

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 734 183**

51 Int. Cl.:

C11D 3/33 (2006.01)

C11D 3/36 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

C12N 9/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2011 PCT/US2011/024321**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2011 WO11100410**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2011 E 11705751 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2534233**

54 Título: **Composición limpiadora que comprende variantes de amilasa con alta estabilidad en presencia de un agente quelante**

30 Prioridad:

10.02.2010 EP 10153223

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.12.2019

73 Titular/es:

**THE PROCTER & GAMBLE COMPANY (100.0%)
One Procter & Gamble Plaza
Cincinnati, OH 45202, US**

72 Inventor/es:

**MEEK, MICHELLE;
SOUTER, PHILLIP, FRANK;
BEWICK, LINDSAY, SUZANNE;
SVENDSEN, ALLAN;
JOHANSEN, ANNETTE, HELLE;
BJOERNVAD, MAD, ESKELUND;
RASMUSSEN, FRANK, WINTHER;
SKJOET, MICHAEL;
LARSEN, ESKILDSEN, SIGNE;
OEBRO, JENS;
KAASGAARD, SVEND y
BEIER, LARS**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

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

ES 2 734 183 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

Composición limpiadora que comprende variantes de amilasa con alta estabilidad en presencia de un agente quelante

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones limpiadoras que comprenden variantes de una alfa-amilasa que tienen una estabilidad mejorada frente a los agentes quelantes con respecto a su enzima parental.

10 **Antecedentes de la invención**

Las alfa-amilasas (alfa-1,4-glucan-4-glucanohidrolasas, E.C. 3.2.1.1) constituyen un grupo de enzimas que cataliza la hidrólisis del almidón y otros oligosacáridos y polisacáridos lineales y ramificados con enlace 1,4-glucosídico.

15 Entre las primeras alfa-amilasas bacterianas utilizadas figuraba una alfa-amilasa procedente de *B. licheniformis*, también denominada Termamyl, que ha sido ampliamente caracterizada y la estructura cristalina se ha determinado para esta enzima. Las amilasas alcalinas, tal como la alfa-amilasa derivada de *Bacillus* sp. que se describe en WO 95/26397 constituyen un grupo particular de alfa-amilasas que son de utilidad en detergentes. Muchas de estas amilasas bacterianas conocidas se han modificado para mejorar su funcionalidad en una aplicación determinada.

20 Termamyl y muchas alfa-amilasas muy eficaces requerían calcio para su actividad. En la estructura cristalina para Termamyl se encontró que cuatro átomos de calcio estaban unidos en la estructura de la alfa-amilasa coordinados por residuos de aminoácidos cargados negativamente. En otras alfa-amilasas la cantidad de iones calcio unidos en la estructura puede ser diferente. Este requisito para el calcio es un inconveniente en aplicaciones donde haya presentes compuestos quelantes fuertes, tales como en detergentes y en composiciones limpiadoras. US-2003/0211958 se refiere a amilasas de tipo Termamyl que supuestamente tienen una mayor termoestabilidad a bajas concentraciones de Ca^{2+} .

30 Como se ha mencionado anteriormente, es bien sabido que varias enzimas dependen del calcio o de otros iones metálicos tales como magnesio o cinc tanto para la actividad como para la estabilidad, por lo que supone un desafío desarrollar enzimas que sean estables y muestren una buena eficacia en detergentes y composiciones limpiadoras que contienen agentes quelantes. Los agentes quelantes se incorporan para reducir la dureza del agua durante el lavado, proteger los agentes blanqueadores que pueden también estar presentes, y los agentes quelantes también tienen un efecto directo sobre la eliminación de algunas manchas. La estabilidad de una enzima dependiente de calcio en un detergente a veces puede mejorarse mediante la adición de calcio al detergente, pero a menudo esto destruirá el efecto de eliminación de manchas. Además, la adición de calcio a un detergente líquido puede presentar problemas con la formulación, es decir, la estabilidad física del detergente.

Sumario de la invención

40 Por lo tanto, sería beneficioso proporcionar composiciones y variantes de alfa-amilasas que sean estables frente a los agentes quelantes y que preferiblemente tengan una capacidad limpiadora mantenida o aumentada en comparación con la alfa-amilasa parental.

45 Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición limpiadora que comprende (a) una variante de una alfa-amilasa parental, en donde la variante tiene actividad amilolítica y al menos 70 % de identidad con la id. de sec. n.º: 6 y comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y además comprende una sustitución en las posiciones 195, 206 y 243, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º: 6; y (b) un adyuvante de limpieza, preferiblemente en una cantidad de 0,01 a 99,9 % en peso; y (c) al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0.

50 Otro aspecto se refiere a una composición de limpieza que comprende (a) una variante de una alfa-amilasa parental, en donde la variante tiene actividad amilolítica y al menos 70 % de identidad con la id. de sec. n.º: 6 y comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y además comprende una sustitución en las posiciones 195, 206 y 243, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º: 6; y (b) un adyuvante de limpieza, preferiblemente en una cantidad de 0,01 a 99,9 % en peso; y (c) en donde dicho agente quelante es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración del agente quelante inferior a 0,9 veces la concentración de citrato capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM, medida a 21 °C y pH 8,0; y un adyuvante de limpieza.

60 En un aspecto preferido la invención se refiere a una composición de limpieza en donde la variante de una alfa-amilasa parental comprende además una alteración en una o más posiciones correspondientes a posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458 en donde

65 (a) la alteración o alteraciones son independientemente

(i) una inserción de un aminoácido inmediatamente corriente abajo y adyacente a la posición,

(ii) una delección del aminoácido que ocupa la posición, y/o

(iii) una sustitución del aminoácido que ocupa la posición,

(b) la variante tiene actividad alfa-amilasa; y

(c) cada posición responde a una posición en la secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos de la id. de sec. n.º:6.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Las alfa-amilasas (alfa-1,4-glucan-4-glucanohidrolasas, E.C. 3.2.1.1) constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis del almidón y otros oligosacáridos y polisacáridos lineales y ramificados con enlace 1,4-glucosídico. Las alfa-amilasas conocidas se obtienen de una amplia selección de organismos, incluidas bacterias, tales como las especies del género *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus licheniformis*; de especies de hongos, tales como *Aspergillus oryzae* (TAKA-amilasa) o *Aspergillus niger*; de plantas tales como la cebada y de mamíferos.

Enzima natural: El término alfa-amilasa “natural” denota una alfa-amilasa expresada por un microorganismo de origen natural, tal como una bacteria, levadura, u hongo filamentoso presente en la naturaleza. Los términos “enzima natural” y “enzima parental” pueden utilizarse de forma intercambiable cuando la enzima parental no es una enzima variante.

Enzima variante: El término “variante” se define en la presente memoria como un polipéptido que tiene actividad alfa-amilasa que comprende una alteración, tal como una sustitución, inserción, y/o delección, de uno o más (o uno o varios) residuos de aminoácidos en una o más (o una o varias) posiciones específicas de la amilasa parental o natural. Preferiblemente menos de 50 modificaciones, más preferiblemente menos de 30 modificaciones. La alfa-amilasa alterada se obtiene por intervención humana mediante la modificación de la alfa-amilasa parental.

Enzima progenitora: El término alfa-amilasa “parental”, como se utiliza en la presente memoria, significa una alfa-amilasa a la cual se realizan modificaciones para producir las alfa-amilasas variantes de la presente invención. Este término también se refiere al polipéptido con el que se compara una variante de la invención. La parental puede ser un polipéptido de origen natural (“wild type”), o puede incluso ser una variante del mismo, preparado mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, la proteína parental puede ser una variante de un polipéptido de origen natural que ha sido modificado o alterado en la secuencia de aminoácidos. Por lo tanto, la alfa-amilasa parental puede tener una o más (o una o varias) sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos. Por lo tanto, la alfa-amilasa parental puede ser una variante de una alfa-amilasa parental. Una parental puede ser también una variante alélica, que es un polipéptido codificado por cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico.

Propiedad mejorada: La expresión “propiedad mejorada” se define en la presente memoria como una característica asociada a una variante mejorada en comparación con la alfa-amilasa parental. Estas propiedades mejoradas incluyen, aunque no de forma limitativa, una actividad amilolítica incrementada, por ejemplo, cuando se mide en un ensayo EnzChek o en el ensayo PNP-7 como se describe en la sección de ejemplos en la presente memoria; mayor capacidad limpiadora, tal como eficacia frente a la suciedad, por ejemplo, eficacia frente a manchas que contienen almidón; eliminación de manchas, evitar la aparición del color gris, estabilidad, por ejemplo, termoestabilidad, estabilidad del pH, o estabilidad en presencia de aditivos reforzantes de la detergencia, incluidos quelantes, estabilidad en formulaciones detergentes en polvo, líquidas o en gel o composiciones de lavado de vajillas, eficacia dependiente de la temperatura y perfil de actividad alterados, actividad de pH, especificidad de sustrato, especificidad del producto y estabilidad química. La capacidad limpiadora y/o capacidad de lavado de vajillas puede medirse como se describe más adelante en “Materiales y Métodos” en la presente solicitud. Preferiblemente, las variantes de la invención incluyen una combinación de propiedades mejoradas, tales como estabilidad mejorada, capacidad limpiadora mejorada, capacidad de lavado de vajillas mejorada y/o actividad mejorada en el detergente. La estabilidad mejorada incluye tanto estabilidad durante el almacenamiento en un producto detergente concentrado como estabilidad en el detergente diluido durante el lavado. La propiedad mejorada incluye una mayor capacidad limpiadora o de lavado de vajillas a baja temperatura.

Actividad: en el presente contexto, el término “actividad” es la actividad amilolítica medida por el número de enlaces 1,4-alfa-D-glucosídicos hidrolizados en polisacáridos que contienen tres o más unidades de D-glucosa con uniones 1,4-alfa como, por ejemplo, en el almidón, por unidad de tiempo y por unidad de proteína enzimática en condiciones especificadas, por ejemplo, la actividad obtenida en condiciones especificadas por ml de muestra de enzima de g de una proteína enzimática. La actividad puede medirse en, por ejemplo, el ensayo EnzChek o en el ensayo PNP-G7 como se describe más adelante en “Materiales y Métodos”. En la presente solicitud, el término

“actividad” se usa de forma intercambiable con “actividad amilolítica”. El término “actividad específica” se usa con frecuencia para describir la actividad máxima obtenida por ml (o g) de proteína enzimática.

Estabilidad química mejorada: El término “estabilidad química mejorada” se define en la presente memoria como una enzima variante que presenta retención de la actividad enzimática después de un período de incubación en presencia de una sustancia química o sustancias químicas, ya sean existentes de forma natural o sintéticas, que reduce la actividad enzimática de la enzima precursora. La estabilidad química mejorada también puede resultar en variantes que pueden catalizar mejor una reacción en presencia de dichas sustancias químicas. En un aspecto particular de la invención, la estabilidad química mejorada es una estabilidad mejorada en un detergente, en particular en un detergente líquido. La estabilidad de detergente mejorada es, en particular, una estabilidad mejorada de la actividad de alfa-amilasa cuando una variante de alfa-amilasa de la presente invención se mezcla en una formulación detergente líquida que comprende un agente quelante, el líquido también incluye geles o una pasta. La formulación detergente líquida puede referirse a detergente concentrado que se añade durante un proceso de lavado de ropa o de lavado de vajillas automático o un detergente diluido tal como solución de lavado, es decir, una solución acuosa a la que se añade el detergente concentrado.

En la presente invención, los detergentes líquidos son particularmente útiles como detergentes líquidos para lavado de ropa.

Estabilidad El término “estabilidad” incluye estabilidad durante el almacenamiento y estabilidad durante el uso, por ejemplo, durante un proceso de lavado, y refleja la estabilidad de la amilasa en función del tiempo por ejemplo, cuánta actividad se retiene cuando la amilasa se mantiene en solución, en particular en una solución detergente. Por ejemplo, la variante de alfa-amilasa puede tener una actividad residual, es decir, el nivel de actividad retenida, por encima del 70 % después de 18 horas a 31 °C. La estabilidad se ve influida por muchos factores, por ejemplo, pH, temperatura, composición del detergente, por ejemplo, cantidad y tipo de aditivo reforzante de la detergencia, tensioactivos, etc. La estabilidad de la amilasa se mide con el ensayo EnzCheck o el ensayo PNP-G7 descrito en “Materiales y Métodos”.

Estabilidad mejorada: El término “estabilidad mejorada” se define en la presente memoria como una enzima variante que presenta una mayor estabilidad que es superior a la estabilidad de la alfa-amilasa parental, por ejemplo, teniendo una actividad residual superior a 70 % o teniendo al menos una mejora de 10 pp en la actividad residual con respecto a la parental al cabo de 18 horas a pH 8 en presencia de (1,5 p/v) de DTPA a 31 °C cuando se mide en el ensayo EnzCheck como se describe en “Materiales y Métodos”. La mejora en puntos porcentuales (pp) en la actividad residual de la variante con respecto a la parental se calcula como la diferencia entre la actividad residual de la variante y la de la parental como se describe en “Materiales y Métodos”.

Aditivos reforzantes de la detergencia Los aditivos reforzantes de la detergencia pueden clasificarse mediante el ensayo descrito por M.K. Nagarajan y col., JAOCS, vol. 61, n°. 9 (septiembre 1984), pp. 1475-1478 para determinar el nivel mínimo de aditivo reforzante de la detergencia requerido para reducir la dureza del agua a un pH de 8 de 2,0 mM (como CaCCh) a 0,10 mM en una solución. El aditivo reforzante de la detergencia puede ser, especialmente, un agente quelante que forma complejos solubles en agua, por ejemplo, iones calcio y magnesio.

Los agentes quelantes, o quelantes, son sustancias químicas que forman moléculas con determinados iones de metal, inactivando los iones de modo que no pueden reaccionar con otros elementos, por lo tanto un agente de unión que suprime la actividad química formando quelatos. La quelación es la formación o presencia de dos o más enlaces aparte entre un ligando y un solo átomo central. El ligando puede ser cualquier compuesto orgánico, un silicato o un fosfato. En el presente contexto, el término “agentes quelantes” comprende quelantes, agente quelante, agentes quelantes, agentes formadores de complejos, o agentes secuestrantes, que forman complejos solubles en agua con iones de metal tales como calcio y magnesio. El efecto de quelato describe la afinidad mejorada de los ligandos quelantes para un ion metálico en comparación con la afinidad de una colección de ligandos no quelantes similares para el mismo metal. Los agentes quelantes tienen capacidad de unión con iones metálicos, en particular iones calcio (Ca^{2+}), y se han utilizado ampliamente en detergentes y composiciones en general para lavado, tal como lavado de ropa o lavado de vajilla. Sin embargo, se ha demostrado que los propios agentes quelantes inhiben la actividad enzimática. El término agente quelante se utiliza en la presente solicitud de modo intercambiable con “agente formador de complejos” o “agente quelante” o “quelante”.

Puesto que la mayor parte de las alfa-amilasas son sensibles al calcio, la presencia de agentes quelantes puede afectar a la actividad enzimática. La sensibilidad al calcio de las alfa-amilasas puede determinarse incubando una alfa-amilasa dada en presencia de un agente quelante fuerte y analizando el impacto de esta incubación en la actividad de la alfa-amilasa en cuestión. Una alfa-amilasa sensible al calcio perderá una parte importante o toda su actividad durante la incubación.

Caracterización de los agentes quelantes Como se ha mencionado, el efecto de quelato o el efecto quelante describe la afinidad mejorada de los ligandos quelantes por un ion metálico en comparación con la afinidad de una colección de ligandos no quelantes similares para el mismo metal. Sin embargo, la fuerza de este efecto de quelato puede determinarse mediante diversos tipos de ensayos o métodos de medición diferenciando o clasificando de este modo los agentes quelantes según su efecto (o fuerza) quelante.

En un ensayo preferido, los agentes quelantes pueden caracterizarse por su capacidad para reducir la concentración de iones calcio libres (Ca^{2+}) de 2,0 mM a 0,10 mM o menos a pH 8,0, por ejemplo, utilizando una prueba basada en el método descrito por M.K. Nagarajan y col., JAOCS, vol. 61, n.º 9 (septiembre 1984), p. 1475-1478. En el ejemplo 2a se describe un ejemplo de caracterización de agentes quelantes utilizando el método basado en Nagarajan y col. El agente quelante requerido según la invención abarca agentes quelantes capaces de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,1 mM o menos a una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 9,5 mM, preferiblemente inferior a 9 mM, preferiblemente inferior a 8,5 mM, preferiblemente inferior a 8 mM, preferiblemente inferior a 7,5 mM, preferiblemente inferior a 7 mM, preferiblemente inferior a 6,5 mM, preferiblemente inferior a 6 mM, preferiblemente inferior a 5,5 mM, preferiblemente inferior a 5 mM, preferiblemente inferior a 4,5 mM, inferior a 4 mM, preferiblemente inferior a 3,5 mM, preferiblemente inferior a 3 mM, preferiblemente inferior a 2,5 mM, preferiblemente inferior a 2 mM, preferiblemente inferior a 1,5 mM o preferiblemente inferior a 1 mM, cuando se mide a pH 8,0 a 21 °C.

Preferiblemente, el agente quelante según la invención abarca agentes quelantes capaces de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,1 mM a una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 9,5 mM, preferiblemente inferior a 9 mM, preferiblemente inferior a 8,5 mM, preferiblemente inferior a 8 mM, preferiblemente inferior a 7,5 mM, preferiblemente inferior a 7 mM, preferiblemente inferior a 6,5 mM, preferiblemente inferior a 6 mM, preferiblemente inferior a 5,5 mM, preferiblemente inferior a 5 mM, preferiblemente inferior a 4,5 mM, inferior a 4 mM, preferiblemente inferior a 3,5 mM, preferiblemente inferior a 3 mM, preferiblemente inferior a 2,5 mM, preferiblemente inferior a 2 mM, preferiblemente inferior a 1,5 mM o preferiblemente inferior a 1 mM, cuando se mide en cloruro potásico 80 mM y EPPS ((ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-propanosulfónico)) 49 mM, a pH 8 a 21 °C. En una realización preferida específica, el agente quelante es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,1 mM cuando se mide en cloruro potásico 80 mM y EPPS 49 mM, a pH 8 y 21 °C y utilizando un electrodo selectivo de iones calcio para la determinación de la concentración de calcio libre, como se describe en "Materiales y Métodos". Por tanto, preferiblemente, los agentes quelantes abarcan agentes quelantes capaces de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 9,5 mM, preferiblemente inferior a 9,0 mM, preferiblemente inferior a 8,5 mM, preferiblemente inferior a 8,0 mM, preferiblemente inferior a 7,5 mM, preferiblemente inferior a 7,0 mM, preferiblemente inferior a 6,5 mM, preferiblemente inferior a 6,0 mM, preferiblemente inferior a 5,5 mM, preferiblemente inferior a 5,0 mM, preferiblemente inferior a 4,5 mM, inferior a 4,0 mM, preferiblemente inferior a 3,5 mM, preferiblemente inferior a 3,0 mM, preferiblemente inferior a 2,5 mM, preferiblemente inferior a 2,0 mM, preferiblemente inferior a 1,5 mM o preferiblemente inferior a 1 mM, cuando se ensaya a pH 8,0 y a 21 °C, como se describe en "Materiales y Métodos".

