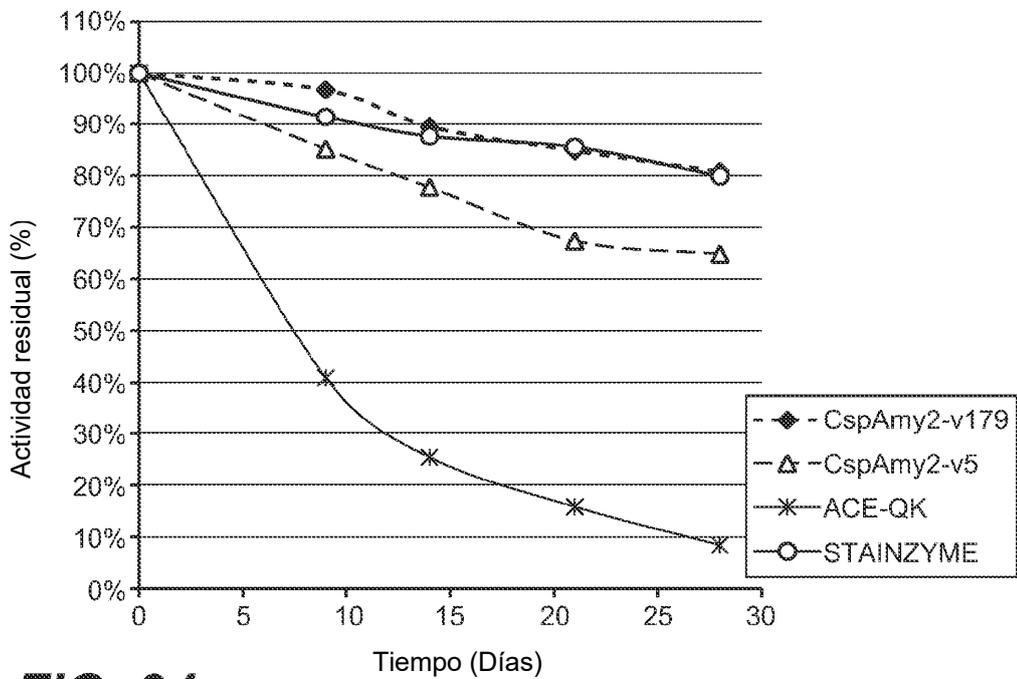
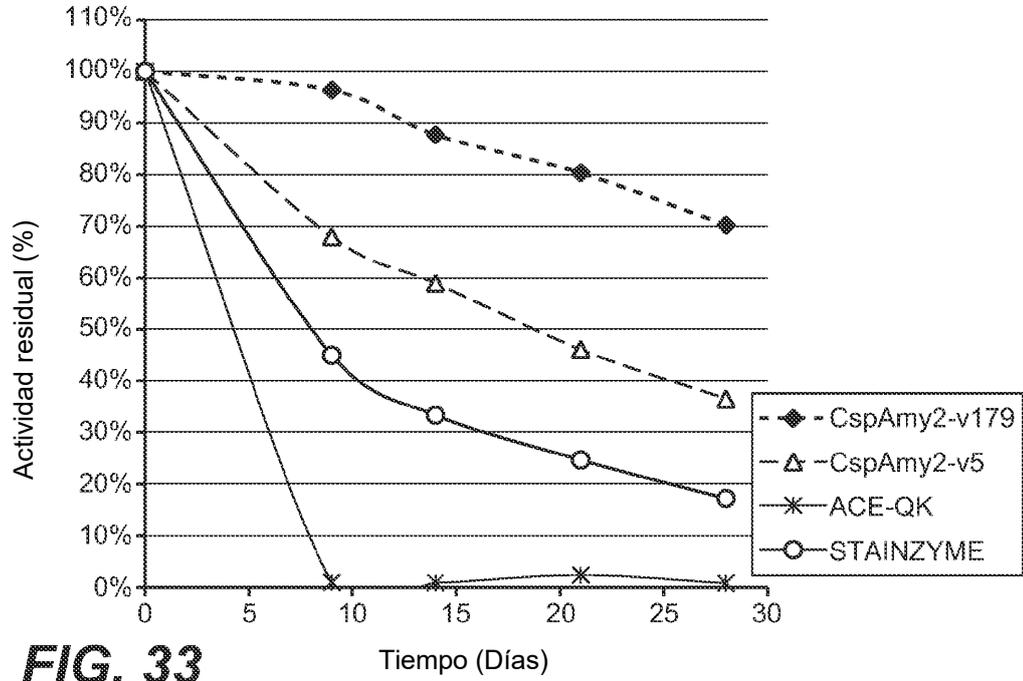


FIG. 32



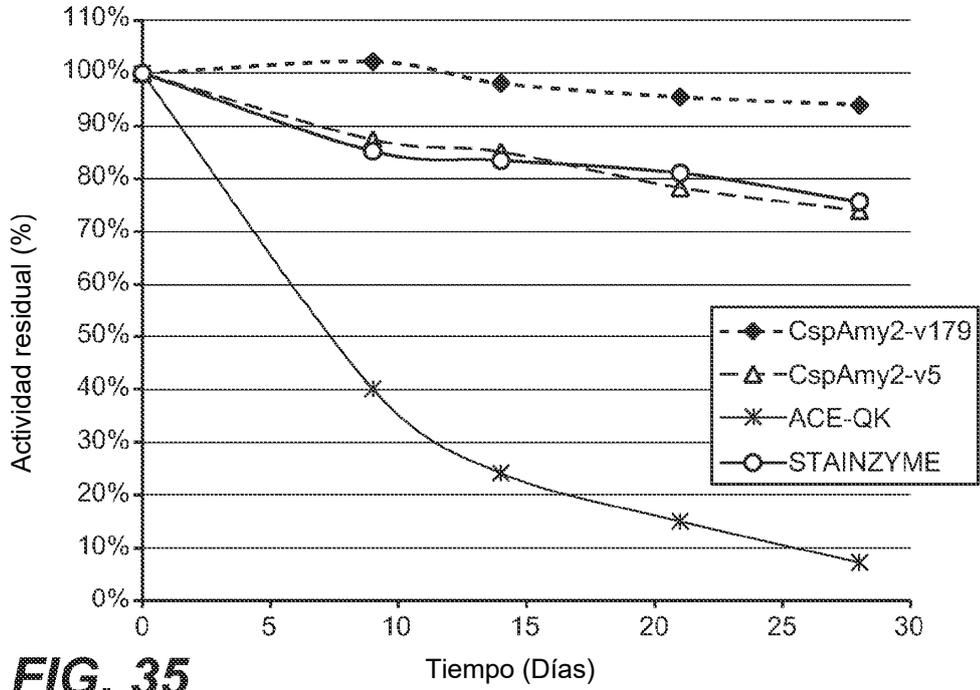


FIG. 35

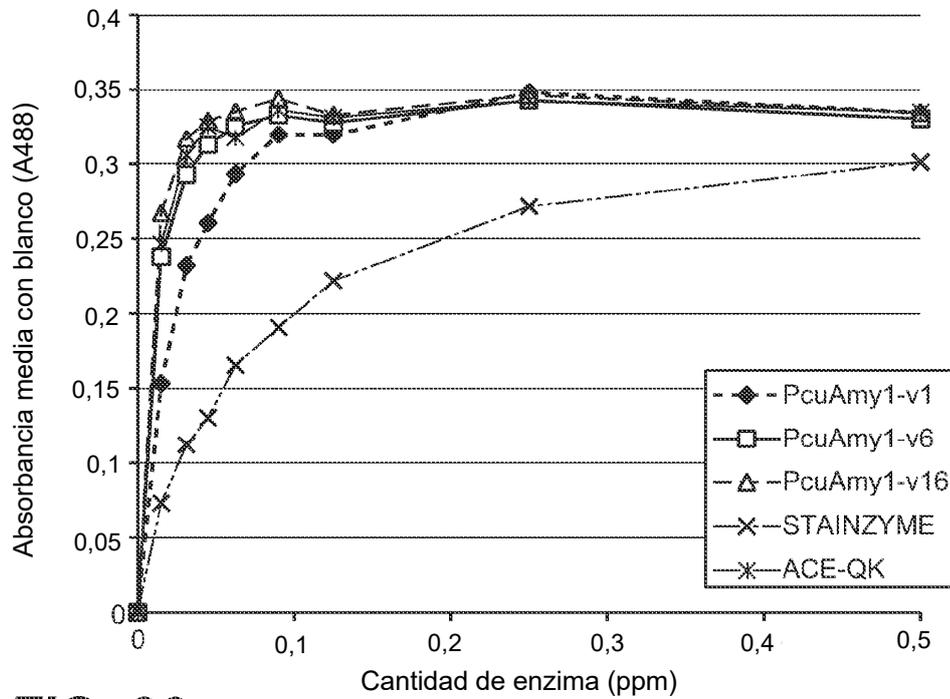