En una realización especialmente preferida, los agentes quelantes son capaces de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide en cloruro potásico 80 mM y EPPS 49 mM a pH 8 y 21 °C a una concentración de 9 mM a 0,5 mM, preferiblemente de 9 mM a 1 mM, preferiblemente de 8 mM a 1 mM, preferiblemente de 7 mM a 1 mM, preferiblemente de 6 mM a 1 mM, preferiblemente de 5 mM a 1 mM, preferiblemente de 4 mM a 1 mM, preferiblemente de 3 mM a 1 mM, preferiblemente de 2 mM a 1 mM, preferiblemente de 9,0 mM a 1,5 mM, preferiblemente de 8,0 mM a 1,5 mM, preferiblemente de 7,0 mM a 1,5 mM, preferiblemente de 6,0 mM a 1,5 mM, preferiblemente de 5,0 mM a 1,5 mM, preferiblemente de 4,0 mM a 1,5 mM, preferiblemente de 3,0 a 1,5 mM, preferiblemente de 2,5 mM a 1,0 mM, preferiblemente de 2,0 mM a 1,1 mM, preferiblemente de 1,85 mM a 1,0 mM.

La reducción en la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM de Ca^{2+} de a, corresponde a la reducción de la dureza del agua de 200 ppm (como CaCO_3 en forma de $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ en presencia de CO_2 ácido) a 10 ppm. El nivel mínimo de aditivo reforzante de la detergencia se calcula a partir de la sal sódica del quelante con respecto a quelante seco al 100 %.

El efecto quelante del agente quelante también puede medirse con respecto al citrato. A la concentración del citrato capaz de reducir la cantidad de concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM se le asigna al valor de 1 y los resultados de los agentes quelantes se comparan con este valor. El agente quelante preferido según la invención es capaz de reducir la concentración de calcio libre de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración inferior a 0,9, tal como inferior a 0,8, tal como inferior a 0,6, tal como inferior a 0,5, tal como inferior a 0,4, tal como inferior a 0,3, tal como inferior a 0,2, tal como inferior a 0,1 veces inferior en comparación con la concentración de citrato, cuando se mide a pH 8,0 y 21 °C. El agente quelante preferido según la invención es capaz de reducir la concentración de calcio libre de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración inferior a 0,9, tal como inferior a 0,8, tal como inferior a 0,7, tal como inferior a 0,5, tal como inferior a 0,4, tal como inferior a 0,3, tal como inferior a 0,2, tal como inferior a 0,1 veces inferior en comparación con la concentración de citrato, cuando se mide a pH 8,0 a 21 °C utilizando un electrodo selectivo a iones calcio para la determinación de la concentración de calcio libre cuando se mide en cloruro potásico 80 mM y EPPS 49 mM a 21 °C y pH 8,0.

En una realización especialmente preferida, el agente quelante es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración de agente quelante inferior a 1,0 a 0,1, tal como inferior a 0,9 a 0,1, tal como inferior a 0,8 a 0,1, tal como inferior a 0,7 a 0,1, tal como inferior a 0,6 a 0,1, tal como inferior a 0,5 a 0,1, tal como inferior a 0,4 a 0,1, tal como inferior a 0,35 a 0,1, tal como inferior a 0,3 a 0,1 veces inferior en comparación con la concentración de citrato capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM, cuando se mide a pH 8,0 y 21 °C.

Una realización adicional de la invención se refiere a una composición de limpieza que comprende una variante de una alfa-amilasa parental en donde la alfa-amilasa variante comprende al menos una, al menos dos o al menos tres deleciones

en regiones de aminoácido de 181, 182, 183 o 184 y que comprende además una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212 y 213, que comprende una sustitución en las posiciones 195, 206 y 243 utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6, y que comprende además al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0; y un adyuvante de limpieza.

En una primera realización preferida de la invención la composición limpiadora comprende una variante de una alfa-amilasa parental, en donde la variante tiene actividad amilolítica y al menos 70 % de identidad con la id. de sec. n.º 6 y que comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y que comprende además una sustitución en la posición 195 y además en las posiciones 206 y 243, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6, y que además comprende al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración del agente quelante inferior a 0,9 veces la concentración de citrato capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM, medida a 21 °C y pH 8; y un adyuvante de limpieza.

Por lo tanto, el agente quelante según la invención es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración inferior a la concentración de citrato necesaria para reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM en las mismas condiciones.

De forma alternativa, la fuerza del complejo formado entre el agente quelante y los iones de metal, tales como calcio y/o magnesio, se expresa como el valor log K (constante de equilibrio o unión o disociación o estabilidad). Esta constante puede medirse a un pH determinado, a una temperatura dada y a un valor de fuerza iónica determinado.

Como se ha mencionado anteriormente, la fuerza del complejo formado entre el agente quelante y los iones metálicos, por ejemplo, calcio y/o magnesio puede expresarse como el valor log K (constante de equilibrio o unión o disociación o estabilidad); la constante puede medirse mediante calorimetría isotérmica de titulación (ITC) como se describe en A. Nielsen y col., Anal. Biochem. Vol. 314, (2003), pp. 227-234 y a partir del valor K, el log K puede calcularse como el logaritmo del valor K (base 10). El valor log K medido mediante este método dependerá de la temperatura, el pH, la fuerza iónica, por lo que es importante cuando se comparan los valores K, que se determinen en condiciones similares, preferiblemente las mismas. Además, introduciendo un patrón como referencia, tal como el citrato, pueden reducirse los impactos debidos a las variaciones en los experimentos. Preferiblemente, log K se determina como se describe en "Materiales y Métodos" de la presente solicitud. Por lo tanto, en una realización de la invención, el agente quelante en la composición según la invención tiene un valor log K de al menos 3, tal como al menos 4, tal como al menos 5, tal como al menos 6, tal como al menos 7, tal como al menos 8, tal como al menos 9, tal como al menos 10, tal como al menos 11, cuando log K se mide a pH 10 y a 19 °C como se describe en "Materiales y Métodos". El valor de log K del agente quelante en las composiciones según la invención puede estar también en el intervalo 3-11, tal como 3-10, tal como 3-9, tal como 3-8, tal como 4-11, tal como 5-11 tal como 6-11, tal como 4-10, tal como 5-10, tal como 4-9, tal como 5-9, tal como 4-8, especialmente 5-8. Preferiblemente, el log K del agente quelante en la composición según la invención es un factor de al menos 1, tal como al menos 1,33, tal como al menos 1,67, tal como al menos 2, tal como al menos 2,33, tal como al menos 2,67, tal como al menos 3, tal como al menos 3,33, tal como al menos 3,67 veces el log K de citrato determinado como se describe en el Ejemplo 2b. El agente quelante en las composiciones según la invención también puede estar en el intervalo de un factor 1-3,67, tal como 1-3,33, tal como 1-3,00, tal como 1-2,67, tal como 1,33-3,67, tal como 1,33-3,33, tal como 1,33 - 3,00, tal como 1,33-2,67, tal como 1,67-3,67, tal como 1,67-3,33, tal como 1,67-3, en particular 1,67-2,67 veces el log K de citrato determinado como se describe en "Materiales y Métodos".

Agentes quelantes útiles pueden ser, aunque no de forma limitativa, los siguientes: ácido N-(1,2-dicarboxy-etil)-D,L-aspartico (IDS), ácido N-(2-hidroxietil)iminodiacético (EDG), ácido aspartico-ácido N-monoacético (ASMA), ácido aspartico-ácido N,N-diacético (ASDA), ácido aspartico-ácido N- monopropiónico (ASMP), ácido iminodisuccínico (IDA), ácido N-(2-sulfometil) aspartico (SMAS), ácido N-(2-sulfoetil) aspartico (SEAS), ácido N-(2-sulfometil) glutámico (SMGL), ácido N-(2-sulfoetil) glutámico (SEGL), ácido N-metiliminodiacético (MIDA), ácido α -alanin-N,N-diacético (α -ALDA), ácido serina-N,N-diacético (SEDA), ácido isoserina-N,N-diacético (ISDA), ácido fenilalanina-N,N-diacético (PHDA), ácido antranílico-ácido N,N-diacético (ANDA), ácido sulfanílico-ácido N,N-diacético (SLDA), ácido taurina-N,N-diacético (TUDA), ácido sulfometil-N,N-diacético (SMDA), N-(hidroxietil)-etilendiaminotriacetato (HEDTA), dietanolglicina (DEG), aminotris(ácido metilénfosfónico) (ATMP).

El agente quelante preferido puede contener un grupo amino y puede ser, por ejemplo, un amino-policarboxilato o un fosfonato. Puede ser una molécula monomérica que comprende uno, dos o tres grupos amino (de forma típica grupos amino secundarios o terciarios), y puede contener dos, tres, cuatro o cinco grupos carboxilo o incluso más grupos carboxilo. Los agentes quelantes pueden contener fósforo o no contener fósforo. Existen muchas formas de agrupar agentes quelantes; una forma puede ser la siguiente:

Los agentes quelantes pueden ser, o pueden estar basados en, grupos carboxilato como EDTA (etilendiamino tetraacetato), NTA (2,2',2"-nitriлотriacetato), citrato, 2-hidroxipropano-1,2,3-tricarboxilato, DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), MGDA (ácido metilglicindiacético o N,N'-bis(carboximetil)alanina), EGTA (ácido etilenglicol tetraacético), EDDS (ácido etilendiamino-N,N'-disuccínico), GLDA (ácido L-glutámico, ácido N,N-diacético), policarboxilatos tales como PAA [poli(ácido acrílico)], PAA/PMA [copoli(ácido acrílico/ácido málico)], o mezclas de los mismos.

Los agentes quelantes que contienen fósforo pueden ser polifosfatos o fosfonatos, tales como tripolifosfato sódico (STP), HEDP (ácido 1-hidroxietiliden-1,1-difosfónico), EDTMP [ácido etilendiamintetra(metilenfosfónico)], EDTMPA (ácido etilendiamintetrametilen-tetrafosfónico), DTPMP (ácido dietilentriaminopenta (metilenfosfónico)), DTPMA (ácido dietilentriaminopenta(metilenfosfónico)). Los agentes quelantes pueden contener nitrógeno tal como en EDTA, NTA, DTPA, PDTA, GLDA, MGDA, EDDS, EDTMP, EDTMPA, y DTPMP o ASMA, ASDA, ASMP, IDA, SMAS, SEAS, SMGL, SEGL, MIDA, α -ALDA, SEDA, ISDA, PHDA, ANDA, SLDA, TUDA, SMDA, HEDTA, DEG, ATMP, o mezclas de los mismos.

Por lo tanto, los agentes quelantes preferidos pueden ser, aunque no de forma limitativa, los siguientes: ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA), dietilentriamino-pentametilenfosfónico (DTPMA, DTPMP), ácido hidroxietano difosfónico (HEDP), ácido etilendiamino N,N'-disuccínico (EDDS), ácido metilglicindiacético (MGDA), ácido dietilentriaminopentacético (DTPA), ácido propilendiaminotetraacético (PDTA), 2-hidroxipiridin-N-óxido (HPNO), ácido metilglicino-diacético (MGDA), ácido glutámico ácido N,N'-diacético (ácido N,N'-dicarboximetil glutámico sal tetrasódica (GLDA) y ácido nitrilotriacético (NTA) o mezclas de los mismos. Los agentes quelantes pueden estar presentes en su forma ácida o como sal; preferiblemente, los agentes quelantes pueden estar presentes como sal de sodio, amonio o potasio. Los agentes quelantes preferidos se seleccionan del grupo que consiste en EDTA (etilendiamino tetraacetato), MGDA (ácido metilglicinadiacético o N,N'-bis(carboximetil)alanina), EGTA (ácido etilenglicol tetraacético), DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), DTPMP ácido dietilenetriamino penta(metilen fosfónico), HEDP (ácido 1-hidroxietiliden-1,1-difosfónico) y mezclas de los mismos.

El agente quelante puede estar presente en la composición en una cantidad de 0,0001 % en peso a 20 % en peso, preferiblemente de 0,01 a 10 % en peso, más preferiblemente de 0,1 a 5 % en peso.

Alfa-amilasa parental La alfa-amilasa parental puede ser, en principio, cualquier alfa-amilasa para la cual se desee preparar una variante que tenga estabilidad mejorada durante el almacenamiento o durante el uso, por ejemplo, durante el lavado o en un proceso de hidrólisis de almidón. Por lo tanto, la estabilidad mejorada puede observarse como una pérdida reducida de actividad amilolítica durante el almacenamiento o como una mayor actividad y rendimiento durante el uso. Las alfa-amilasas conocidas se derivan de una amplia selección de organismos, incluidas bacterias, tales como las procedentes de especies del género *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus licheniformis*; de especies de hongos, tales como *Aspergillus oryzae* (TAKA-amilasa) o *Aspergillus niger*, de plantas tales como la cebada y de mamíferos. La alfa-amilasa parental puede ser, en principio, cualquier alfa-amilasa independientemente del origen.

Es bien sabido que una serie de alfa-amilasas producidas por *Bacillus* spp. son altamente idénticas en el nivel de aminoácidos. Debido a la identidad sustancial hallada entre estas alfa-amilasas, se considera que pertenecen a la misma clase de alfa-amilasas, especialmente la clase de "alfa-amilasas de tipo Termamyl".

Por tanto, en el presente contexto, el término "alfa-amilasa similar a Termamyl" quiere decir una alfa-amilasa, especialmente alfa-amilasa *Bacillus*, que, en el nivel de aminoácidos, presenta una identidad sustancial, es decir, al menos 60 % con la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la id. de sec. n.º: 20 (Termamyl™), en la presente memoria.

Alfa-amilasas de tipo Termamyl

Cabe señalar que solamente la alfa-amilasa como se define en las presentes reivindicaciones forma parte de la invención.

En la Tabla 1 que sigue puede encontrarse la identidad de una serie de alfa-amilasas de *Bacillus* conocidas:

Tabla 1

Amilasa parental	Id. de sec. n.º:	Porcentaje de identidad							
		n.º 707	AP1378	BAN	BSG	SP690	SP722	AA560	Termamyl
n.º 707	8	100,0	86,4	66,9	66,5	87,6	86,2	95,5	68,1
AP1378	18	86,4	100,0	67,1	68,1	95,1	86,6	86,0	69,4
BAN	14	66,9	67,1	100,0	65,6	67,1	68,8	66,9	80,7
BSG	16	66,5	68,1	65,6	100,0	67,9	67,1	66,3	65,4
SP690	12	87,6	95,1	67,1	67,9	100,0	87,2	87,0	69,2
SP722	6	86,2	86,6	68,8	67,1	87,2	100,0	86,8	70,8
AA560	10	95,5	86,0	66,9	66,3	87,0	86,8	100,0	68,3
Termamyl	20	68,1	69,4	80,7	65,4	69,2	70,8	68,3	100,0

Por ejemplo, se ha descubierto que la alfa-amilasa de *B. licheniformis* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en id. de sec. n.º 20 (comercializada como Termamyl™) es aproximadamente homóloga en un 81 % a la alfa-amilasa de *B. amyloliquefaciens* que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la id. de sec. n.º: 14 (BAN) y aproximadamente homóloga al 65 % a la alfa-amilasa de *B. amyloliquefaciens* que comprende la secuencia

de aminoácidos mostrada en la id. de sec. n.º 16 (BSG). Otras alfa-amilasas homólogas incluyen SP722 y SP690 descritas en WO 95/26397 y descritas además en id. de sec. n.º 6 y la id. de sec. n.º 12, respectivamente, en la presente memoria. Otras amilasas son la alfa-amilasa AA560 derivada de *Bacillus sp.* y mostrada en la id. de sec. n.º 10, y la alfa-amilasa SP707 o n.º 707 derivada de *Bacillus sp.*, mostrada en la id. de sec. n.º 8 y descrita por Tsukamoto y col., *Biochemical and Biophysical Research communications*, 151 (1988), pp. 25-31. Otra homóloga es la alfa-amilasa KSM AP1378 que se describe en la id. de sec. n.º 18 en WO 97/00324 (de KAO Corporation). Otra homóloga adicional es la SPO.7-7 con la id. de sec. n.º 22. Otra amilasa parental adecuada es la id. de sec. n.º 2 de K 38 o la amilasa de *B. circulans* con la id. de sec. n.º y la id. de sec. n.º, descritas en WO2005/001064.

Otras alfa-amilasas interesantes incluyen la alfa-amilasa producida por la cepa *B. licheniformis* descrita en EP 0252666 (ATCC 27811), y las alfa-amilasas identificadas en WO 91/00353 y WO 94/18314. Otras alfa-amilasas comerciales de tipo Termamyl están comprendidas en los productos vendidos con los siguientes nombres comerciales: Optitherm™ y Takatherm™ (Solvay); Maxamyl™ (comercializada por Gist-brocades/Genencor), Spezym AA™ y Spezyme Delta AA™ (comercializada por Genencor), y Keistase™ (comercializada por Daiwa), Dex lo, GC 521 (comercializada por Genencor) y Ultraphlow (de Enzyme Biosystems), Purastar™ ST 5000E, PURASTRA™ HP AM L, POWERASE™, Spezyme FRED, GC358, ClearFlow AA (de Danisco.), o la alfa-amilasa TS-23 (id. de sec. n.º (Lin y col., *J.App.Microbiol.* 1997, 82, 325-334).

La alfa-amilasa que no es de tipo Termamyl puede, por ejemplo, ser una alfa-amilasa fúngica, una alfa-amilasa de mamífero o de planta o una alfa-amilasa bacteriana (distinta de una alfa-amilasa de tipo Termamyl). Los ejemplos específicos de estas alfa-amilasas incluyen la alfa-amilasa TAKA de *Aspergillus oryzae*, la alfa-amilasa ácida de *A. niger*, la alfa-amilasa de *Bacillus subtilis*, la alfa-amilasa pancreática porcina y una alfa-amilasa de cebada. Todas estas alfa-amilasas tienen estructuras elucidadas, que son marcadamente diferentes de la estructura de una alfa-amilasa de tipo Termamyl típica, tal como se indica en la presente memoria.

Las alfa-amilasas fúngicas anteriormente mencionadas, es decir, obtenidas de *A. niger* y *A. oryzae*, son altamente idénticas en el nivel de aminoácidos y de forma general se considera que pertenecen a la misma familia de alfa-amilasas. La alfa-amilasa fúngica derivada de *Aspergillus oryzae* se comercializa con el nombre comercial Fungamyl™.

Alfa-amilasas híbridas parentales

La alfa-amilasa parental puede ser una alfa-amilasa híbrida, es decir, una alfa-amilasa que comprende una combinación de secuencias de aminoácidos parciales derivadas de al menos dos alfa-amilasas.

La alfa-amilasa híbrida parental puede ser una, que en función de la homología de aminoácido y/o de la reactividad inmunológica cruzada y/o de la hibridación de ADN (como se ha definido anteriormente) puede determinarse como perteneciente a la familia de alfa-amilasas de tipo Termamyl. En este caso, la alfa-amilasa híbrida se compone de forma típica de al menos una parte de una alfa-amilasa de tipo Termamyl y parte(s) de una o más alfa-amilasas distintas seleccionadas de alfa-amilasas de tipo Termamyl o no Termamyl de origen microbiano (bacteriano o fúngico) y/o de mamífero.

Por lo tanto, la alfa-amilasa híbrida parental puede comprender una combinación de secuencias de aminoácidos parciales derivadas de al menos dos alfa-amilasas de tipo Termamyl, o de al menos una alfa-amilasa bacteriana de tipo Termamyl y al menos una de tipo no Termamyl, o de al menos una de tipo Termamyl y al menos una alfa-amilasa fúngica. La alfa-amilasa de tipo Termamyl a partir de la cual se deriva una secuencia de aminoácidos parcial puede ser cualquiera de las alfa-amilasas de tipo Termamyl mencionadas en la presente memoria.