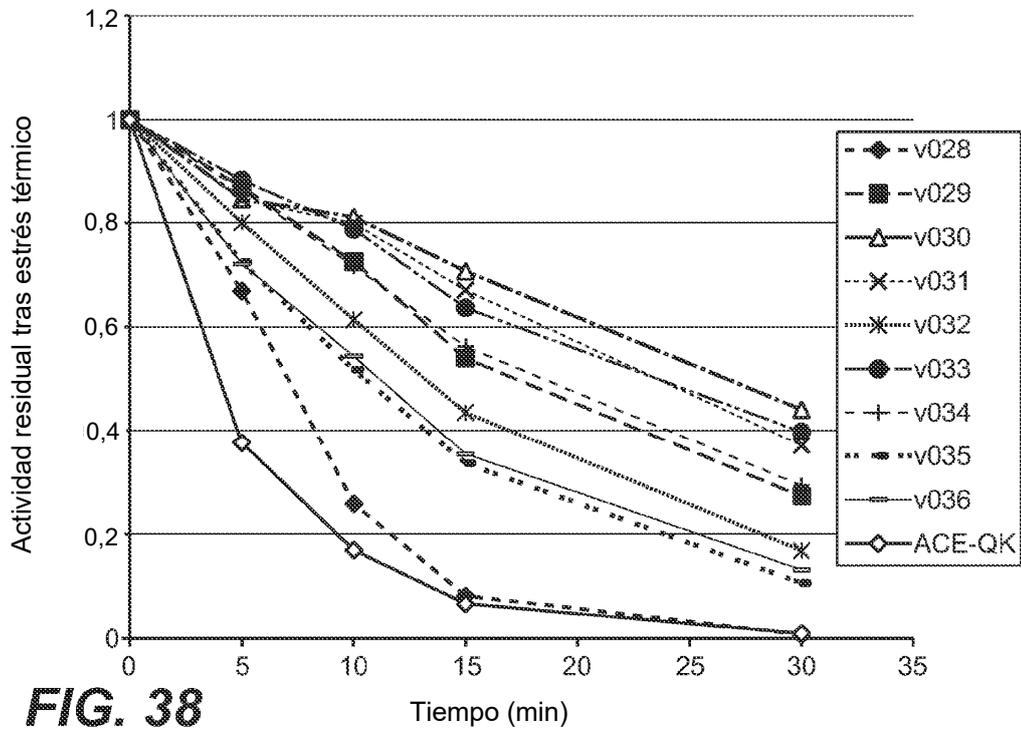
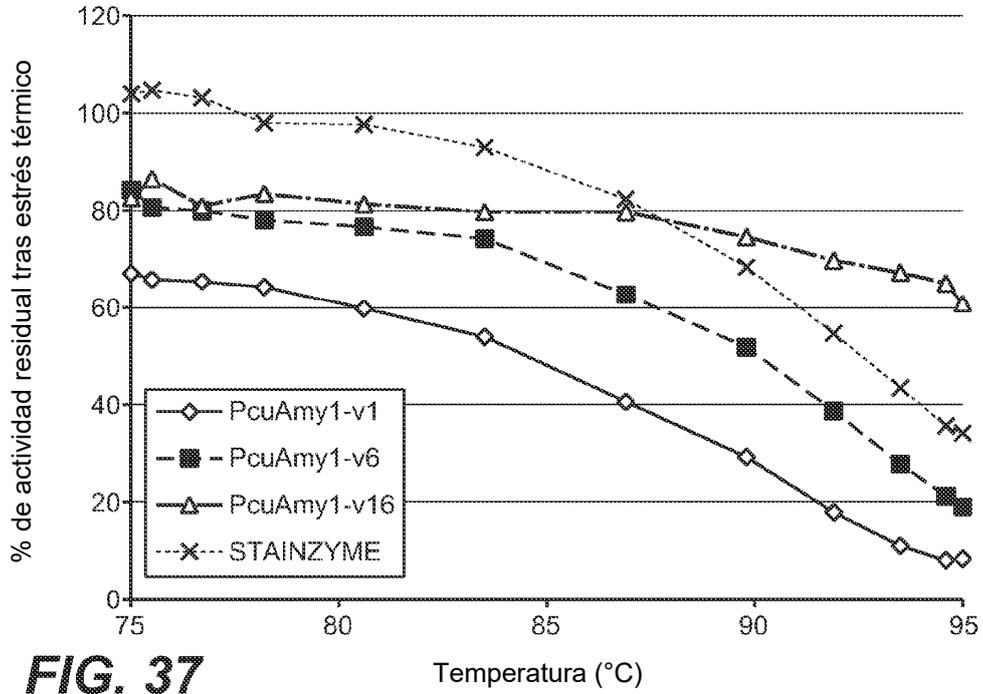


FIG. 36



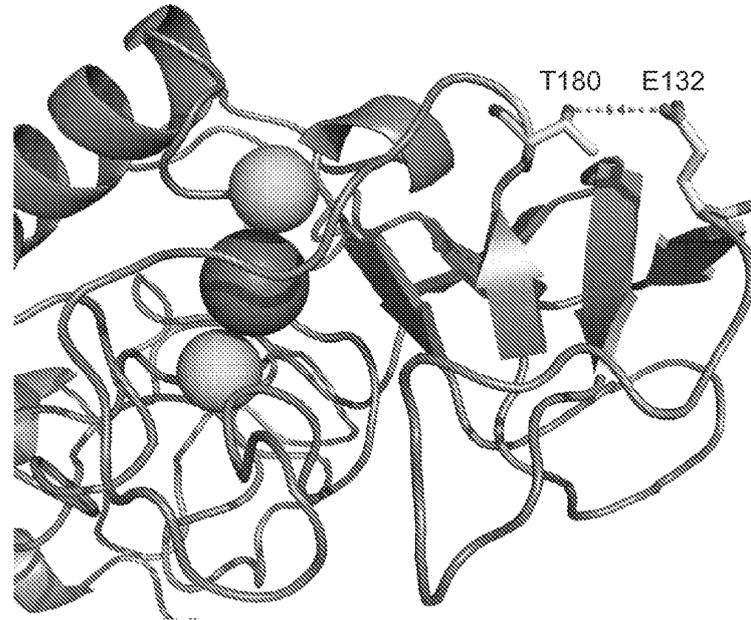


FIG. 39

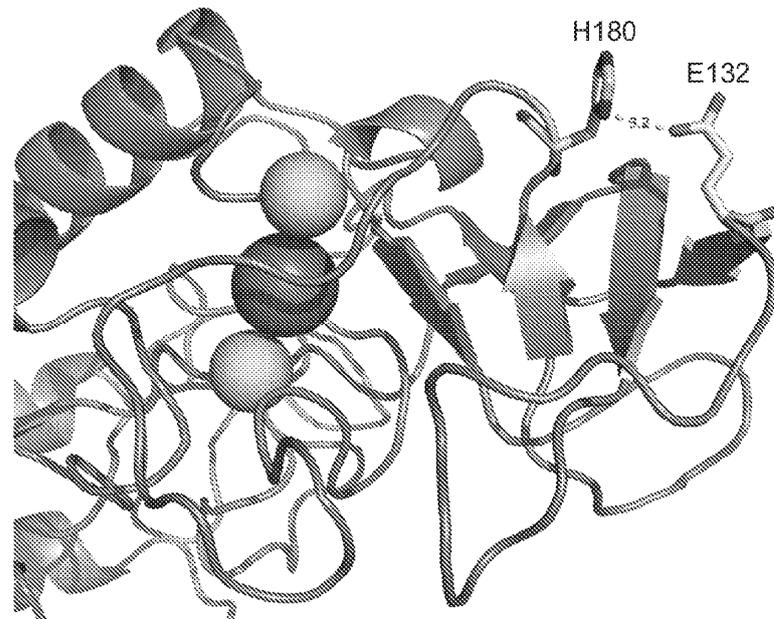


FIG. 40

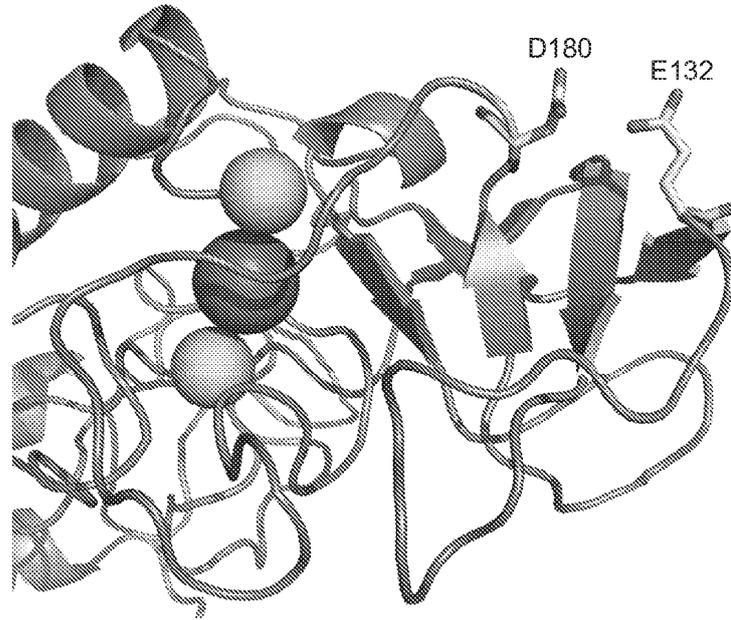