En una realización, la alfa-amilasa de tipo Termamyl parental es una alfa-amilasa de tipo Termamyl híbrida, idéntica a la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*, mostrada en la id. de sec. n.º 20, salvo que los residuos de aminoácidos 35 N-terminales (de la proteína madura) se sustituyen con los residuos de aminoácidos 33 N-terminales de la proteína madura de la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en id. de sec. n.º 14 dicho híbrido puede tener además las siguientes mutaciones: H156Y+A181T+N190F+A209V+Q264S (utilizando la numeración de la id. de sec. n.º 6) que recibe el nombre de LE174. En otra realización LE487 que comprende, además, las mutaciones G48A, T49I, G107A, I201F, que recibe el nombre de LE399. En una realización, la parental es id. de sec. n.º 16 con las mutaciones 1181* + G182*+N195F.

En un aspecto preferido, la alfa-amilasa parental es una alfa-amilasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la id. de sec. n.º 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 18, 20, 22, 24 o 26 en la presente memoria. En otro aspecto preferido la alfa-amilasa parental es una alfa-amilasa, que muestra una homología de 60 %, preferiblemente al menos 65 %, preferiblemente al menos 70 %, preferiblemente al menos 75 % preferiblemente al menos 80 %, preferiblemente al menos 81 %, preferiblemente al menos 82 %, preferiblemente al menos 83 %, preferiblemente al menos 84 % preferiblemente al menos 85 %, preferiblemente al menos 86 %, preferiblemente al menos 87 %, preferiblemente al menos 88 %, preferiblemente al menos 89 %, especialmente preferiblemente al menos 90 %, especialmente preferiblemente al menos 91 %, especialmente preferiblemente al menos 92 %, especialmente preferiblemente al menos 93 %, especialmente preferiblemente al menos 94 %, especialmente aún más preferiblemente al menos 95 %, especialmente preferiblemente al menos 96 %, especialmente preferiblemente al menos 97 %, especialmente preferiblemente al menos 98 %, especialmente preferiblemente al menos 99 %, especialmente preferiblemente al menos 100 %.

más preferiblemente al menos 96 %, más preferiblemente al menos 97 %, más preferiblemente al menos 98 %, más preferiblemente al menos 99 % del polipéptido maduro de id. de sec. n.º 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 o 26.

En un aspecto, las alfa-amilasas parentales tienen una secuencia de aminoácidos que difiere (por ejemplo, mediante la inserción o sustitución) en uno o varios aminoácidos, preferiblemente en diez aminoácidos, más preferiblemente en nueve, ocho, siete, seis, preferiblemente en cinco aminoácidos, más preferiblemente en cuatro aminoácidos, aún más preferiblemente en tres aminoácidos, con máxima preferencia en dos aminoácidos, e incluso con máxima preferencia en un aminoácido respecto del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 o 26.

La alfa-amilasa parental puede ser una alfa-amilasa que presenta reactividad inmunológica cruzada con un anticuerpo frente a una alfa-amilasa que tiene una de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en id. de sec. n.º 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 y 26. En una realización preferida, la alfa-amilasa parental es una en donde el anticuerpo frente a la alfa-amilasa parental presenta una afinidad o aidez por una alfa-amilasa que tiene una de las secuencias de aminoácidos que se muestra en id. de sec. n.º 2, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 o 26 en una técnica de ensayo competitivo tal como, por ejemplo, ELISA o BiaCore, respectivamente, o que presenta afinidad o aidez comparable a la de la alfa-amilasa parental, y en donde el anticuerpo frente a la alfa-amilasa que tiene una de las secuencias de aminoácidos mostrada en la id. de sec. n.º 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 o 26 presenta en dicha técnica de ensayo competitivo una afinidad o aidez por la alfa-amilasa parental comparable con la afinidad o la aidez por la alfa-amilasa que tiene una de las secuencias de aminoácidos mostrada en la id. de sec. n.º 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 o 26. En otras realizaciones, la alfa-amilasa parental es una que tiene una afinidad o aidez que es al menos 70 %, preferiblemente al menos 75 %, preferiblemente al menos 80 %, preferiblemente al menos 85 %, preferiblemente al menos 90 %, preferiblemente al menos 95 %, preferiblemente al menos 100 %, preferiblemente al menos 110 %, preferiblemente al menos 120 %, especialmente preferiblemente al menos 125 % de la afinidad o aidez de la alfa-amilasa que tiene una de las secuencias de aminoácidos mostradas en la id. de sec. n.º 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 20, 22, 24 o 26.

La alfa-amilasa parental puede ser, además, una alfa-amilasa codificada por una secuencia de ADN que se hibrida con la secuencia de ADN que codifica las alfa-amilasas especificadas anteriormente, que son evidentes a partir de la id. de sec. n.º 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 o 25 de la presente solicitud. Por lo tanto, una realización se refiere a una alfa-amilasa variante de una alfa-amilasa parental, en donde la alfa-amilasa parental:

(A) se obtiene de una cepa de *B. licheniformis*, *Bacillus* sp. o KSM AP1378;

(B) se selecciona del grupo que tiene secuencias de aminoácidos como se muestra en las id. de sec. n.º 6, 8, 10, 12, 18 o 22;

(C) que tiene una identidad de secuencia con una de id de sec. n.º 2, 4, 6, 8, 10, 12 14, 16, 18, 20, 22, 24 o 26 de al menos 70 %, preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 90 %, aún más preferiblemente al menos 95 %, aún más preferiblemente al menos 97 %, y aún más preferiblemente al menos 99 %, o

(D) codificada por una secuencia de ácidos nucleicos, que se hibrida en condiciones de baja, preferiblemente media, preferiblemente alta astringencia, con la secuencia de ácidos nucleicos de una de id. de sec. n.º 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 o 25

En un aspecto, el polipéptido parental que tiene actividad de mejora amilolítica es (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60 % de identidad con el polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 o 26; (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida en al menos condiciones de baja restrictividad con (i) la secuencia codificante de polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 o 25; (ii) la secuencia de ADN genómico que comprende la secuencia codificante de polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 o 25, o (iii) una cadena complementaria de longitud completa de (i) o (ii); o (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 60 % de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 o 25.

Cuando se hace referencia a una variante particular de una alfa-amilasa parental (de forma convencional) como referencia a la modificación (por ejemplo, delección o sustitución) de residuos de aminoácidos específicos en la secuencia de aminoácidos de una alfa-amilasa específica, debe entenderse que se abarcan de este modo variantes de otra alfa-amilasa modificada en la posición o posiciones equivalentes (como se determina a partir de la mejor alineación posible de secuencias de aminoácidos entre las secuencias de aminoácidos respectivas).

En un aspecto particular, la alfa-amilasa parental es una variante de una de origen natural (natural) preparada por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, la alfa-amilasa parental puede ser una variante de una alfa-amilasa de origen natural que ha sido modificada o alterada en la secuencia de aminoácidos.

La alfa-amilasa parental puede ser una alfa-amilasa parental sustancialmente homóloga que puede tener una o más (varias) sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos. Estos cambios son, preferiblemente, de naturaleza

minoritaria, es decir, sustituciones conservadoras de aminoácidos como se describe a continuación y otras sustituciones que no afectan de forma significativa al plegamiento tridimensional o a la actividad de la proteína o polipéptido; deleciones pequeñas, de forma típica, de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; y pequeñas extensiones aminoterminal o carboxiterninal, tales como un residuo de metionina aminoterminal, un pequeño péptido enlazante de hasta aproximadamente 20-25 residuos, o una pequeña extensión que facilita la purificación (una etiqueta de afinidad), tal como una cola de polihistidina, o proteína A (Nilsson y col., 1985, 1985, EMBO J. 4: 1075; Nilsson y col., 1991, Methods Enzymol. 198; 3. Ver, también, en general, Ford y col., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

Aunque los cambios descritos anteriormente son preferiblemente de naturaleza minoritaria, estos cambios también pueden ser sustanciales, tales como la fusión de polipéptidos mayores de hasta 300 aminoácidos o más como extensiones aminoterminal o carboxiterninal.

Cuando se hace referencia a una variante particular de una alfa-amilasa parental (variante de la invención) (de forma convencional) como referencia a la modificación (por ejemplo, deleción o sustitución) de residuos de aminoácidos específicos en la secuencia de aminoácidos de una alfa-amilasa parental específica, debe entenderse que se abarcan de este modo variantes de otra alfa-amilasa parental modificada en la posición o posiciones equivalentes (como se determina a partir de la mejor alineación posible de secuencias de aminoácidos entre las secuencias de aminoácidos respectivas).

Homología (identidad de secuencia)

La homología puede determinarse como el grado de identidad entre las dos secuencias, lo que indica una derivación de la primera secuencia de la segunda. Para los propósitos de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970 *J. Mol. Biol.* 48: 443-453) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice y col., 2000, *Trends Genet.* 16: 276-277), preferiblemente la versión 3.0.0 o una versión superior. Los parámetros opcionales utilizados tienen una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión para EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado como "mayor identidad" (obtenido utilizando la opción "nobrief") se utiliza como por ciento de identidad y se calcula de la siguiente forma:

$$(\text{Residuos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de alineación} - \text{Número total de huecos en la alineación})$$

Para los propósitos de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, mencionado anteriormente) según se aplica en el programa Needle del paquete informático EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice y col., 2000, mencionado anteriormente), preferiblemente la versión 3.0.0 o versiones posteriores. Los parámetros opcionales utilizados tienen una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 0,5, y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión para EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado como "mayor identidad" (obtenido utilizando la opción "nobrief") se utiliza como por ciento de identidad y se calcula de la siguiente forma:

$$(\text{Desoxirribonucleótidos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de alineación} - \text{Número total de huecos en la alineación})$$

La homología o identidad de secuencia también puede determinarse como el grado de identidad entre las dos secuencias, lo que indica una derivación de la primera secuencia de la segunda. La homología puede determinarse adecuadamente por medio de programas informáticos conocidos en la técnica, tales como GAP, proporcionado en el paquete informático GCG. Por lo tanto, Gap GCGv8 puede utilizarse con la matriz de puntuación por defecto para identidad y para los siguientes parámetros por defecto: La penalización por introducción de huecos de 5,0 y la penalización por extensión de huecos de 0,3, respectivamente para la comparación de secuencias de ácidos nucleicos, y la penalización por introducción de huecos de 3,0 y la penalización por extensión de huecos de 0,1, respectivamente, para la comparación de secuencias de proteínas. GAP utiliza el método de Needleman y Wunsch, (1970), *J. Mol. Biol.* 48, pp. 443-453, para hacer alineaciones y para calcular la identidad.

Puede utilizarse una alineación estructural entre, por ejemplo, Termamyl y una alfa-amilasa para identificar posiciones equivalentes/correspondientes en otras alfa-amilasas. Un método de obtención de dicha alineación estructural es utilizar el programa Pile Up del paquete informático GCG utilizando valores por defecto de penalizaciones por huecos, es decir, una penalización por introducción de huecos de 3,0 y una penalización por extensión de huecos de 0,1. Otros métodos de alineación estructural incluyen el análisis cluster hidrófobo (Gaboriaud y col., (1987), *FEBS LETTERS* 224, p. 149-155) y formación inversa de cadenas (Huber, T; Torda, AE, *PROTEIN SCIENCE* vol. 7, n.º 1 pp. 142-149 (1998). Las propiedades de las alfa-amilasas, es decir, la reactividad inmunológica cruzada, pueden analizarse utilizando un anticuerpo frente a, o reactivo con, al menos un epítipo de la alfa-amilasa de tipo Termamyl relevante. El anticuerpo, que puede ser monoclonal o policlonal, puede producirse mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como describen Hudson y col., *Practical Immunology*, tercera edición (1989), Blackwell Scientific Publications. La reactividad inmunológica cruzada puede determinarse utilizando ensayos conocidos en la técnica, ejemplos de los cuales es el Western blot o la inmunodifusión radial, por ejemplo, según lo descrito por Hudson y col., 1989.

Hibridación

En un aspecto, el polipéptido parental que tiene actividad amilolítica está codificado por un polinucleótido que hibrida en condiciones de restrictividad muy baja, preferiblemente en condiciones de restrictividad baja, más preferiblemente condiciones de restrictividad media, más preferiblemente en condiciones de restrictividad media-alta, aún más preferiblemente en condiciones de restrictividad alta, y con máxima preferencia en condiciones de restrictividad muy alta con (i) la secuencia codificante de polipéptido maduro de id. de sec. n.º 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 o 25; (ii) la secuencia de ADN genómico que comprende la secuencia codificante de polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 1, (iii) una subsecuencia de (i) o (ii), o (iv) una cadena complementaria de longitud completa de (i), (ii) o (iii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor, New York). La subsecuencia puede codificar un fragmento de polipéptido que tiene actividad amilolítica. En un aspecto, la cadena complementaria es la cadena complementaria de longitud completa de la secuencia codificante de polipéptido maduro de id. de sec. n.º 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 o 25.

Puede prepararse adecuadamente una sonda de oligonucleótidos utilizada en la caracterización de la alfa-amilasa según la propiedad deseada, que puede ser la actividad alfa-amilasa sobre la base de la lámina o de la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos parcial de la alfa-amilasa en cuestión.

Las condiciones adecuadas para ensayar la hibridación implican remojar previamente en 5xSSC (citrato sódico estándar, 1 x SSC corresponde a NaCl 0,1650 M) y prehibridar durante 1 h a ~40 °C en una solución de formamida al 20 %, solución de Denhardt 5x fosfato sódico 50 mM, pH 6,8, y 50 mg de ADN de timo de ternera sonificado desnaturalizado, seguido de hibridación en la misma solución suplementada con ATP (adenosín trifosfato) 100 mM durante 18 horas a ~40 °C, seguido de lavado del filtro tres veces en 2xSSC, SDS al 0,2 % (dodecilsulfato sódico) durante 30 minutos a 40 °C (restrictividad baja), preferiblemente a 50 °C (restrictividad media), más preferiblemente al 65 °C (restrictividad alta), aún más preferiblemente a ~75 °C (restrictividad muy alta). Pueden verse más detalles sobre el método de hibridación en Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor, 1989.

En el presente contexto, "obtenida de" indica no solamente a una alfa-amilasa producida o que puede producirse por medio del organismo en cuestión, sino también a una alfa-proteína codificada por una secuencia de ADN aislada a partir de dicha cepa y producida en un organismo hospedador transformado con dicha secuencia de ADN. Por último, el término se refiere a una alfa-amilasa, codificada por una secuencia de ADN de origen sintético y/o de ADNc y que tiene las características de identificación de la alfa-amilasa en cuestión. El término también indica que la alfa-amilasa parental puede ser una variante de una alfa-amilasa de origen natural, es decir, una variante, que es el resultado de una modificación (inserción, sustitución, delección) de uno o más residuos de aminoácidos de la alfa-amilasa de origen natural.

Métodos de preparación de variantes de alfa-amilasa

En la técnica se conocen varios métodos de introducción de mutaciones en genes. Después de una breve descripción de la clonación de secuencias de ADN que codifican alfa-amilasa, se describirán los métodos para generar mutaciones en sitios específicos dentro de la secuencia codificante de alfa-amilasa.

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

La secuencia de ADN que codifica una alfa-amilasa parental puede aislarse de cualquier célula o microorganismo que produzca la alfa-amilasa en cuestión, utilizando diversos métodos bien conocidos en la técnica. Primero, debe construirse una genoteca de ADN genómico y/o ADNc utilizando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la alfa-amilasa a estudiar. Seguidamente, si la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa es conocida, pueden sintetizarse sondas de oligonucleótidos conocidas, homólogas y marcadas para identificar clones que codifican la alfa-amilasa de una genoteca preparada a partir del organismo en cuestión. De forma alternativa, podría utilizarse una sonda de oligonucleótidos marcada que contenga secuencias homólogas a un gen de alfa-amilasa conocido como sonda para identificar clones que codifican alfa-amilasa, utilizando condiciones de hibridación y lavado de baja restrictividad.

Otro método para identificar clones que codifican alfa-amilasa implicaría la inserción de fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformar las bacterias alfa-amilas-negativas con la genoteca de ADN resultante y a continuación colocar las bacterias transformadas en agar que contiene un sustrato para alfa-amilasa, permitiendo de este modo identificar los clones que expresen la alfa-amilasa.

De forma alternativa, la secuencia de ADN que codifica la enzima puede prepararse sintéticamente mediante métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de fosforoamidita descrito por S.L. Beaucage y M.H. Caruthers, (1981) *Tetrahedron Letters* 22: 1859 o el método descrito por Matthes y col. (1984), *EMBO J.* 3 801 - 805. En el método de la fosforoamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador automático de ADN, se purifican, aparean, ligan y clonan en vectores adecuados.

Por último, la secuencia de ADN puede ser de origen genómico y sintético mixto, de origen sintético y ADNc mixto o de origen genómico y de ADNc mixto, preparada ligando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según proceda, los fragmentos que corresponden a varias partes de la secuencia completa de ADN), según

técnicas estándar. La secuencia de ADN también puede prepararse mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando iniciadores específicos, por ejemplo, como se describe en la patente US-4.683.202 o en R.K. Isolauri y col. (1988), Science vol. 239. 4839 pp. 487-491.

5 Mutagénesis dirigida al sitio

Una vez se ha aislado una secuencia de ADN que codifica para alfa-amilasa, y se han identificado sitios deseables de mutación, pueden introducirse mutaciones utilizando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados; los nucleótidos mutantes se insertan durante la síntesis de oligonucleótidos. En un método específico, se crea un hueco monocatenario de ADN, que puentea la secuencia codificante de alfa-amilasa, en un vector que lleva el gen de alfa-amilasa. A continuación, el nucleótido sintético que contiene la mutación deseada, se aparea con una parte homóloga del ADN monocatenario. El hueco restante se rellena a continuación con ADN polimerasa I (fragmento Klenow) y el constructo se liga utilizando T4 ligasa. Un ejemplo específico de este método se describe en Morinaga y col. 1984 Biotechnology 2, pp. 636-639. En la US-4.760.025 se describe la introducción de oligonucleótidos que codifican múltiples mutaciones llevando a cabo alteraciones menores del casete. Sin embargo, puede introducirse una variedad aún mayor de mutaciones en cualquier momento mediante el método de Morinaga, debido a que puede introducirse una multitud de oligonucleótidos de diversas longitudes.

Otro método de introducción de mutaciones en las secuencias de ADN que codifican alfa-amilasa se describe en Nelson y Long (1989). Esto implica la generación en 3 etapas de un fragmento de PCR que contiene la mutación deseada introducida utilizando una cadena de ADN sintetizada químicamente como uno de los iniciadores en las reacciones de PCR. A partir del fragmento generado mediante PCR, puede aislarse un fragmento de ADN que lleva la mutación con el corte con endonucleasas de restricción y su reinserción en un plásmido de expresión.

25 Mutagénesis al azar

La mutagénesis al azar se realiza adecuadamente como mutagénesis al azar localizada o específica de región en al menos tres partes del gen que se traduce a la secuencia de aminoácidos mostrada en cuestión, o dentro del gen completo.

La mutagénesis al azar de una secuencia de ADN que codifica una alfa-amilasa parental puede realizarse convenientemente mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica.

En relación con lo anterior, un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para generar una variante de una alfa-amilasa parental, por ejemplo, en donde la variante presenta una afinidad de almidón alterada con respecto a la parental, comprendiendo el método:

(a) someter a mutagénesis al azar una secuencia de ADN que codifica la alfa-amilasa parental,

(b) expresar la secuencia de ADN mutada obtenida en la etapa (a) en una célula huésped, y

(c) analizar las células huésped que expresan una variante de alfa-amilasa que tiene una afinidad al almidón alterada con respecto a la alfa-amilasa parental.

La etapa (a) del método anterior de la invención preferiblemente se lleva a cabo usando iniciadores dopados. Por ejemplo, la mutagénesis al azar puede realizarse mediante el uso de un agente de mutagénesis físico o químico, mediante el uso de un oligonucleótido adecuado, o sometiendo la secuencia de ADN a mutagénesis generada por PCR. Además, la mutagénesis al azar puede realizarse mediante el uso de cualquier combinación de estos agentes mutágenos. El agente mutágeno puede ser, por ejemplo, un agente que induce transiciones, transversiones, inversiones, mezclado, deleciones y/o inserciones.