FIG. 41

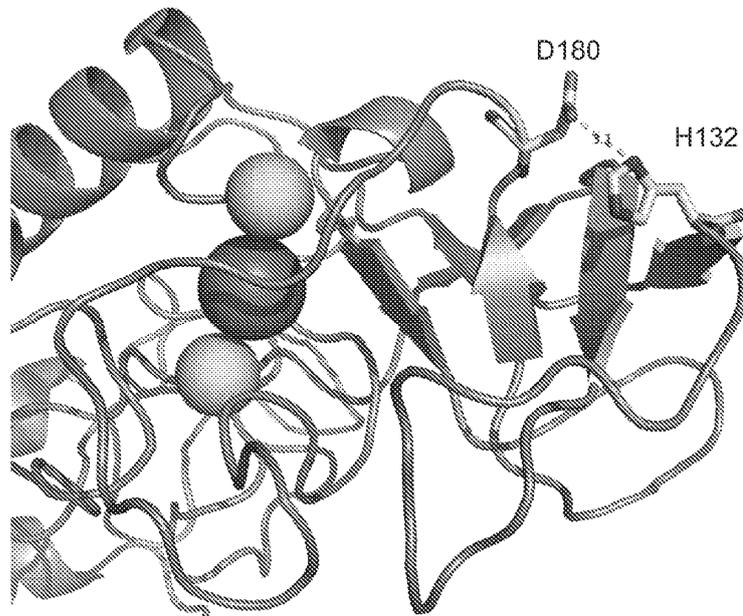


FIG. 42

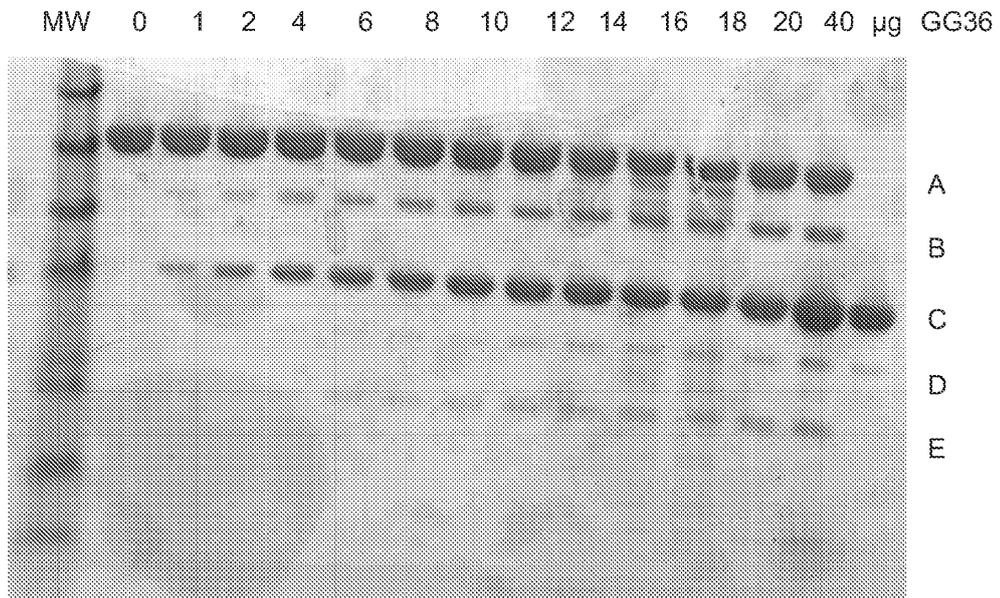


FIG. 43

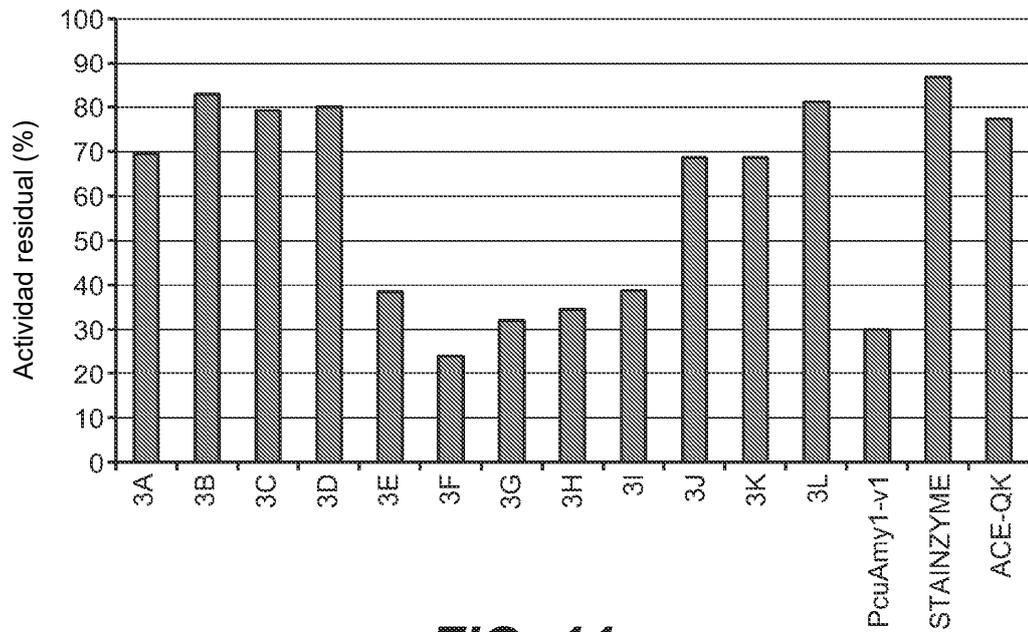


FIG. 44

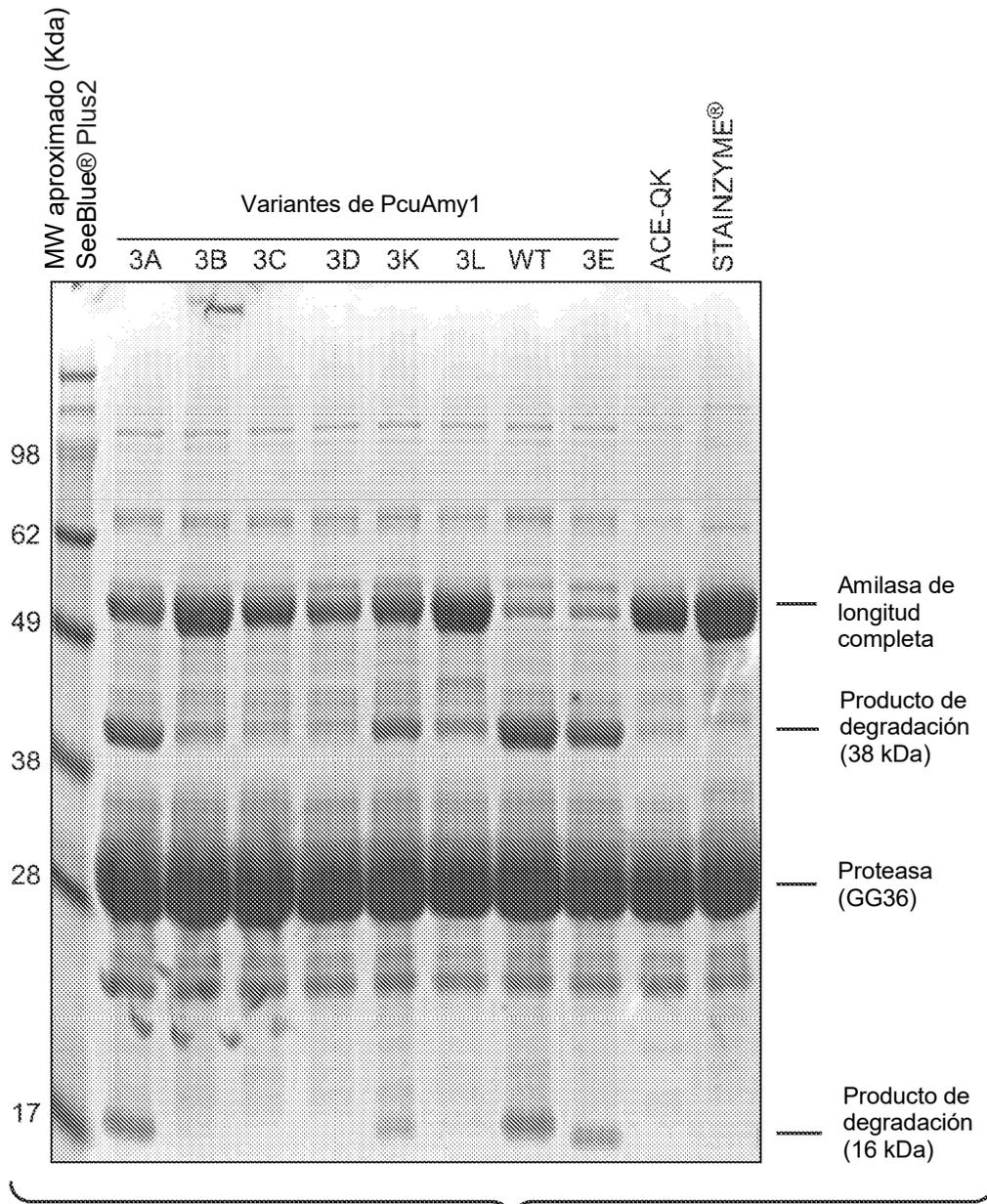


FIG. 45

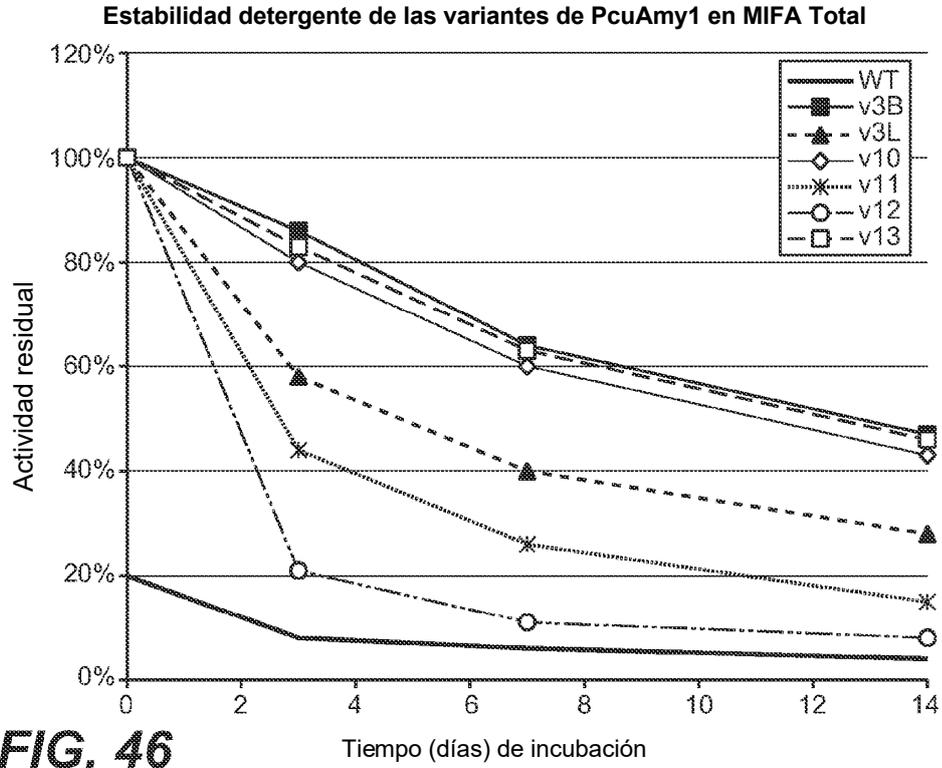