Ejemplos de un agente mutágeno físico o químico adecuado para el presente propósito incluyen irradiación ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), O-metil-hidroxilamina, ácido nitroso, etil metano sulfonato (EMS), bisulfito sódico, ácido fórmico y análogos de nucleótidos. Cuando se utilizan dichos agentes, la mutagénesis se realiza, de forma típica, incubando la secuencia de ADN que codifica la enzima parental a mutagenizar en presencia del agente mutágeno elegido en condiciones adecuadas para que se produzca la mutagénesis, y seleccionando el ADN mutado que tenga las propiedades deseadas. Cuando la mutagénesis se realiza mediante el uso de un oligonucleótido, el oligonucleótido puede doparse o suplementarse con los tres nucleótidos no parentales durante la síntesis del oligonucleótido en las posiciones que deben cambiarse. El dopado o la suplementación puede hacerse de modo que se eviten los codones para aminoácidos no deseados. El oligonucleótido dopado o suplementado puede incorporarse al ADN que codifica la enzima alfa-amilasa mediante cualquier técnica publicada, por ejemplo, utilizando PCR, LCR o cualquier ADN polimerasa y ligasa, según se considere apropiado. Preferiblemente, el dopado se lleva a cabo utilizando "dopado aleatorio constante", en el que se predefine el porcentaje de la cepa natural y de la mutación en cada posición. Además, el dopado puede dirigirse a una preferencia por la introducción de determinados nucleótidos y, de este modo, una preferencia por la introducción de uno o más residuos de aminoácidos específicos. El dopado puede hacerse, por ejemplo, para permitir la introducción de 90 % de la cepa natural y 10 % de mutaciones en cada posición. Una consideración adicional en

la selección de un esquema de dopado se fundamenta en las restricciones genéticas y estructurales de la proteína. El esquema de dopado puede realizarse utilizando el programa DOPE que, entre otras cosas, asegura que se evite la introducción de codones de terminación. Cuando se utiliza la mutagénesis generada por PCR, se somete a PCR bien un gen tratado químicamente o bien no tratado que codifica para una alfa-amilasa parental en condiciones que aumentan la incorporación errónea de nucleótidos (Deshler 1992, Genetic Analysis: Biomolecular Engineering, 9(4), pp. 103-106; Leung y col., 1989 Technique, vol.1, pp. 11-15). A mutator strain of *E. coli* (Fowler y col., 1974, Molec. Gen. Genet., 133, p. 179 - 191), *S. cerevisiae* o cualquier otro organismo microbiano puede utilizarse para la mutagénesis al azar del ADN que codifica la alfa-amilasa mediante, por ejemplo, transformación de un plásmido que contiene la glicosidasa parental en la cepa mutante, haciendo crecer la cepa mutante con el plásmido y aislando el plásmido mutado de la cepa mutante. El plásmido mutado puede transformarse posteriormente en el organismo de expresión. La secuencia de ADN que se someterá a mutagénesis puede estar presente convenientemente en una genoteca o biblioteca de ADNc preparada a partir de un organismo que expresa la alfa-amilasa parental. De forma alternativa, la secuencia de ADN puede estar presente en un vector adecuado tal como un plásmido o un bacteriófago, que como tal puede ser incubado con, o exponerse de otro modo al, agente mutágeno. El DNA que va a mutagenizarse también puede estar presente en una célula huésped estando integrado en el genoma de dicha célula o estando presente en un vector de la célula. Por último, el ADN a mutagenizar puede estar en forma aislada. Se entenderá que la secuencia de ADN que se someterá a mutagénesis al azar es, preferiblemente, un ADNc o una secuencia de ADN genómico. En algunos casos puede ser conveniente amplificar la secuencia de ADN mutada antes de llevar a cabo la etapa de expresión b) o la etapa de análisis c). Dicha amplificación puede realizarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, siendo el método actualmente preferido la amplificación generada por PCR utilizando iniciadores de oligonucleótidos preparados sobre la base de la secuencia de ADN o aminoácidos de la enzima parental. Después de la incubación con, o de la exposición al, agente de mutagénesis, el ADN mutado se expresa cultivando una célula huésped adecuada que lleva la secuencia de ADN en condiciones que permiten que se produzca la expresión. La célula huésped utilizada para este propósito puede ser una que se haya transformado con la secuencia de ADN mutada, opcionalmente presente en un vector, o una que llevara la secuencia de ADN que codifica la enzima parental durante el tratamiento de mutagénesis. Ejemplos de las células huésped adecuadas son las siguientes: bacterias grampositivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; y bacterias gramnegativas, tales como *E. coli*. La secuencia de ADN mutada puede comprender también una secuencia de ADN que codifica funciones que permiten la expresión de la secuencia de ADN mutada.

Mutagénesis al azar localizada

La mutagénesis al azar puede localizarse favorablemente en una parte de la alfa-amilasa parental en cuestión. Esto puede, por ejemplo, ser ventajoso cuando determinadas regiones de la enzima se han identificado como especialmente importantes para una determinada propiedad de la enzima, y al modificarla se espera que dé lugar a una variante con propiedades mejoradas. Dichas regiones pueden identificarse, normalmente, cuando se ha dilucidado la estructura terciaria de la enzima parental y se relaciona con la función de la enzima.

La mutagénesis al azar localizada o específica de región se lleva a cabo de forma conveniente mediante el uso de técnicas de mutagénesis generada por PCR como se ha descrito anteriormente o cualquier otra técnica adecuada conocida en la técnica. De forma alternativa, la secuencia de ADN que codifica la parte de la secuencia de ADN a modificar puede aislarse, por ejemplo, mediante inserción en un vector adecuado, y dicha parte puede someterse posteriormente a mutagénesis mediante el uso de cualquiera de los métodos de mutagénesis descritos anteriormente.

Métodos alternativos para proporcionar variantes de alfa-amilasa

Métodos alternativos para proporcionar variantes de la invención incluyen el método de transposición de genes conocido en la técnica, incluidos los métodos, por ejemplo, descritos en WO 95/22625 (de Affymax Technologies N.V.) y WO 96/00343 (de Novo Nordisk A/S).

Expresión de variantes de alfa-amilasa

Según la invención, una secuencia de ADN que codifica la variante producida mediante los métodos descritos anteriormente, o mediante cualquier método alternativo conocido en la técnica, puede expresarse, en forma de enzima, utilizando un vector de expresión que incluye de forma típica secuencias de control que codifican un promotor, operador, sitio de unión a ribosoma, señal de inicio de la traducción, y, opcionalmente, un gen represor o diversos genes activadores.

El vector de expresión recombinante que lleva la secuencia de ADN que codifica una variante de alfa-amilasa de la invención puede ser cualquier vector que pueda someterse adecuadamente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá con frecuencia de la célula huésped en la que vaya a introducirse. Por lo tanto, el vector puede ser un vector que se replica de forma autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un bacteriófago o un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. De forma alternativa, el vector puede ser uno que, cuando es introducido en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el (los) cromosoma(s) en el (los) que ha sido integrado.

En el vector, la secuencia de ADN debe estar operativamente conectada a una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped elegida y puede obtenerse de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas para la célula huésped. Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN que codifica una variante de alfa-amilasa de la invención, especialmente en un huésped bacteriano, son el promotor del operón *lac* de *E. coli*, promotores del gen *dagA* de agarasa de *Streptomyces avermitilis*, los promotores del gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, los promotores del gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, los promotores de la alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, los promotores de los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, etc. Para la transcripción en un huésped fúngico, son ejemplos de promotores útiles los obtenidos del gen que codifica la TAKA amilasa de *A. oryzae*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la alfa-amilasa neutra de *A. niger*, la alfa-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*.

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

El vector puede también comprender una secuencia de ADN que permita que el vector se replique en la célula huésped en cuestión. Ejemplos de tales secuencias son los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

El vector puede comprender también un marcador seleccionable, por ejemplo, un gen cuyo producto complemente un defecto en la célula huésped, como los genes *dal* de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, o uno que confiera resistencia a antibióticos como los de resistencia a ampicilina, canamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Además, el vector puede comprender marcadores de selección de *Aspergillus* tales como *amdS*, *argB*, *niaD* y *sC*, un marcador que genera la resistencia a la higromicina o la selección puede lograrse mediante cotransformación, por ejemplo, como se describe en WO 91/17243.

Aunque la expresión intracelular puede ser ventajosa en algunos aspectos, por ejemplo, cuando se usan determinadas bacterias como células huésped, generalmente se prefiere que la expresión sea extracelular. En general, las alfa-amilasas de *Bacillus* mencionadas en la presente memoria comprenden una prerregión que permite la secreción de la proteasa expresada en el medio de cultivo. Si se desea, esta prerregión puede reemplazarse por una prerregión o secuencia de señal distinta convenientemente obtenida mediante la sustitución de las secuencias de ADN que codifican las prerregiones respectivas.

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

Una célula que comprende un constructo de ADN o un vector de expresión como se ha definido anteriormente, se utiliza, de forma ventajosa, como célula huésped en la producción recombinante de una variante de alfa-amilasa para su uso en la invención. La célula puede transformarse convenientemente con el constructo de ADN de la presente invención, que codifica la variante, mediante la integración del constructo de ADN (en una o más copias) en el cromosoma del huésped. De forma general, se considera que esta integración es una ventaja ya que es más probable que la secuencia de ADN se mantenga en la célula de forma estable. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped puede llevarse a cabo según métodos convencionales, por ejemplo, por recombinación homóloga o heteróloga. De forma alternativa, la célula puede transformarse con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente en relación con los diferentes tipos de células huésped.

La célula puede ser una célula de un organismo superior, tal como un mamífero o un insecto, pero preferiblemente es una célula microbiana, por ejemplo, una célula bacteriana o fúngica (incluidas levaduras).

Ejemplos de bacterias adecuadas son bacterias grampositivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, o *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*, o bacterias gramnegativas, tales como *E. coli*. La transformación de las bacterias puede realizarse, por ejemplo, mediante transformación de protoplastos o mediante el uso de células competentes de una manera conocida *per se*.

El organismo de levadura puede seleccionarse favorablemente de una especie de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. El hongo filamentoso puede pertenecer ventajosamente a una especie de *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*. Las células fúngicas pueden transformarse mediante un proceso que implica la formación de protoplastos y la transformación

de los protoplastos seguida de la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Un procedimiento adecuado para la transformación de células huésped de *Aspergillus* se describe en EP 238 023.

5 Un método adecuado para producir una variante de alfa-amilasa para su uso en la invención comprende cultivar una célula huésped del modo anteriormente descrito en condiciones favorables para la producción de la variante y recuperar la variante de las células y/o medio de cultivo.

10 El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para cultivar la célula huésped en cuestión y obtener la expresión de la variante de alfa-amilasa de la invención. Los medios adecuados son comercializados por proveedores comerciales o pueden prepararse según recetas publicadas (p. ej., como se describe en los catálogos de la American Type Culture Collection).

15 La variante de alfa-amilasa secretada de las células huésped puede recuperarse convenientemente del medio de cultivo por medio de procedimientos bien conocidos que incluyen separar las células del medio por centrifugación o filtración, y precipitar los componentes proteicos del medio mediante una sal como el sulfato amónico, seguido del uso de procedimientos cromatográficos, como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o similares.

Convenciones para la designación de variantes

20 Utilizando el sistema de numeración procedente de la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa descrita en la id. de sec. n.º: 6 alineada con la secuencia de aminoácidos de una serie de otras alfa-amilasas, es posible indicar la posición de un residuo de aminoácido en una alfa-amilasa en regiones de homología estructural.

25 En la descripción de las diversas variantes de alfa-amilasa de la presente invención, la nomenclatura que se describe más adelante se ha adaptado para facilitar su consulta. En todos los casos, se emplea la abreviatura de aminoácidos de una sola letra o en triplete aceptada por la IUPAC.

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

Aminoácido(s) original(es): posición (es): del (de los) aminoácido(s) sustituido(s).

35 Según esta nomenclatura, por ejemplo, la sustitución de alanina por asparagina en la posición 30 se muestra como:

Ala30Asn o A30N

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

40 Ala30* o A30*

y la inserción de un residuo de aminoácido adicional después de la posición 30, tal como lisina, se muestra como:

45 Ala30AlaLys o A30AK

Una delección de una secuencia consecutiva de residuos de aminoácidos, como los residuos de aminoácidos 30-33, se indica como (30-33)* o Δ(A30-N33). La delección de un solo residuo de aminoácido puede describirse simplemente como 30*.

50 Cuando una alfa-amilasa específica contiene una “delección” en comparación con otras alfa-amilasas y se hace una inserción en dicha posición, esto se indica como:

*36Asp o *36D

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

Las mutaciones múltiples pueden separarse por signos más o con un espacio, es decir:

60 Ala30Asn + Glu34Ser o A30N+E34S

Ala30Asn Glu34Ser o A30NE34S

que representan mutaciones en las posiciones 30 y 34 que sustituyen alanina y ácido glutámico por asparagina y serina, respectivamente.

65 De forma alternativa, pueden separarse múltiples mutaciones por comas o puntos y coma, es decir:

Ala30Asn, Glu34Ser o A30N, E34S

Las mutaciones múltiples aún más simplificadas pueden separarse mediante un espacio, por ejemplo,

Ala30Asn Glu34Ser o A30N E34S

De forma alternativa, las múltiples mutaciones pueden separarse mediante comas o puntos y coma.

Cuando uno o más residuos de aminoácidos alternativos pueden insertarse en una posición determinada, se indica como A30N,E o

A30N o A30E

De forma alternativa, uno o más residuos de aminoácidos alternativos pueden insertarse en una posición determinada; se indica como:

A30 [N, E] o A30 [N E], alternativamente A30 {N, E} o A30 (N E)

Para mayor simplicidad, el aminoácido alternativo que podría sustituirse en una determinada posición puede indicarse como:

A30 N, E, H, L o V

Además, cuando una posición adecuada para la modificación se identifica en la presente memoria sin que se sugiera ninguna modificación específica, debe entenderse que cualquier residuo de aminoácido puede sustituirse por el residuo de aminoácido presente en la posición. Por lo tanto, por ejemplo, cuando se menciona una modificación de una alanina en la posición 30, pero no se especifica, debe entenderse que la alanina puede eliminarse o sustituirse por cualquier otro aminoácido, es decir, cualquiera de:

R,N,D,A,C,Q,E,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V.

Además, “A30X” significa cualquiera de las siguientes sustituciones:

A30R, A30N, A30D, A30C, A30Q, A30E, A30G, A30H, A30I, A30L, A30K, A30M, A30F, A30P, A30S, A30T, A30W, A30Y, o A30 V; de forma abreviada: A30R,N,D,C,Q,E,G,H,I,L,K,M,F,P,S,T,W,Y,V.

O, por ejemplo, A30 [R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y, V]

El experto en la técnica sabría que utilizar una numeración, por ejemplo, según la id. de sec. n.º 6 significa utilizar id. de sec. n.º para contrarrestar, no que la parental sea necesariamente id. de sec. n.º 6 sino simplemente que las posiciones a alterar se definen según la id. de sec. n.º 6. Por lo tanto, otra forma de describir las sustituciones específicas es indicar el aminoácido que se va a alterar con una X. Por lo tanto, X30N significa que cualquier aminoácido presente en la posición 30 podría sustituirse por N indicando que puede utilizarse una alfa-amilasa distinta como alfa-amilasa parental.

Por lo tanto, la nomenclatura “X30N” o “X30V” significa que cualquier aminoácido que puede estar en la posición 30 en la alfa-amilasa parental está sustituido por una asparagina o una valina.

Características de residuos de aminoácidos

Aminoácidos cargados:

Asp, Glu, Arg, Lys, His

Aminoácidos cargados negativamente (con el residuo más negativo primero):

Asp, Glu

Aminoácidos cargados positivamente (con el residuo más positivo primero):

Arg, Lys, His

Aminoácidos neutros:

Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Met, Cys, Asn, Gin, Ser, Thr, Pro

Residuos de aminoácidos hidrófobos (con el residuo más hidrófobo indicado en último lugar):

5 Gly, Ala, Val, Pro, Met, Leu, Ile, Tyr, Phe, Trp,

Aminoácidos hidrófobos (con el residuo más hidrófobo indicado en último lugar):

10 Thr, Ser, Cys, Gin, Asn

Esta nomenclatura es particularmente relevante para las modificaciones que implican sustituir, insertar o eliminar residuos de aminoácidos que tienen propiedades comunes específicas. Dichas modificaciones se mencionan como modificación o modificaciones conservadoras de aminoácidos. Hay ejemplos de modificaciones conservadoras dentro del grupo de los aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), de los aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), de los aminoácidos polares (glutamina y asparagina), de los aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y de los aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las modificaciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica son conocidas en la técnica y han sido descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, En, *The Proteins*, Academic Press, New York. Los intercambios que tienen lugar con más frecuencia son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly y los inversos (Taylor, 1986, *Journal of Theoretical Biology* 119: 205-218.

Variantes útiles en la invención

25 Las variantes tienen actividad amilolítica y al menos un 70 % de identidad con la id. de sec. n.º 6 y comprenden al menos una, al menos dos o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y además comprenden una sustitución en las posiciones 195, 206 y 243, en donde la numeración corresponde al polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6, es decir, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6. Los inventores han descubierto que dichas alteraciones proporcionan variantes que tienen una mayor estabilidad en composiciones que comprenden un agente quelante, especialmente cuando los agentes quelantes son capaces de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 9,5 mM, preferiblemente inferior a 9,0 mM, preferiblemente inferior a 8,5 mM, preferiblemente inferior a 8,0 mM, preferiblemente inferior a 7,5 mM, preferiblemente inferior a 7,0 mM, preferiblemente inferior a 6,5 mM, preferiblemente inferior a 6,0 mM, preferiblemente inferior a 5,5 mM, preferiblemente inferior a 5,0 mM, preferiblemente inferior a 4,5 mM, inferior a 4,0 mM, preferiblemente inferior a 3,5 mM, preferiblemente inferior a 3,0 mM, preferiblemente inferior a 2,5 mM, preferiblemente inferior a 2,0 mM, preferiblemente inferior a 1,5 mM o preferiblemente inferior a 1 mM, cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe más adelante en "Materiales y Métodos".

40 La variante como la de los hallazgos de la variante de la reivindicación 1 comprende una sustitución en la posición 195 y además en la posición 206 y 243 del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6. Los términos "utilizando la numeración según" o "que corresponde a" se refieren al sistema de numeración utilizado en la presente solicitud, y las dos expresiones se utilizan indistintamente en la solicitud. Por lo tanto, la posición 195 es el aminoácido correspondiente a la posición 195 en la id. de sec. n.º 6. Por lo tanto se entenderá que de este modo se abarcan las variantes de otras alfa-amilasas parentales modificadas en la posición o posiciones equivalentes (según se determina a partir de la mejor alineación posible de secuencia de aminoácidos entre las respectivas secuencias de aminoácidos). Cuando hay deleciones, la contabilización se realiza como si no hubiera deleciones presentes.

50 En una realización especialmente preferida, la composición comprende una variante, variante que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y además una alteración en una o más o una o varias posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 234 que comprende una sustitución en la posición 195 y además en las posiciones 206 y 243, y preferiblemente una alteración en una o más posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458 (utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6).