FIG. 46

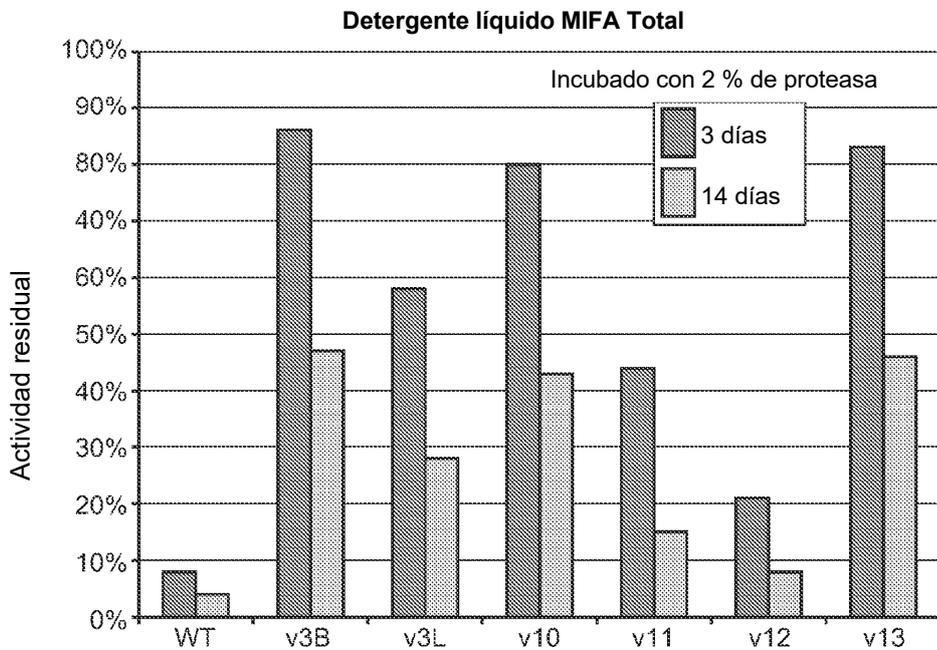
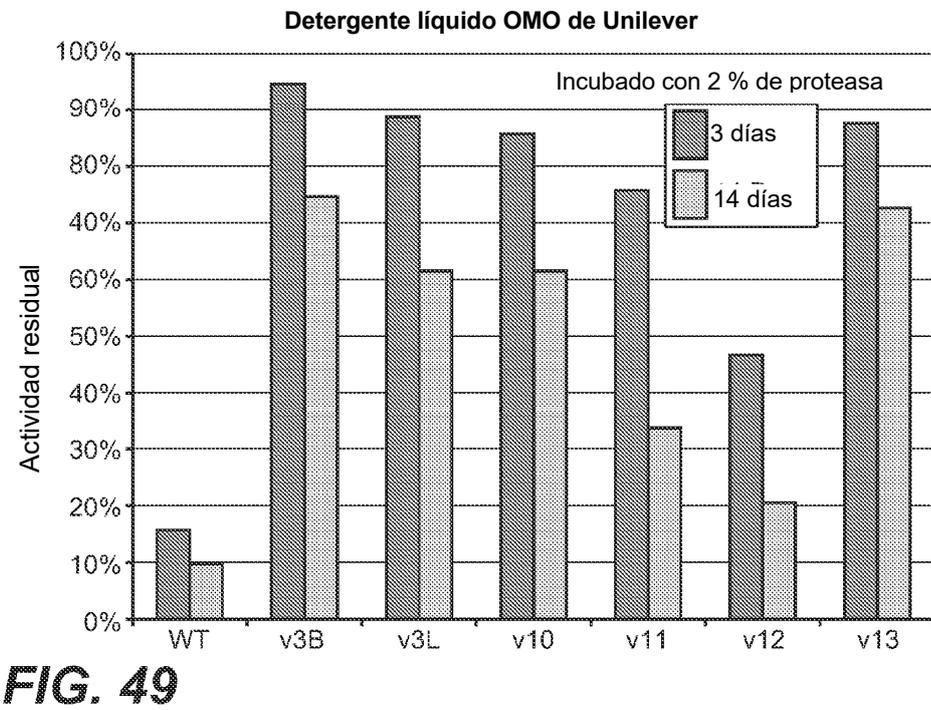
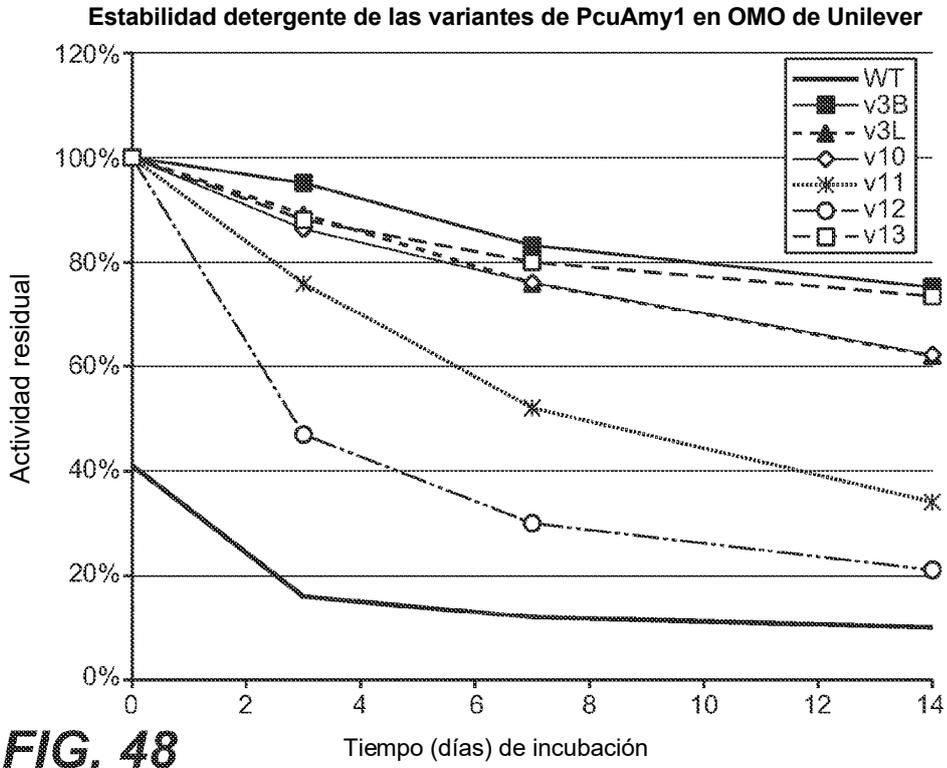