55 En un aspecto de la presente invención la composición limpiadora comprende una variante de una alfa-amilasa parental que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y además comprende una sustitución en una o más, o una o varias, posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243, que comprende una sustitución en la posición 195 y además en las posiciones 206 y 243 utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6, y en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad de al menos 75 %, preferiblemente al menos 80 %, preferiblemente al menos 81 %, preferiblemente al menos 82 %, preferiblemente al menos 83 %, preferiblemente al menos 84 %, preferiblemente al menos 85 %, preferiblemente al menos 86 %, preferiblemente al menos 87 %, preferiblemente al menos 88 %, preferiblemente al menos 89 %, de forma especialmente preferible al menos 90 %, preferiblemente al menos 91 %, preferiblemente al menos 92 %, preferiblemente al menos 93 %, preferiblemente al menos 94 %, preferiblemente al menos 95 %, preferiblemente al

menos 96 %, preferiblemente al menos 97 %, preferiblemente al menos 98 %, preferiblemente al menos 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa parental, que puede ser cualquiera de las secuencias con la id. de sec. n.º: 6 y en donde la variante tiene al menos 70 % de actividad residual, preferiblemente al menos 75 % de actividad residual, preferiblemente al menos 80 % de actividad residual, preferiblemente al menos 85 % de actividad residual, preferiblemente al menos 90 % de actividad residual, preferiblemente al menos 95 % de actividad residual, preferiblemente al menos 100 % de actividad residual, preferiblemente al menos 105 % de actividad residual, preferiblemente al menos 110 % de actividad residual, o tiene una actividad residual que es al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 pp mejor en comparación con la actividad residual de la alfa-amilasa parental, cuando la actividad residual se determina al cabo de 18 horas a pH 8 y 31 °C como se describe en el ensayo de EnzChek o PNP-G7 (véanse los detalles más adelante en “Materiales y Métodos”) en presencia de un agente quelante en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe a continuación.

La alfa-amilasa parental se modifica por una sustitución en la posición 195 y además en las posiciones 206 y 243, y las sustituciones son preferiblemente las siguientes sustituciones: 193 es [G,A,S,T o M]; la posición 195 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 197 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 198 es [Q o N]; la posición 200 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 203 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 206 es [F,W,Y,N,L,I,V o H]; la posición 210 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 212 es [F,W,Y,L,I o V] o la posición 213 es [G,A,S,T o M] en donde las posiciones corresponden a la posición del polipéptido maduro con id. de sec. n.º 6. La composición según la invención comprende preferiblemente una variante de alfa-amilasa en donde la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y en donde la alfa-amilasa parental se modifica adicionalmente comprendiendo una sustitución en la posición 195 y además en las posiciones 206 y 243 mediante al menos una de las siguientes sustituciones: 193 es [G,A,S,T o M]; la posición 195 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 197 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 198 es [Q o N]; la posición 200 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 203 es [F,W,Y,L,I o V]; la posición 206 es [F,W,Y,N,L,I o V, H]; la posición 210 es [F,W,Y,L,I o V]; posición 212 es [F,W,Y,L,I o V] o la posición 213 es [G,A,S,T o M] en donde las posiciones corresponden a la posición del polipéptido maduro con id. de sec. n.º 6 y que comprende además al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM al medirla a 21 °C y pH 8,0, como se describe en “Materiales y Métodos”.

En particular, la invención se refiere a una composición que comprende una alfa-amilasa en donde la secuencia de aminoácidos se modifica mediante una sustitución en la posición 195 y además en la posición 206 y/o 243, y en donde al menos una de las siguientes sustituciones: 193 es T; la posición 195 es F o Y; la posición 197 es F o L; la posición 198 es N; la posición 200 es F; la posición 203 es F; la posición 206 es F, L o Y; la posición 210 es Y; la posición 212 es V; la posición 213 es A, en donde las posiciones corresponden a la posición del polipéptido maduro con id. de sec. n.º 6 y que comprende además al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM al medirla a 21 °C y pH 8,0, como se describe en “Materiales y Métodos”.

En otro aspecto, la composición comprende una variante de alfa-amilasa, en donde dicha variante comprende una sustitución en dos o más, o dos o varias, posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243, que comprenden una sustitución en la posición 195 y además en las posiciones 206 y 243, en donde las posiciones corresponden a las posiciones del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º: 6, y que comprende además al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe en la sección “Materiales y Métodos”.

En otro aspecto, la composición comprende una variante de alfa-amilasa, en donde dicha variante comprende al menos dos o más, o al menos tres o más, delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183, o 184 y además comprende una sustitución en dos o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243 que comprenden una sustitución en la posición 195 y además en las posiciones 206 y 243, en donde las posiciones corresponden a las posiciones del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º: 6 y que comprende además al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y a pH 8,0, como se describe en “Materiales y Métodos”, y en donde la variante tiene al menos 70 % de actividad residual, preferiblemente al menos 75 % de actividad residual, preferiblemente al menos 80 % de actividad residual, preferiblemente al menos 85 % de actividad residual, preferiblemente al menos 90 % de actividad residual, preferiblemente al menos 95 % de actividad residual, preferiblemente al menos 100 % de actividad residual, preferiblemente al menos 105 % de actividad residual, preferiblemente al menos 110 % de actividad residual o tiene una actividad residual al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 pp mejor comparada con la actividad residual de la alfa-amilasa parental, cuando la actividad residual se determina al cabo de 18 horas a pH 8 y 31 °C como se describe en el ensayo de EnzChek o PNP-G7 (véanse los detalles más adelante en “Materiales y Métodos”) en presencia de un agente quelante en donde dicho agente quelante, a una concentración inferior a 10 mM, es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe a continuación.

En realizaciones preferidas, las al menos dos delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 se seleccionan del grupo que consiste en 181*+182*, 181*+183*, 182*+ 183*, 181*+184*, 182*+184* y 183*+184*.

En otro aspecto adicional, la composición comprende una variante de alfa-amilasa, en donde la variante comprende al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183, o 184 y además comprende una sustitución en dos o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243 que comprenden una sustitución en la posición 195 y además en las posiciones 206 y 243, en donde las posiciones corresponden a las posiciones del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º: 6 y una alteración en una o más, o una o varias, posiciones correspondientes a posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458 (utilizando la numeración según la id. de sec. n.º: 6), y que comprende además al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe en "Materiales y Métodos".

En un aspecto de la invención, la composición comprende al menos un agente quelante en donde dicho agente quelante, a una concentración inferior a 10 mM, es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0 y una o más, o una o varias, de las siguientes variantes de amilasa; SP722 + D183* G184* N195F V206L Y243F; SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F; AA560 + D183* G184* N195F V206L Y243F; AA560 + D183* G184* N195F V206Y Y243F; AA560+D183* G184* R118K N195F I206L Y243F R320K R458K; SP707 + H183* G184* N195F I206L Y243F; SP707 + H183* G184* N195F I206Y Y243F;

SP690 + H183* G184* N195F V206L Y243F; SP690 + H183* G184* N195F V206Y Y243F;

Otra realización de la invención se refiere a una composición limpiadora, en donde la actividad residual de la variante es al menos 75 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 100 %, tal como al menos 105 %, tal como al menos 110 %, tal como al menos 115 % de actividad residual en comparación con la alfa-amilasa parental en presencia de un agente quelante, en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 9,5 mM, preferiblemente inferior a 9 mM, preferiblemente inferior a 8,5 mM, preferiblemente inferior a 8 mM, preferiblemente inferior a 7,5 mM, preferiblemente inferior a 7 mM, preferiblemente inferior a 6,5 mM, preferiblemente inferior a 6 mM, preferiblemente inferior a 5,5 mM, preferiblemente inferior a 5 mM, preferiblemente inferior a 4,5 mM, inferior a 4 mM, preferiblemente inferior a 3,5 mM, preferiblemente inferior a 3 mM, preferiblemente inferior a 2,5 mM, preferiblemente inferior a 2 mM, preferiblemente inferior a 1,5 mM o preferiblemente inferior a 1 mM, es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe en "Materiales y Métodos" y cuando la actividad residual se determina al cabo de 18 horas a pH 8 a 31 °C como se describe en el ensayo EnzChek o PNP-G7 descrito en "Materiales y Métodos".

Otra realización de la invención se refiere a una composición limpiadora, en donde la actividad residual de la variante es al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 pp mejor comparada con la actividad residual de la alfa-amilasa parental en presencia de un agente quelante, en donde dicho agente quelante, a una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 9,5 mM, preferiblemente inferior a 9 mM, preferiblemente inferior a 8,5 mM, preferiblemente inferior a 8 mM, preferiblemente inferior a 7,5 mM, preferiblemente inferior a 7 mM, preferiblemente inferior a 6,5 mM, preferiblemente inferior a 6 mM, preferiblemente inferior a 5,5 mM, preferiblemente inferior a 5 mM, preferiblemente inferior a 4,5 mM, inferior a 4 mM, preferiblemente inferior a 3,5 mM, preferiblemente inferior a 3 mM, preferiblemente inferior a 2,5 mM, preferiblemente inferior a 2 mM, preferiblemente inferior a 1,5 mM o preferiblemente inferior a 1 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe en "Materiales y Métodos" y cuando la actividad residual se determina al cabo de 18 horas a pH 8 a 31 °C como se describe en el ensayo EnzChek o PNP-G7 descrito en "Materiales y Métodos". La mejora en puntos porcentuales (pp) en la actividad residual de la variante con respecto a la parental se calcula como la diferencia entre la actividad residual de la variante y la de la parental.

Por lo tanto, en un aspecto particular de la invención, la composición comprende un agente quelante seleccionado del grupo que consiste en: agentes quelantes que contienen fósforo, que no contienen fósforo, que contienen carboxilato, que contienen nitrógeno o que no contienen nitrógeno, los agentes quelantes preferidos son EDTA, MGDA, EGTA, DTPA, DTPMP y HEDP y mezclas de los mismos.

La variante de los hallazgos de la reivindicación 1 comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 en donde las posiciones corresponden a las posiciones del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º: 6. En realizaciones preferidas, las al menos dos delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 se seleccionan del grupo que consiste en 181*+182*, 181*+183*, 182*+ 183*, 181*+184*, 182*+184* y 183*+184*.

En otro aspecto preferido de la invención, la variante comprende una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243 que comprende una sustitución en la posición 195 y además en las posiciones 206 y 243, y que comprende además una sustitución en una o más, o una o varias, posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133,

134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458 en donde las posiciones corresponden a las posiciones del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6.

En otro aspecto preferido de la invención, la variante que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183, o 184 y que comprende además una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243 que comprende una sustitución en la posición 195 y además en las posiciones 206 y 243 y preferiblemente comprende una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458 en donde las posiciones corresponden a posiciones del polipéptido maduro de id. de sec. n.º 6.

En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en dos o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213, 235, 243, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434 y 447 y 458 y en donde las posiciones corresponden a las posiciones del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6.

En otro aspecto, la variante que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183, o 184 y además comprende una sustitución en dos o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213, 235, 243, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447 y 458 en donde las posiciones corresponden a las posiciones del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6.

Preferiblemente, las variantes que comprenden alteraciones en una o más de las posiciones arriba identificadas tienen una mayor estabilidad en composiciones que comprenden un agente quelante, tal como un detergente, preferiblemente, en detergente líquido en comparación con la alfa-amilasa parental.

Por lo tanto, las variantes según la invención tienen en una realización preferida una estabilidad mejorada en comparación con su amilasa parental en presencia de uno o más agentes quelantes. En un aspecto preferido, las variantes según la invención tienen una mayor estabilidad en comparación con su amilasa parental en presencia de uno o más agentes quelantes y baja concentración de calcio. En otro aspecto preferido, las variantes según la invención tienen una estabilidad mejorada en comparación con su amilasa parental en presencia de un agente quelante, en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0.

En un aspecto particular, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183, o 184 y comprende además una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243 que comprende una sustitución en la posición 195 y además en las posiciones 206 y 243 y una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 338, 359, 418, 431, 434, 447 y 458 en donde las posiciones corresponden a posiciones del polipéptido maduro de id. de sec. n.º 6 y en donde la variante además tiene al menos 60 %, tal como al menos 65 %, tal como al menos 70 %, tal como al menos 75 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 100 % de actividad residual en presencia de un agente quelante en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 9,5 mM, preferiblemente inferior a 9 mM, preferiblemente inferior a 8,5 mM, preferiblemente inferior a 8 mM, preferiblemente inferior a 7,5 mM, preferiblemente inferior a 7 mM, preferiblemente inferior a 6,5 mM, preferiblemente inferior a 6 mM, preferiblemente inferior a 5,5 mM, preferiblemente inferior a 5 mM, preferiblemente inferior a 4,5 mM, inferior a 4 mM, preferiblemente inferior a 3,5 mM, preferiblemente inferior a 3 mM, preferiblemente inferior a 2,5 mM, preferiblemente inferior a 2 mM, preferiblemente inferior a 1,5 mM o preferiblemente inferior a 1 mM, es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a 21 °C y pH 8,0, como se describe más adelante y cuando la actividad residual se determina al cabo de 18 horas a pH 8, a 31 °C como se describe en el ensayo EnzChek o PNP-G7 descrito en "Materiales y Métodos". En realizaciones preferidas, las al menos dos deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 se seleccionan del grupo que consiste en 181*+182*, 181*+183*, 182*+ 183*, 181*+184*, 182*+184* y 183*+184*.

En otro aspecto particular, la variante comprende una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243 que comprende una sustitución en la posición 195 y además en las posiciones 206 y 243, y que comprende además una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447 y 458 en donde las posiciones corresponden a las posiciones del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6 y en donde la variante además tiene al menos 60 %, tal como al menos 65 %, tal como al menos 70 %, tal como al menos 75 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 100 % de actividad residual o tiene una actividad residual al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 pp mejor en comparación con la actividad residual de la alfa-amilasa parental en presencia de un agente quelante, en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 9,5 mM, preferiblemente inferior a 9 mM, preferiblemente inferior a 8,5 mM, preferiblemente inferior a 8 mM, preferiblemente inferior a 7,5 mM,

preferiblemente inferior a 7 mM, preferiblemente inferior a 6,5 mM, preferiblemente inferior a 6 mM, preferiblemente inferior a 5,5 mM, preferiblemente inferior a 5 mM, preferiblemente inferior a 4,5 mM, inferior a 4 mM, preferiblemente inferior a 3,5 mM, preferiblemente inferior a 3 mM, preferiblemente inferior a 2,5 mM, preferiblemente inferior a 2 mM, preferiblemente inferior a 1,5 mM o preferiblemente inferior a 1 mM, es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a 21 °C y pH 8,0 en presencia de DTPA a 31 °C como se describe en el ensayo EnzChek o PNP-G7 descrito en "Materiales y Métodos".

Las variantes según la invención tienen la ventaja de ser más estables frente a los agentes quelantes fuertes en comparación con su alfa-amilasa parental; sin embargo, al mismo tiempo, han mantenido las propiedades de eficacia de la alfa-amilasa parental tal como la capacidad limpiadora o la capacidad de lavado de vajilla. En una realización preferida, las variantes según la invención tienen la ventaja de ser más estables frente a los agentes quelantes, en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide en cloruro potásico 80 mM y EPPS 49 mM, a 21 °C y pH 8,0, como se describe en "Materiales y Métodos". Estos agentes quelantes preferidos pueden seleccionarse, aunque no de forma restrictiva, de EDTA, MGDA, EGTA, DTPA, DTPMP, HEDP y mezclas de los mismos.

Por lo tanto, las variantes útiles en la invención tienen mayor estabilidad en presencia de agentes quelantes que unen iones metálicos, especialmente iones calcio, en comparación con su alfa-amilasa parental. En los detergentes es común incluir agentes quelantes debido al efecto ventajoso del proceso de lavado, pero la mayor estabilidad también puede ser aparente en condiciones en las cuales está presente el material vegetal que incluye agentes quelantes naturales, tales como fitato o citrato. En particular, un agente quelante fuerte competirá con las alfa-amilasas sensibles al calcio por los iones calcio y, en cierta medida, será capaz de privar a la alfa-amilasa de los iones calcio unidos en su estructura, dando lugar a la reducción de la estabilidad o actividad de la alfa-amilasa.

Por lo tanto, las variantes de la invención tienen una estabilidad y/o actividad mejoradas en presencia de agentes quelantes, tales como EDTA, MGDA, EGTA, DTPA, DTPMP, HEDP y mezclas de los mismos, en comparación con su alfa-amilasa parental.

Además de aumentar la estabilidad frente a los agentes quelantes en relación con la alfa-amilasa parental, las variantes de la presente invención mantienen o mejoran su capacidad limpiadora en comparación con la alfa-amilasa parental. La mejor capacidad limpiadora puede medirse en AMSA o en una prueba de capacidad limpiadora utilizando vasos de precipitados, tal como se describe en "Materiales y Métodos".

Por lo tanto, en una realización particular de la invención la variante tiene al menos 70 % de actividad residual, preferiblemente al menos 75 % de actividad residual, preferiblemente al menos 80 % de actividad residual, preferiblemente al menos 85 % de actividad residual, preferiblemente al menos 90 % de actividad residual, preferiblemente al menos 95 % de actividad residual, o tiene una actividad residual que es al menos 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 pp mejor comparada con la actividad residual de la alfa-amilasa parental, cuando la actividad residual se determina al cabo de 18 horas a pH 8 y 31 °C como se describe en el ensayo EnzChek o PNP-G7 (descrito en "Materiales y Métodos") en presencia de un agente quelante, en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM, es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe a continuación y en donde la variante tiene una capacidad limpiadora al menos 40 %, tal como al menos 50 %, tal como al menos 55 %, tal como al menos 60 %, tal como al menos 65 %, tal como al menos 70 %, tal como al menos 75 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 100 % mejor comparada con la alfa-amilasa parental cuando se mide en AMSA o en un ensayo de la capacidad limpiadora utilizando vasos de precipitados como se describe en "Materiales y Métodos".

En un aspecto preferido de la invención, la composición comprende una variante que tiene al menos 60 %, tal como al menos 65 %, tal como al menos 70 %, tal como al menos 75 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 100 % de actividad residual en comparación con la alfa-amilasa parental en presencia de un agente quelante, en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM, preferiblemente inferior a 9,5 mM, preferiblemente inferior a 9 mM, preferiblemente inferior a 8,5 mM, preferiblemente inferior a 8 mM, preferiblemente inferior a 7,5 mM, preferiblemente inferior a 7 mM, preferiblemente inferior a 6,5 mM, preferiblemente inferior a 6 mM, preferiblemente inferior a 5,5 mM, preferiblemente inferior a 5 mM, preferiblemente inferior a 4,5 mM, inferior a 4 mM, preferiblemente inferior a 3,5 mM, preferiblemente inferior a 3 mM, preferiblemente inferior a 2,5 mM, preferiblemente inferior a 2 mM, preferiblemente inferior a 1,5 mM o preferiblemente inferior a 1 mM, es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0, como se describe en el ejemplo 2a, y cuando la actividad residual se determina al cabo de 18 horas a pH 8, a 31 °C, como se describe en el ensayo EnzChek o PNP-G7 descrito en "Materiales y Métodos".

Por lo tanto, en un aspecto particular de la invención, la composición comprende un agente quelante seleccionado del grupo que consiste en: agentes quelantes que contienen fósforo, que no contienen fósforo, que contienen nitrógeno o que no contienen nitrógeno, los agentes quelantes preferidos son EDTA, MGDA, EGTA, DTPA, DTPMP y HEDP y mezclas de los mismos.

- En un aspecto preferido, las variantes según la invención tienen una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad de al menos 75 %, preferiblemente al menos 80 %, preferiblemente al menos 81 %, preferiblemente al menos 82 %, preferiblemente al menos 83 %, preferiblemente al menos 84 %, preferiblemente al menos 85 %, preferiblemente al menos 86 %, preferiblemente al menos 87 %, preferiblemente al menos 88 %, preferiblemente al menos 89 %, preferiblemente al menos 90 %, preferiblemente al menos 91 %, preferiblemente al menos 92 %, preferiblemente al menos 93 %, preferiblemente al menos 94 %, preferiblemente al menos 95 %, preferiblemente al menos 96 %, preferiblemente al menos 97 %, preferiblemente al menos 98 %, preferiblemente al menos 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa parental, que puede ser cualquiera de las secuencias con id. de sec. n.º 6.
- En un aspecto de la presente invención, las variantes de una alfa-amilasa parental comprenden una sustitución en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243 que comprende una sustitución en la posición 195 y además en las posiciones 206 y 243 utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6, y en donde la variante tiene una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad de al menos 75 %, preferiblemente al menos 80 %, preferiblemente al menos 81 %, preferiblemente al menos 82 %, preferiblemente al menos 83 %, preferiblemente al menos 84 %, preferiblemente al menos 85 %, preferiblemente al menos 86 %, preferiblemente al menos 87 %, preferiblemente al menos 88 %, preferiblemente al menos 89 %, de forma especialmente preferible al menos 90 %, preferiblemente al menos 91 %, preferiblemente al menos 92 %, preferiblemente al menos 93 %, preferiblemente al menos 94 %, preferiblemente al menos 95 %, preferiblemente al menos 96 %, preferiblemente al menos 97 %, preferiblemente al menos 98 %, preferiblemente al menos 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa parental, que puede ser cualquiera de las secuencias con la id. de sec. n.º 6.
- La variante de una alfa-amilasa parental comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende, además, una sustitución en las posiciones 195, 206 y 243, y en un aspecto preferido, la variante comprende una sustitución en la posición 195 con [F, W, Y, L, I o V], en otro aspecto preferido, la variante comprende F en la posición 195, en otro aspecto preferido, la variante comprende la sustitución N195F, en donde la parental es cualquiera de los polipéptidos maduros con id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende Y como una sustitución en la posición 195. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además la sustitución N195Y, en donde la alfa-amilasa parental es cualquiera de los polipéptidos maduros con la id. de sec. n.º 6.
- En un aspecto, la variante de una alfa-amilasa parental comprende una sustitución en la posición 206, en un aspecto preferido la variante comprende una sustitución en la posición 206 con [F, W, Y, N, L, I, V, H, Q, D o E], en otro aspecto preferido la variante comprende F en la posición 206, en otro aspecto preferido, la variante comprende Y en la posición 206, en otro aspecto la variante comprende L en la posición 206, en donde la alfa-amilasa parental es cualquiera de los polipéptidos maduros con la id. de sec. n.º 6.
- En una realización particular, la variante comprende la sustitución V206Y del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6.
- En una realización particular, la variante comprende la sustitución V206F del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6.
- En una realización particular, la variante comprende la sustitución V206L del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6.
- En una realización particular, la variante comprende la sustitución V206H del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6.
- La variante de una alfa-amilasa parental comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en la posición 206, en un aspecto preferido la variante comprende una sustitución en la posición 206 con [F, W, Y, N, L, I, V, H, Q, D o E], en otro aspecto preferido, la variante comprende F en la posición 206, en otro aspecto preferido, la variante comprende Y en la posición 206.
- En una realización particular, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además la sustitución V206Y del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6.
- En una realización particular, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además la sustitución V206L del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6.
- En una realización particular, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además la sustitución V206H del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6.
- La variante de una alfa-amilasa parental comprende una sustitución en la posición 243, en un aspecto preferido la variante comprende una sustitución en la posición 243 con [F, W, Y, L, I o V], en otro aspecto preferido, la variante comprende F en la posición 243, en otro aspecto preferido, la variante comprende la sustitución Y243F, en donde la alfa-amilasa parental es cualquiera de los polipéptidos maduros de id. de sec. n.º 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 o 26, preferiblemente id. de sec. n.º 6.

La variante de una alfa-amilasa parental comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en la posición 243, en un aspecto preferido la variante comprende una sustitución en la posición 243 con [F, W, Y, L, I o V], en otro aspecto preferido, la variante comprende A en la posición 243, en otro aspecto preferido, la variante comprende la sustitución Y243F, en donde la alfa-amilasa parental es cualquiera de los polipéptidos maduros con id. de sec. n.º 6.

En otro aspecto, la variante comprende sustituciones en las posiciones 193 y 195. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones en las posiciones 193 y 195 con [F, W, Y, L, I, V, N, G, A, T, M o Q]. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones T y F en las posiciones 193 y 195, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones S193T + N195F del polipéptido maduro de id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende T e Y como sustituciones en las posiciones 193 y 195, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones S193T + N195Y del polipéptido maduro de id. de sec. n.º: 6.

En otro aspecto la variante de una alfa-amilasa parental comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 193 y 195. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 193 y 195 con [F, W, Y, L, I, V, N, G, A, T, M o Q]. En otro aspecto, la variante comprende T y F como sustituciones en las posiciones 193 y 195, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones S193T + N195 del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende T e Y como sustituciones en las posiciones 193 y 195, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones S193T + N195 del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6.

En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa parental comprende una sustitución en las posiciones 195 y 198, utilizando la numeración de la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en las posiciones 195 y 198 con [F, W, Y, L, I, V, N o Q]. En otro aspecto, la variante comprende F y N como sustituciones en las posiciones 195 y 198, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195F + Y198N, en donde la parental es cualquiera de los polipéptidos maduros de id. de sec. n.º: 6, 8, 10 o 12. En otro aspecto, la variante comprende Y y N como sustituciones en las posiciones 195 y 198, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195Y + Y198N, en donde la alfa-amilasa parental es cualquiera de los polipéptidos maduros con id. de sec. n.º 6.

En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa parental comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además una sustitución en las posiciones 195 y 198, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195 y 198 con [F, W, Y, L, I, V, N o Q]. En otro aspecto, la variante comprende F y N como sustituciones en las posiciones 195 y 198, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195F + Y198N, en donde la parental es cualquiera de los polipéptidos maduros con la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende Y y N como sustituciones en las posiciones 195 y 198, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195Y + Y198N, en donde la alfa-amilasa parental es cualquiera de los polipéptidos maduros con la id. de sec. n.º 6.

La variante de una alfa-amilasa parental comprende una sustitución en las posiciones 195 y 206, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en las posiciones 195 y 206 con [F, W, Y, V, I, L, C, N, S, T, D, E o H]. En otro aspecto, la variante comprende F y L como sustituciones en las posiciones 195 y 206, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195F + V206 [F, Y, L, H o N] del polipéptido maduro de id. de sec. n.º: 6 o 12. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195F + I206 [F, Y, L o H] del polipéptido maduro de id. de sec. n.º: 8 o 10. En otro aspecto, la variante comprende Y y L como sustituciones en 195 y 206, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195Y + V206 [F, Y, L, H o N] del polipéptido maduro de id. de sec. n.º: 6.

La variante de una alfa-amilasa parental comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195 y 206, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195 y 206 con [F, W, Y, V, I, L, C, N, S, T, D, E o H]. En otro aspecto, la variante comprende F y L como sustituciones en 195 y 206, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195F + V206 [F o Y] del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende Y y L como sustituciones en las posiciones 195 y 206, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al

menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195Y + V206 [F, Y, L, H o N] del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6.

En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa parental comprende una sustitución en las posiciones 195 y 210, utilizando la numeración de la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en las posiciones 195 y 210 con [F, W, Y, V, I, L, C, N, S, T o H]. En otro aspecto, la variante comprende F y Y como sustituciones en 195 y 210, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195F + H210Y, en donde la parental es cualquiera de los polipéptidos maduros de id. de sec. n.º: 6. En otro aspecto, la variante comprende Y como sustitución en las posiciones 195 y 210. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195Y + H210Y, en donde la alfa-amilasa parental es cualquiera de los polipéptidos maduros con id. de sec. n.º 6.

En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa parental comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195 y 210, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195 y 210 con [F, W, Y, V, I, L, C, N, S, T, o H]. En otro aspecto, la variante comprende F y Y como sustituciones en 195 y 210, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195F + H210Y, en donde la alfa-amilasa parental es cualquiera de los polipéptidos maduros con la id. de sec. n.º 6, 8, 10, 12, 18 o 22, preferiblemente, id. de sec. n.º: 6, 8, 10 o 12. En otro aspecto, la variante comprende Y como sustitución en las posiciones correspondientes a las posiciones 195 y 210. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195Y + H210Y, en donde la alfa-amilasa parental es cualquiera de los polipéptidos maduros con la id. de sec. n.º 6.

En otro aspecto, la alfa-amilasa parental variante comprende sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 198 y 206, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones en las posiciones 198 y 206 con [N, Q, L, I, F, Y, C, N, S, T, D, E o H]. En otro aspecto, la variante comprende N y [F o Y] como sustituciones en las posiciones 198 y 206, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones Y198N + V206 [F, Y, L, H o N] del polipéptido maduro de id. de sec. n.º: 6.

En otro aspecto, la alfa-amilasa parental variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 198 y 206, utilizando la numeración según id. de sec. n.º 6. En otro aspecto la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 198 y 206 con [N, Q, L, I, F, Y, C, N, S, T, D, E o H]. En otro aspecto, la variante comprende N y [F o Y] como sustituciones en las posiciones 198 y 206, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones Y198N + V206 [F, Y, L, H o N] del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º.

En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa parental comprende sustituciones en las posiciones 206 y 213, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6.

En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en las posiciones 206 y 213 con [D, E, L, I, V, F, Y, W, G, A, S, T o M]. En otro aspecto, la variante comprende [F o Y] y A como sustituciones en las posiciones 206 y 210, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones V206F o Y+V213A del polipéptido maduro de id. de sec. n.º:

En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa parental comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 206 y 213, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6.

En otro aspecto la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 206 y 213 con [D, E, L, I, V, F, Y, W, G, A, S, T o M]. En otro aspecto, la variante comprende [F o Y] y A como sustituciones en las posiciones 206 y 210, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones V206 [F, Y, L, H o N], V213A del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º.

En otro aspecto, la variante de una alfa-amilasa parental comprende sustituciones en las posiciones 195 y 243, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en las posiciones 195 y 243 con [F, W, Y, L, I o V]. En otro aspecto, la variante comprende F como sustituciones en las posiciones 195 y 243, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195F + Y243F, en donde la alfa-amilasa parental es cualquiera de los polipéptidos maduros con id. de sec. n.º: 6, 8, 10 o 12. En otro aspecto, la variante comprende Y y F como sustituciones en las posiciones 195 y 243, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N195Y + Y243F, en donde la alfa-amilasa parental es cualquiera de los polipéptidos maduros con id. de sec. n.º: 6.

la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195F + I206L + Y243F del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 8 o 10. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones Y, L y F en las posiciones 195, 206 y 243, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195Y + V206L + Y243F del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6 o 12. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195Y + I206L + Y243F del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 8 o 10.

La variante de una alfa-amilasa parental comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195, 206 y 243, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195, 206 y 243 con [D, E, L, I, F, V, Y, C, N, S, T o H]. En otro aspecto, la variante comprende F, Y y F como sustituciones en las posiciones 195, 206 y 243, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195F + V206N + Y243F del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6 o 12. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195F + I206N + Y243F del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 8 o 10. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones Y, N y F como sustituciones en las posiciones 195, 206 y 243, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195Y + V206N + Y243F del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6 o 12. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195Y + I206N + Y243F del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 8 o 10.

La variante de una alfa-amilasa parental comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195, 206 y 243, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195, 206 y 243 con [D, E, L, I, F, V, Y, C, N, S, T o H]. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones F, H y F como sustituciones en las posiciones 195, 206 y 243, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195F + V206H + Y243F del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6 o 12. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195F + I206H + Y243F del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 8 o 10. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones Y, H y F como sustituciones en las posiciones 195, 206 y 243, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195Y + V206H + Y243F del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6 o 12. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195Y + I206H + Y243F del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 8 o 10.

La variante de una alfa-amilasa parental comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195, 206 y 243, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además sustituciones en las posiciones 195, 206 y 243 con [D, E, L, I, F, V, Y, C, N, S, T o H]. En otro aspecto, la variante comprende F, F y F como sustituciones en las posiciones 195, 206 y 243, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195F + V206F + Y243F del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6 o 12. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195F + I206F + Y243F del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 8 o 10. En otro aspecto, la variante comprende sustituciones Y, F y F como sustituciones en las posiciones 195, 206 y 243, respectivamente. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195Y + V206F + Y243F del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6 o 12. En otro aspecto, la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y comprende además las sustituciones N195Y + I206F + Y243F del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 8 o 10.

En un aspecto de la invención la variante comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183, 184 o y una o más de las siguientes sustituciones N195 [F, o Y], N197 [F o L], Y198N, Y200F, Y203F, V206 [F, Y, L, H o N], H210Y, E212 [V o G], V213A o Y243F y una sustitución en una o más posiciones I116T, Q129L, G133E, E134Y, K142R, P146S, G147E, G149R, N151R, Y152H, Q169E, Q174R, A186R, S244Q, G303V, K320N, R359I, N418D, A447V que comprende una sustitución en la posición 195 y además en las posiciones 206 y 243, de la secuencia de polipéptidos maduros de la id. de sec. n.º 6 o una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad de al menos 75 %, preferiblemente al menos 80 %, preferiblemente al

menos 81 %, preferiblemente al menos 82 %, preferiblemente al menos 83 %, preferiblemente al menos 84 % preferiblemente al menos 85 %, preferiblemente al menos 86 %, preferiblemente al menos 87 %, preferiblemente al menos 88 %, preferiblemente al menos 89 %, especialmente preferiblemente al menos 90 %, especialmente preferiblemente al menos 91 %, especialmente preferiblemente al menos 92 %, especialmente preferiblemente al menos 93 %, especialmente preferiblemente al menos 94 %, incluso más preferiblemente al menos 95 % de homología, más preferiblemente al menos 96 %, más preferiblemente al menos 97 %, más preferiblemente al menos 98 %, más preferiblemente al menos 99 % con respecto a la secuencia de aminoácidos de id. de sec. n.º 6.

Por lo tanto, un aspecto de la invención concierne variantes de una alfa-amilasa que comprende al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183, o 184 y una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 195, 195, 198, 200, 203, 206, 206, 212, 213, 213 y 243 que comprende una sustitución en la posición 195 y además en las posiciones 206 y 243 y que comprende además una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447 y 458 en donde

(a) la alteración o alteraciones son independientemente

(i) una inserción de un aminoácido inmediatamente corriente abajo y adyacente a la posición,

(ii) una delección del aminoácido que ocupa la posición, y/o

(iii) una sustitución del aminoácido que ocupa la posición,

(b) la variante tiene actividad alfa-amilasa; y

(c) cada posición responde a una posición en la secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos de la id. de sec. n.º: 6.

Preferiblemente la variante comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad de al menos 80 %, más preferiblemente al menos 85 %, aún más preferiblemente al menos 90 %, con máxima preferencia al menos 95 % y aún con máxima preferencia en 6.

Preferiblemente, las variantes que comprenden alteraciones en una o más de las posiciones arriba identificadas tienen una mayor estabilidad en detergente, preferiblemente, en detergente líquido, en comparación con la alfa-amilasa parental.

Los inventores han descubierto que estas variantes tienen una estabilidad mejorada en comparación con la alfa-amilasa parental en composiciones que comprenden un agente quelante, en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de los iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM, a 21 °C y pH 8,0, como se describe en "Materiales y Métodos".

El método para preparar un polipéptido útil en la invención comprende;

(a) proporcionar una secuencia de aminoácidos de un polipéptido parental que tiene actividad amilasa;

(b) seleccionar una o más amino ácidos que ocupan una o más posiciones correspondientes a las posiciones 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213, 243 y además seleccionar una o más posiciones correspondientes a las posiciones 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458 del polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6;

(c) modificar la secuencia sustituyendo o eliminando el residuo de aminoácido seleccionado o insertando uno o más residuos de aminoácidos corriente abajo y en posición adyacente al residuo de aminoácido seleccionado;

(d) producir un polipéptido variante que tiene la secuencia modificada;

(e) someter a prueba al polipéptido variante para analizar la actividad de amilasa y la estabilidad; y

(d) seleccionar un polipéptido variante que tiene actividad amilasa y mayor estabilidad en comparación con el polipéptido parental en presencia de un agente quelante, en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de los iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a 21 °C y pH 8,0, comprendiendo la variante al menos una, al menos dos, o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183, o 184, una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213, y 243 que comprende una sustitución en la posición 195 y además en las posiciones 206 y 243 y que comprende además una alteración en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 118, 129, 133, 134, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 235, 244, 303, 320, 339, 359, 418, 431, 434, 447, 458 en donde

(a) la alteración o alteraciones son independientemente

(i) una inserción de un aminoácido inmediatamente corriente abajo y adyacente a la posición,

(ii) una delección del aminoácido que ocupa la posición, y/o

(iii) una sustitución del aminoácido que ocupa la posición,

(b) la variante tiene actividad alfa-amilasa; y

(c) cada posición responde a una posición en la secuencia de aminoácidos de la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos de la id. de sec. n.º: 6.

En una realización preferida, la alfa-amilasa variante tiene una o más (varias) delecciones y/o sustituciones y/o inserciones de aminoácidos. En una realización especialmente preferida, las alfa-amilasas variantes incluyen una alfa-amilasa que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la id. de sec. n.º: 6 en la presente memoria y que además comprenden la siguiente alteración: D183*+G184 * (delección en la posición 183 y 184), esta variante muestra un buen rendimiento en detergentes y tienen una estabilidad mejorada en presencia de agentes quelantes.

En una realización preferida, la alfa-amilasa variante comprende SP707 (id. de sec. n.º 8), incluida cualquiera de SP707+R181* G182*, SP707+G182* H183*, SP707+H183* G184*.

En otra realización preferida, la alfa-amilasa variante comprende SP722 (id. de sec. n.º 6), incluida cualquiera de SP722+R181* G182*, SP722+G182* D183*, SP722+D183* G184*.

En otra realización preferida, la alfa-amilasa variante comprende AA560 (id. de sec. n.º 10), incluida cualquiera de AA560+R181* G182*, AA560+G182* D183*, AA560+D183* G184*.

En otra realización preferida la alfa-amilasa variante comprende SP690 (id. de sec. n.º 12), incluida cualquiera de SP690 + R181* G182*; SP690 + G182* T183*; SP690 + T183* G184*.

“SP722+R181* G182* significa que la alfa-amilasa SP722 de *Bacillus spp.* se ha mutado mediante delecciones en las posiciones R181 y G181, en donde los números corresponden a la id. de sec. n.º 6.

Por lo tanto, en un aspecto de la invención la alfa-amilasa variante comprende cualquiera de los siguientes: SP722, SP690, SP707 o AA560, incluida cualquiera de:

SP722 + D183* G184* N195F V206L Y243F; SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F; SP722 + D183* G184* N195F V206F Y243F; AA560 + D183* G184* N195F I206L Y243F; AA560 + D183* G184* N195F I206Y Y243F; AA560 + D183* G184* R118KN195F I206L Y243F R320K R458K; SP707+H183* G184* N195F I206L, Y243F; SP707+H183* G184* N195F I206Y, Y243F; SP707+H183* G184* N195F I206F, Y243F; SP690+T183* G184* N195F V206L, Y243F; SP690+T183* G184* N195F V206Y, Y243F; SP690+T183* G184* N195F V206F, Y243F.

“SP722 + R181* G182* N195F” significa que la alfa-amilasa de *Bacillus spp.* se ha mutado como sigue: delecciones en las posiciones R181 y G181 y una sustitución de Asn (N) a Phe (F) en la posición 195, en donde la numeración corresponde a la id. de sec. n.º 6 (contando como si las posiciones eliminadas todavía están presentes, es decir la numeración no se reduce en dos al eliminar dos posiciones).