FIG. 47



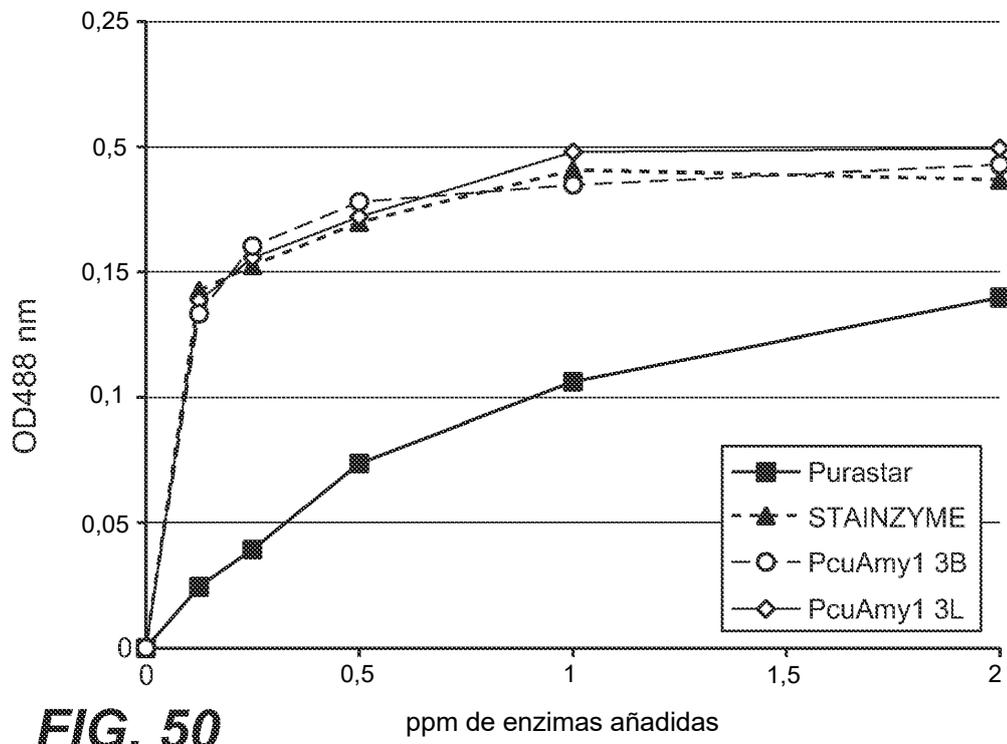


FIG. 50