En una realización especialmente preferida de la invención, las alteraciones se seleccionan de las siguientes sustituciones:

X193A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y, preferiblemente S193T;

X195A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y, preferiblemente N195 [F o Y];

X197A,C,D,E,F,G,H,I,K,L, N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y, preferiblemente N197 [F o L];

X198A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y, preferiblemente Y198N;

X200A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y, preferiblemente Y200F;

X203A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,X,Y, preferiblemente Y203F.

X206A,C,D,E,F,G,H,I,K,L, N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y, preferiblemente V206 [F, Y, L, H o N];

X210A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y, preferiblemente H210Y;

X212A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,X,Y, preferiblemente E212 [V o G]; y

X213A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,X,Y, preferiblemente V213A;

X243A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente Y243F.

5

La variante comprende alteraciones en tres posiciones, más preferiblemente cuatro posiciones, más preferiblemente cinco posiciones, más preferiblemente seis posiciones; en una realización especialmente preferida, la variante comprende al menos una, al menos dos, al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183, o 184 y además una alteración en una o más posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 193, 195, 197, 198, 200, 203, 206, 210, 212, 213 y 243 que comprenden una sustitución en la posición 195 y además en las posiciones 206 y 243 y una alteración en una o más posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 116, 129, 133, 142, 146, 147, 149, 151, 152, 169, 174, 186, 243, 244, 303, 320, 359, 418, 447 (utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6).

10

Por lo tanto, en una realización especialmente preferida de la invención, las alteraciones se seleccionan de las siguientes sustituciones:

X116A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente N116T

20

X118A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente R118K

X129A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,S,T,V,W,Y, preferiblemente Q129L

X133 A,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W, Y, preferiblemente G133E

25

X134A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente D134Y

X142A,C,D,E,F,H,I,K5L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente K142R

30

X146A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente P146S

X147A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y, preferiblemente G147E

X149A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente G149R

35

X151A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente T151R

X152A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente Y152H

X169A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente Q169E

40

X174C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente Q174R

X186A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y, preferiblemente A186R

45

X235A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente I235N

X243A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente Y243F

X244A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente S244Q

50

X303A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente G303V

X320A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente K320N

55

X339A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente S339P

X359C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente R359I

X418A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente N418D

60

X431A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente S431T

X434A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente P434T

65

X447A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente A447V

X458A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y, preferiblemente R458K, comprendiendo además la variante al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en las regiones de aminoácidos de 181, 182, 183, o 184.

En una realización preferida, el número de sustituciones de aminoácidos en las variantes de la presente invención es preferiblemente 17 sustituciones, más preferiblemente 16 sustituciones, más preferiblemente 15 sustituciones, más preferiblemente 14 sustituciones, más preferiblemente 13 sustituciones, más preferiblemente 12 sustituciones, más preferiblemente 11 sustituciones, más preferiblemente 10 sustituciones, más preferiblemente 9 sustituciones, más preferiblemente 8 sustituciones, más preferiblemente 7 sustituciones, más preferiblemente 6 sustituciones, más preferiblemente 5 sustituciones, más preferiblemente 4 sustituciones, aún más preferiblemente 3 sustituciones. En otra realización preferida, el número de sustituciones de aminoácidos en las variantes de la presente invención consiste en preferiblemente 17 sustituciones, más preferiblemente 16 sustituciones, más preferiblemente 15 sustituciones, más preferiblemente 14 sustituciones, más preferiblemente 13 sustituciones, más preferiblemente 12 sustituciones, más preferiblemente 11 sustituciones, más preferiblemente 10 sustituciones, más preferiblemente 9 sustituciones, más preferiblemente 8 sustituciones, más preferiblemente 7 sustituciones, más preferiblemente 6 sustituciones, más preferiblemente 5 sustituciones, más preferiblemente 4 sustituciones, aún más preferiblemente 3 sustituciones. En otra realización preferida particular, las variantes según la presente invención comprenden combinaciones de diferentes alteraciones que comprenden al menos una, al menos dos, o al menos tres deleciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183, o 184, preferiblemente deleción en la posición 183 y 184, y que comprenden además una de las siguientes combinaciones de alteraciones y sustituciones en las posiciones 186 con [R, T, K, H, E, D, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 174 con [R, K, H, E, D, Q o N] y 212 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 206 con [D, E, F, W, Y, L, I, V, N, Q o H] y 212 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q o H], 212 con [F, W, Y, L, I o V] y 304 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q o H], 212 con [F, W, Y, L, I o V], 304 con [F, W, Y, L, I o V] y 447 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M] y 133 con [E o D]; sustituciones en las posiciones 235 con [N o L] y 339 con [P]; sustituciones en las posiciones 193 con [G, A, T o M] y 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q, o H]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M] y 133 con [E o D] y 142 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M], 133 con [E o D], 142 con [R, K, H, Q o N] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M], 133 con [E o D], 142 con [R, K, H, Q o N], 198 con [Q o N] con [Q o N] y 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q o H]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D] y 195 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D] y 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 186 con [R, T, K, H, E, D, Q, o N], 195 con [F, W, Y, L, I, o V], 212 con [F, W, Y, L, I, o V] y 213; con [A]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 195 con [F, W, Y, L, I o V], 198 con [Q o N] y 200 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M] y 195 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M], 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 142 con [R, K, H, Q o N] y 146 con [G, A, S, T o M]; sustituciones en las posiciones 142 con [R, K, H, Q o N], 146 con [G, A, S, T o M] y 149 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 142 con [R, K, H, Q o N], 146 con [G, A, S, T o M], 149 con [R, K, H, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 142 con [R, K, H, Q o N], 146 con [G, A, S, T o M], 149 con [R, K, H, Q o N], 195 con [F, W, Y, L, I o V], 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 142 con [R, K, H, Q o N], 146 con [G, A, S, T o M], 149 con [R, K, H, Q o N], 195 con [F, W, Y, L, I o V], 198 con [Q o N] y 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q o H]; y 206 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 151 y 210 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 151, 210 con [F, W, Y, L, I o V] y 320 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 151, 210 con [F, W, Y, L, I o V], 320 con [Q o N] y 359 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 151, 210 con [F, W, Y, L, I o V], 320 con [Q o N], 359 con [F, W, Y, L, I o V] y 418 con [E o D]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D] y 149 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N] y 169 con [E o D]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 169 con [E o D] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 169 con [E o D], 198 con [Q o N] y 203 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 169 con [E o D], 198 con [Q o N], 203 con [F, W, Y, L, I o V] y 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q o H]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D] y 149 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N], 195 con [F, W, Y, L, I o V], 198 con [Q o N] y 203 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D] y 152 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D], 152 con [R, K, H, Q o N] y 169 con [E o D]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D], 152 con [R, K, H, Q o N], 169 con [E o D] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 147 con [E o D], 152 con [R, K, H, Q o N], 169 con [E o D], 198 con [Q o N] y 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q o H]; sustituciones en las posiciones 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q, o H]; sustituciones en las posiciones 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 210 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q o H] y 210 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 186 con [R, K, H, E, D, Q o N] y 195 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 195 con [F, W, Y, L, I o V] y 206 con [F, W, Y, L, I, V, N, Q, o H]; sustituciones en las posiciones 195 con [F, W, Y, L, I o V], 206 y 243 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 206 y 243 con [F, W, Y, L, I o V]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D] y 149 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N] y 198 con [Q o N]; sustituciones en las posiciones 133 con [E o D], 149 con [R, K, H, Q o N] y 198 con [Q o N] y 206; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M] y 133 con [E o D]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A, S, T o M] y 133 con [E o D], 147 con [E o D] y 152 con [R, K, H, Q o N]; sustituciones en las posiciones 116 con [G, A,

[illegible]

Variantes especialmente útiles en la invención incluyen (utilizando la numeración de la id. de sec. n.º 6): D183* G184* N195F V206Y Y243F; D183* G184* N195F V206L Y243F; D183* G184* N195F V206Y Y243F; D183* G184* N195F V206F Y243F; En una realización preferida las variantes útiles en la invención incluyen,

SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F. En una realización preferida, las variantes se seleccionan de las siguientes: SP722 + D183* G184* N195F V206L Y243F; SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F; SP722 + D183* G184* N195F V206N Y243F; SP722 + D183* G184* N195F V206F Y243F. En otra realización preferida, las variantes según la invención incluyen, SP707 + H183* G184* N195F I206Y Y243F; SP707 + H183* G184* N195F I206F Y243F; SP707 + H183* G184* N195F I206L Y243F; SP707 + H183* G184* N195F I206Y Y243F; SP707 + H183* G184* N195F I206L Y243F R320K R458K.

En una realización preferida, las variantes según la invención incluyen AA560 + D183* G184* N195F I206Y Y243F, AA560 + D183* G184* N195F I206L Y243F; AA560 + D183* G184* N195F I206Y Y243F; AA560+D183* G184* R118K N195F I206L Y243F R320K R458K.

En una realización preferida, las variantes según la invención incluyen, SP690 + T183 * G184 * N195F V206Y Y243F; SP690+T183* G184* N118K N195F V206L Y243F R320K R458K. SP690 + T183* G184* N195F V206L Y243F; SP690 + T183* G184* N195F V206Y Y243F; SP690 + T183* G184* N195F V206N Y243F; SP690 + T183* G184* N195F V206F Y243F; SP690 + T183* G184* N195F V206H; SP690 + T183* G184* N195F V206Y.

Composiciones limpiadoras

La presente invención se refiere a productos y/o métodos relacionados con y/o al uso de las composiciones reivindicadas que son para el cuidado del coche, lavado de vajillas, acondicionado de tejidos (incluido el suavizado) detergencia de tejidos, aditivo y/o cuidado para lavado y aclarado de ropa, limpieza y/o tratamiento de superficies duras, y otra limpieza para uso del consumidor o institucional. Según la invención, las variantes de alfa-amilasa según las reivindicaciones son un componente en una composición limpiadora tal como una composición

detergente, por ejemplo, una composición detergente para lavado de ropa o una composición detergente para lavado de vajillas. Es especialmente preferida una composición detergente para lavado de ropa líquida.

Dichas composiciones limpiadoras comprenden un adyuvante limpiador / detergente, que no es un agente quelante según se ha definido anteriormente, preferiblemente que comprende una mezcla de componentes. De forma típica, el adyuvante limpiador estará presente en la composición en una cantidad de 0,001 a 99,9 % en peso, de forma más típica de 0,01 a 80 % en peso de adyuvante de limpieza. Los adyuvantes limpiadores adecuados comprenden: tensioactivos, aditivos reforzantes de la detergencia, blanqueadores, catalizadores del blanqueador, colorantes, reforzadores del blanqueador, agentes de transferencia de colorantes, adyuvantes de deposición, tensioactivos, enzimas adicionales, y estabilizantes de enzimas, materiales catalíticos, activadores del blanqueador, peróxido de hidrógeno, fuentes de peróxido de hidrógeno, abrillantadores ópticos, fotoactivadores, fluorescentes, agentes matizadores de tejidos, acondicionadores de tejidos, perácidos preformados, tensioactivos poliméricos, agentes de eliminación/antirredeposición de manchas de arcilla, sales de carga, hidrótopos, abrillantadores, supresores de jabonaduras, agentes elastificadores de estructuras, suavizantes de tejidos, tensioactivos hidrolizables, conservantes, antioxidantes, agentes antiencogimiento, germicidas, fungicidas, agentes contra el deslustre, agentes anticorrosión, fuentes de alcalinidad, agentes solubilizantes, vehículos, auxiliares de procesamiento, pigmentos, tintes, perfumes y agentes de control del pH. Por ejemplo, estos pueden incluir ingredientes blanqueadores tales como un reforzador del blanqueador de imina; fuentes de peróxido de hidrógeno tales como percarbonato y/o perborato, especialmente percarbonato recubierto con un material tal como una sal de carbonato y/o de sulfato, sal de silicato, borosilicato, y cualquier mezcla de los anteriores; perácido preformado, incluido perácido preformado en forma encapsulada; catalizadores de metales de transición; supresores de jabonaduras o sistemas supresores tales como supresores de jabonaduras basados en silicona y/o supresores de jabonaduras basados en ácidos grasos; suavizantes de tejidos tales como arcilla, silicona y/o compuestos de amonio cuaternario; floculantes tales como poli(óxido de etileno); inhibidores de transferencia de colorantes tales como polivinilpirrolidona, poli(N-óxido de 4-vinilpiridina) y/o copolímero de vinilpirrolidona y vinilimidazol; componentes para la integridad de tejidos tales como oligómeros producidos por la condensación de imidazol y epiclóhidrina; dispersantes de la suciedad y coadyuvantes antirredeposición de suciedad tales como poliaminas alcoxiladas y polímeros de etilenimina etoxilada; componentes antirredeposición, tales como poliésteres; polímeros de carboxilato tales como polímeros de ácido maleico o copolímeros de ácido maleico y acrílico; perfumes tales como microcápsulas de perfume; acordes encapsulados en almidón, perfumes depositados mediante pulverización; anillos de jabón; partículas estéticas; tintes; cargas como sulfato sódico, aunque se prefiere que la composición esté prácticamente exenta de cargas; sal de silicato como el silicato de sodio, incluidos el silicato de sodio 1.6R y 2.0R, o metasilicato sódico; copoliésteres de ácidos dicarboxílicos y dioles; polímeros celulósicos como metilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxietoxilcelulosa u otras celulosas alquílicas o alquilalcoxílicas; disolventes tales como 1,2-propanodiol, monoetanolamina; dietilenglicol, etanol y cualquier mezcla de los anteriores; hidrótopos tales como cumenosulfonato de sodio, xilenosulfonato de sodio, toluenosulfonato de sodio, y cualquiera de sus mezclas; ácidos orgánicos tales como ácido cítrico; y cualquier combinación de los mismos.

En otro aspecto preferido, la composición comprende uno o más tensioactivos, que pueden ser no iónicos incluidos los tensioactivos semipolares y/o aniónicos y/o catiónicos y/o de ion híbrido y/o anfóteros y/o no iónicos semipolares y/o mezclas de los mismos. Los tensioactivos están presentes de forma típica a un nivel de 0,1 % a 60 % en peso o de 0,5 a 50 % en peso o 1 a 40 % en peso de la composición.

Cuando se incluyen en la anterior, la composición limpiadora contendrá normalmente de aproximadamente 1 % a aproximadamente 40 % de un tensioactivo aniónico tal como un alquilbencenosulfonato lineal, alfa-olefinsulfonato, alquilsulfato (sulfato de alcohol graso), etoxisulfato de alcohol, alcanosulfonato secundario, éster metílico de alfa-sulfoácido graso, ácido alquil o alquenilsuccínico o jabón.

Cuando se incluyen en la anterior, el agente limpiador contendrá normalmente de aproximadamente 0,2 % a aproximadamente 40 % de un tensioactivo no iónico tal como un alcohol etoxilado, nonilfenol etoxilado, alquilpoliglicósido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, amida de ácido graso polihidroxilado, o derivados de N-acilo y N-alquilo de glucosamina ("glucamidas").

La composición limpiadora puede comprender una o más enzimas adicionales tales como una proteasa, una lipasa, una peroxidasa, otra enzima amilolítica, por ejemplo, otra alfa-amilasa, glucoamilasa, amilasa maltofénica, CGTasa y/o una celulasa, mananasa (tal como MANNWAY™ de Novozymes, Dinamarca), pectinasa, pectato liasa, cutinasa, y/o lacasa.

En general, las propiedades de la enzima o enzimas seleccionadas deberán ser compatibles con el detergente seleccionado (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimático, etc.), y la enzima o enzimas deberán estar presentes en una cantidad eficaz.

Proteasas: Las proteasas adecuadas incluyen metaloproteasas y/o serina proteasas, incluidas serina proteasas neutras o alcalinas, tales como subtilisin (EC 3.4.21.62). Las proteasas adecuadas incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano. En un aspecto, dicha proteasa adecuada puede ser de origen microbiano. Las proteasas adecuadas incluyen mutantes modificados química o genéticamente de las proteasas adecuadas anteriormente mencionadas. En un aspecto, la proteasa adecuada puede ser una serina proteasa, tal como una proteasa alcalina microbiana o/y una proteasa de tipo tripsina. Los ejemplos de proteasas neutras o alcalinas adecuadas incluyen:

(a) subtilisinas (EC 3.4.21.62), incluidas las derivadas de *Bacillus*, tales como *Bacillus lentus*, *B. alkalophilus*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* y *Bacillus gibsonii* descritas en los documentos US-6.312.936 B1, US-5.679.630, US-4.760.025, US-7.262.042 y W009/021867.

(b) proteasas de tipo tripsina o de tipo quimotripsina, tales como tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino) incluidas la proteasa de *Fusarium* descrita en el documento WO 89/06270 y las proteasas de quimotripsina derivadas de *Cellomonas* descritas en los documentos WO 05/052161 y WO 05/052146.

(c) metaloproteasas, incluidas las derivadas de *Bacillus amyloliquefaciens* descritas en el documento WO 07/044993A2.

Las proteasas preferidas incluyen las derivadas de *Bacillus gibsonii* o *Bacillus lentus*.

Las enzimas proteasas adecuadas comerciales incluyen las que se venden con los nombres comerciales Alcalase®, Savinase®, Primase®, Durazym®, Polarzyme®, Kannase®, Liquanase®, Liquanase Ultra®, Savinase Ultra®, Ovozyme®, Neutrase®, Everlase® y Esperase® de Novozymes A/S (Dinamarca), las que se venden con el nombre comercial Maxatase®, Maxacal®, Maxapem®, Properase®, Purafect®, Purafect Prime®, Purafect Ox®, FN3®, FN4®, Excellase® y Purafect OXP® de Genencor International, las que se venden con el nombre comercial Opticlean® y Optimase® de Solvay Enzymes, las comercializadas por Henkel/ Kemira, especialmente BLAP (secuencia mostrada en la Figura 29 de US-5.352.604 con las siguientes mutaciones S99D + S101 R + S103 A + V104I + G159S, a continuación en la memoria recibe el nombre de BLAP), BLAP R (BLAP con S3T + V4I + V199M + V205I + L217D), BLAP X (BLAP con S3T + V4I + V205I) y BLAP F49 (BLAP con S3T + V4I + A194P + V199M + V205I + L217D) - todas de Henkel/Kemira; y KAP (subtilisina de *Bacillus alkalophilus* con mutaciones A230V + S256G + S259N) de Kao.

Lipasas: Las lipasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de *Humicola* (sinónimo *Thermomyces*), por ejemplo, de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) como se describe en EP 258 068 y EP 305 216 o de *H. insolens* como se describe en WO 96/13580, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo, de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes* (EP 218 272), *P. cepacia* (EP 331 376), *P. stutzeri* (GB 1.372.034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. cepa SD 705 (WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo, de *B. subtilis* (Dartois y col. (1993), Biochemica et Biophysica Acta, 1131, 253-360), *B. stearothermophilus* (JP-64/744992) o *B. pumilus* (WO 91/16422).

La lipasa puede ser una "lipasa de primer ciclo" tal como la descrita en US-6.939.702 B1 y US-PA 2009/0217464. En un aspecto, la lipasa es una lipasa de primer lavado, preferiblemente una variante de la lipasa natural procedente de *Thermomyces lanuginosus* que comprende las mutaciones T231R y N233R. La secuencia natural es la de 269 aminoácidos (aminoácidos 23 – 291) del número de registro de Swissprot Swiss-Prot O59952 (obtenida de *Thermomyces lanuginosus* (*Humicola lanuginosa*)). Las lipasas preferidas incluirían las comercializadas con el nombre comercial Lipex®, Lipolex® y Lipoclean®. Celulasas: Las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, p. ej., las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US-4.435.307, US-5.648.263, US-5.691.178, US-5.776.757 y WO 89/09259.

Celulasas: Las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, p. ej., las celulasas fúngicas producidas a partir de *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en US-4.435.307, US-5.648.263, US-5.691.178, US-5.776.757 y WO 89/09259.

Las celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen ventajas de cuidado del color. Los ejemplos de estas celulasas son las celulasas descritas en EP-0 495 257, EP-0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940. Otros ejemplos son variantes de celulasas como las descritas en WO 94/07998, EP 0 531 315, US-5.457.046, US-5.686.593, US-5.763.254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

Las celulasas comercializadas incluyen CELLUZYME®, y CAREZYME® (Novozymes A/S), CLAZINASE®, y PURADAX HA® (Genencor International Inc.) y KAC-500(B)® (Kao Corporation).

Peroxidasas/Oxidasas: Las peroxidasas/oxidasas incluyen las de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes modificados químicamente u obtenidos mediante ingeniería de proteínas. Ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus*, y variantes de las mismas como las descritas en WO 93/24618, WO 95/10602 y WO 98/15257.

Las peroxidasas comerciales incluyen GUARDZYME® (Novozymes A/S).

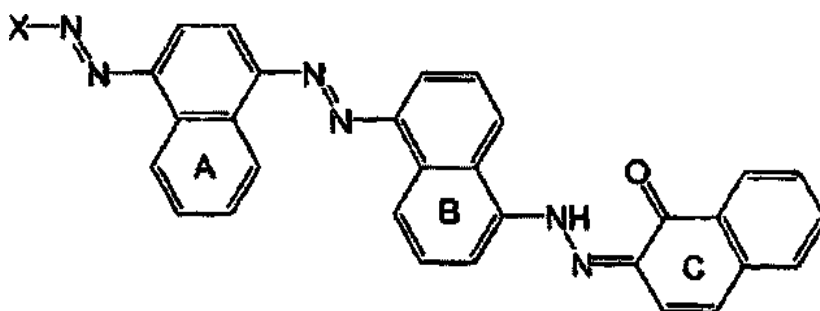
Otras enzimas: Otras enzimas preferidas incluyen las pectato liasas vendidas con los nombres comerciales Pectawash®, Pectaway® y las manasas vendidas con los nombres comerciales Mannaway® (todas de Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), y Purabrite® (Genencor International Inc., Palo Alto, California).

La enzima o enzimas deterativas se pueden incluir en una composición detergente añadiendo por separado los aditivos que contienen una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprende todas estas enzimas. Un aditivo detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, se puede formular, por ejemplo, granulado, un líquido, una suspensión acuosa. Las formulaciones de aditivo detergente son granulados, en especial granulados sin polvo, líquidos, en particular líquidos estabilizados, o suspensiones acuosas.

Los granulados sin polvo se pueden producir, por ejemplo, según se describe en US-4.106.991 y en US-4.661.452, y opcionalmente pueden estar revestidos con métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de materiales de recubrimiento cerúleos son productos de poli(óxido de etileno) (polietilenglicol, PEG) que tienen pesos moleculares medios de 1000 a 20000; nonilfenoles etoxilados que tienen 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 que tienen de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y monoglicéridos y diglicéridos y triglicéridos de ácidos grasos. Los ejemplos de materiales de recubrimiento filmógenos adecuados para aplicar mediante técnicas de lecho fluidizado se proporcionan en GB-1483591. Las preparaciones líquidas de enzima pueden estabilizarse, por ejemplo, mediante la adición de un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol azucarado, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Pueden prepararse enzimas protegidas según el método descrito en EP 238.216.

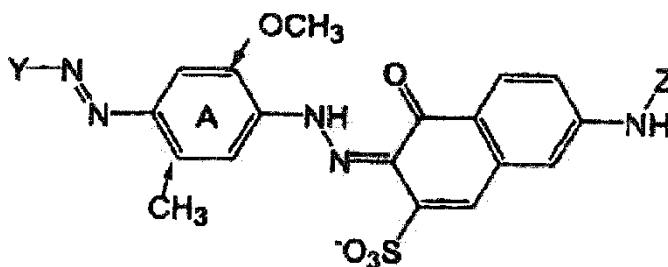
La composición puede comprender un agente de matizado de tejidos. Los agentes de matizado de tejidos adecuados incluyen tintes, conjugados de tinte-arcilla, y pigmentos que preferiblemente satisfacen las necesidades del Método de ensayo 1 descrito más adelante en la presente memoria. Los tintes adecuados incluyen pequeñas moléculas de tinte y moléculas poliméricas. Los tintes de moléculas pequeñas adecuados incluyen tintes de pequeñas moléculas seleccionados del grupo que consiste en tintes que se encuentran en las clasificaciones de índice de color (C.I.) de Direct Blue, Direct Red, Direct Violet, Acid Blue, Acid Red, Acid Violet, Basic Blue, Basic Violet y Basic Red, o mezclas de los mismos, por ejemplo:

(1) Tintes azules directos de tipo tris-azo de fórmula



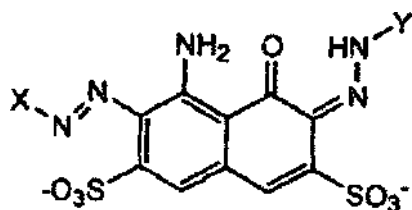
donde al menos dos de los anillos de naftilo A, B y C están sustituidos por un grupo sulfonato, el anillo C puede estar sustituido en la posición 5 por un grupo NH_2 o NHPh , X es un anillo de bencilo o naftilo sustituido con hasta 2 grupos sulfonato y puede estar sustituido en la posición 2 con un grupo OH y puede también estar sustituido con un grupo NH_2 o NHPh .

(2) Tintes directos violeta bis-azo de fórmula:

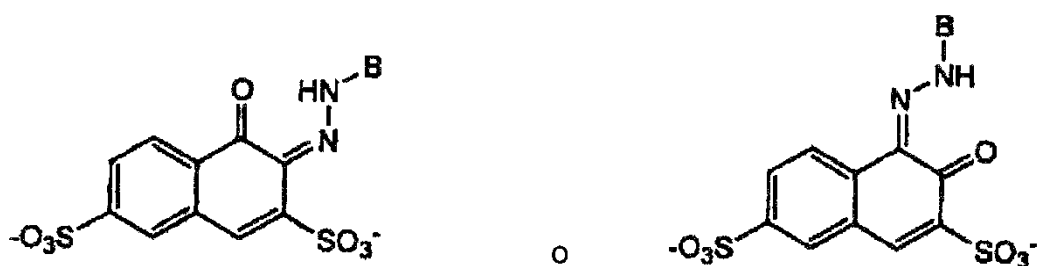


donde Z es H o fenilo, el anillo A está preferiblemente sustituido por un metilo y grupo metoxi en las posiciones indicadas mediante flechas, el anillo A puede también ser un anillo de tipo naftilo, el grupo Y es un anillo bencílico o un anillo naftílico, que está sustituido por un grupo sulfato y puede ser mono o disustituido por grupos metilo.

(3) Tintes ácidos azules o rojos de fórmula

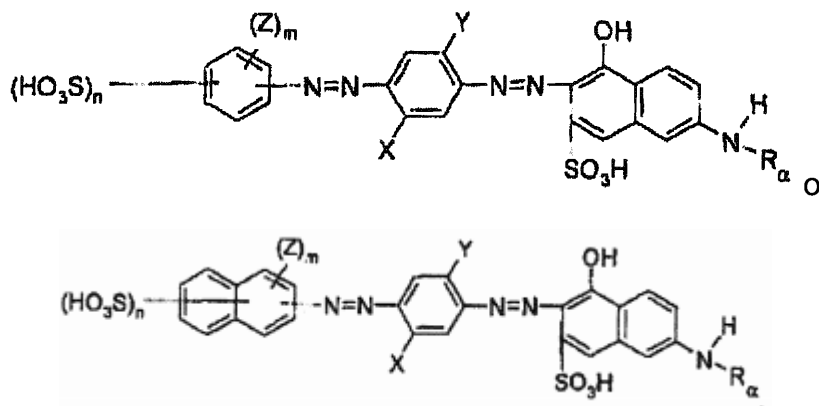


5 ser un grupo bencilo o naftilo sustituido que puede estar sustituido con grupos no solubles en agua como, por ejemplo, grupos alquilo o alcoxi o arilo, X e Y pueden no estar sustituidos con grupos solubles en agua como, por ejemplo, sulfonatos o carboxilatos. En otro aspecto, X es un grupo bencilo sustituido con un grupo nitro e Y es un grupo bencilo



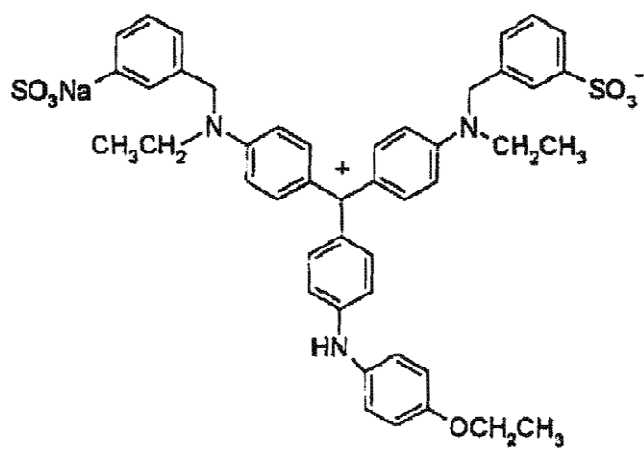
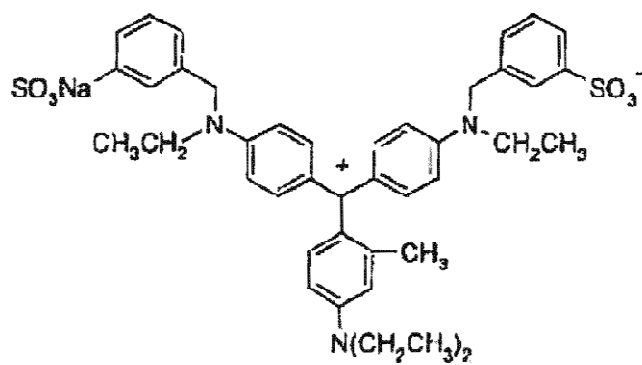
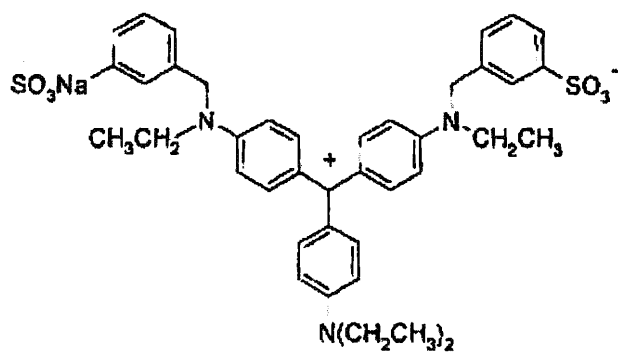
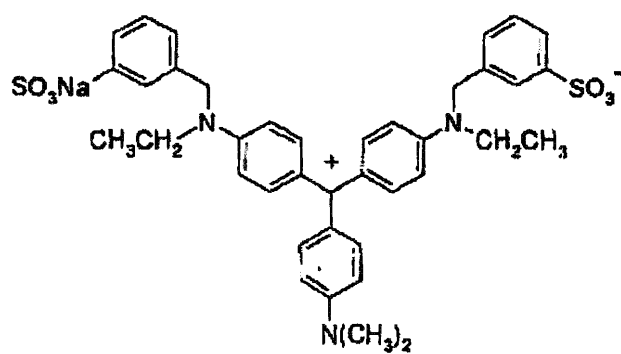
15 ejemplo, sulfonatos o carboxilatos.

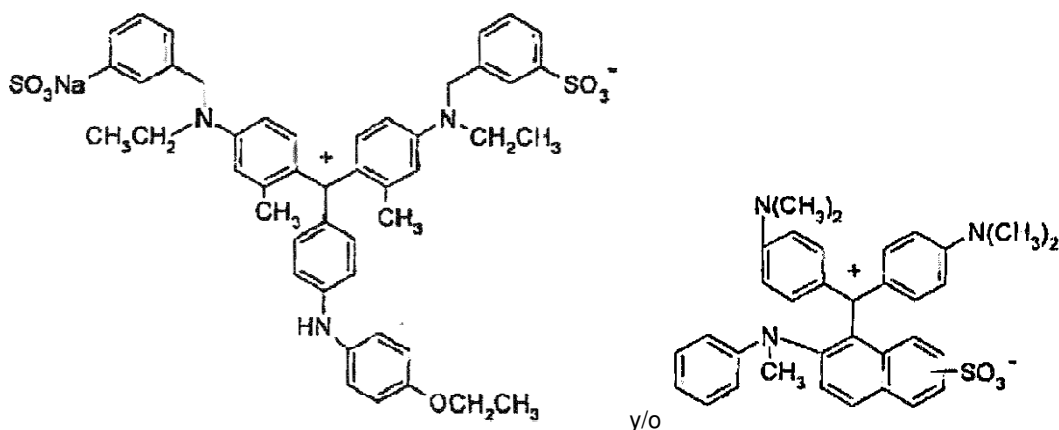
(5) Tintes dis-azo de la estructura



25 como sales correspondientes de los mismos y mezclas de los mismos

(6) Tintes de trifenilmetano de las siguientes estructuras





y mezclas de los mismos. En otro aspecto, los tintes de moléculas pequeñas adecuados incluyen tintes de moléculas pequeñas seleccionados del grupo que consiste en los tintes de número, según Colour Index (Society of Dyers and Colourists, Bradford, Reino Unido): Direct Violet 9, Direct Violet 35, Direct Violet 48, Direct Violet 51, Direct Violet 66, Direct Violet 99, Direct Blue 1, Direct Blue 71, Direct Blue 80, Direct Blue 279, Acid Red 17, Acid Red 73, Acid Red 88, Acid Red 150, Acid Violet 15, Acid Violet 17, Acid Violet 24, Acid Violet 43, Acid Red 52, Acid Violet 49, Acid Blue 15, Acid Blue 17, Acid Blue 25, Acid Blue 29, Acid Blue 40, Acid Blue 45, Acid Blue 75, Acid Blue 80, Acid Blue 83, Acid Blue 90 y Acid Blue 113, Acid Black 1, Basic Violet 1, Basic Violet 3, Basic Violet 4, Basic Violet 10, Basic Violet 35, Basic Blue 3, Basic Blue 16, Basic Blue 22, Basic Blue 47, Basic Blue 66, Basic Blue 75, Basic Blue 159 y mezclas de los mismos. En otro aspecto, los tintes de moléculas pequeñas adecuados incluyen tintes de moléculas pequeñas seleccionados del grupo que consiste en los números, según Colour Index (Society of Dyers and Colourists, Bradford, Reino Unido): Acid Violet 17, Acid Violet 43, Acid Red 52, Acid Red 73, Acid Red 88, Acid Red 150, Acid Blue 25, Acid Blue 29, Acid Blue 45, Acid Blue 113, Acid Black 1, Direct Blue 1, Direct Blue 71, Direct Violet 51 y mezclas de los mismos. En otro aspecto, los tintes de moléculas pequeñas adecuados incluyen tintes de moléculas pequeñas seleccionados del grupo que consiste en los números, según Colour Index (Society of Dyers and Colourists, Bradford, Reino Unido): Acid Violet 17, Direct Blue 71, Direct Violet 51, Direct Blue 1, Acid Red 88, Acid Red 150, Acid Blue 29, Acid Blue 113 o mezclas de los mismos.

Los tintes poliméricos adecuados incluyen tintes poliméricos seleccionados del grupo que consiste en polímeros que contienen cromógenos conjugados (conjugados de tinte polimérico) y polímeros con cromógenos copolimerizados en la cadena principal del polímero y mezclas de los mismos.

En otro aspecto, los tintes poliméricos adecuados incluyen tintes poliméricos seleccionados del grupo que consiste en colorantes con elevada afinidad por el tejido comercializados con el nombre Liquitint® (Milliken, Spartanburg, South Carolina, EE. UU.), conjugados de tinte polimérico formados a partir de, al menos, un tinte reactivo y un polímero seleccionado del grupo que consiste en un resto hidroxilo, un resto amina primaria, un resto amina secundaria, un resto tiol y mezclas de los mismos. En otro aspecto adicional, los tintes poliméricos adecuados incluyen tintes poliméricos seleccionados del grupo que consiste en Liquitint® (Milliken, Spartanburg, South Carolina, EE. UU.) Violet CT, carboximetilcelulosa (CMC) conjugada con un tinte Reactive Blue, Reactive Violet o Reactive Red como, por ejemplo, CMC conjugado con los tintes de nombre, según el código C.I. Reactive Blue 19, comercializado por Megazyme, Wicklow, Irlanda, con el nombre de producto AZO-CM-CELLULOSE, código de producto S-ACMC, colorantes poliméricos de trifenilmetano alcoxilado, colorantes poliméricos de tiofeno alcoxilado, y mezclas de los mismos.

Los conjugados de tinte-arcilla adecuados incluyen conjugados de tinte-arcilla seleccionados del grupo que comprende, al menos, un tinte catiónico/básico y una arcilla de tipo esmectita, y mezclas de los mismos. En otro aspecto, los conjugados de tinte-arcilla adecuados incluyen conjugados de tinte-arcilla seleccionados del grupo que consiste en un tinte catiónico/básico seleccionado del grupo que consiste en C.I. Basic Yellow, del 1 al 108, C.I. Basic Orange, del 1 al 69, C.I. Basic Red, del 1 al 118, C.I. Basic Violet, del 1 al 51, C.I. Basic Blue, del 1 al 164, C.I. Basic Green, del 1 al 14, C.I. Basic Brown, del 1 al 23; C.I. Basic Black, del 1 al 11; y una arcilla seleccionada del grupo que consiste en arcilla de tipo montmorillonita, arcilla de tipo hectorita, arcilla de tipo saponita y mezclas de los mismos. En otro aspecto adicional, los conjugados de arcilla-tinte adecuados incluyen conjugados de arcilla-tinte seleccionados del grupo que consiste en: conjugado de montmorillonita Basic Blue B7 C.I. 42595, conjugado de montmorillonita Basic Blue B9 C.I. 52015, conjugado de montmorillonita Basic Violet V3 C.I. 42555, conjugado de montmorillonita Basic Green G1 C.I. 42040, conjugado de montmorillonita Basic Red R1 C.I. 45160, conjugado de montmorillonita C.I. Basic Black 2, conjugado de hectorita Basic Blue B7 C.I. 42595, conjugado de hectorita Basic Blue B9 C.I. 52015, conjugado de hectorita Basic Violet V3 C.I. 42555, conjugado de hectorita Basic Green G1 C.I. 42040, conjugado de hectorita Basic Red R1 C.I. 45160, conjugado de hectorita C.I. Basic Black 2, conjugado de saponita Basic Blue B7 C.I. 42595, conjugado de saponita Basic Blue B9 C.I. 52015, conjugado de saponita Basic Violet V3 C.I. 42555, conjugado de saponita Basic Green G1 C.I. 42040, conjugado de saponita Basic Red R1 C.I. 45160, conjugado de saponita C.I. Basic Black 2 y mezclas de los mismos.

Los pigmentos adecuados incluyen pigmentos seleccionados del grupo que consiste en flavantrona, indantrona, indantrona clorada que contiene de 1 a 4 átomos de cloro, pirantrona, dicloropirantrona, monobromodicloropirantrona, dibromodicloropirantrona, tetrabromopirantrona, diimida del ácido perilen-3,4,9,10-tetracarboxílico, en donde los grupos imida pueden ser no sustituidos o sustituidos por alquilo C1-C3 o un radical fenilo o heterocíclico, y en donde los radicales fenilo y heterocíclicos pueden, de forma adicional, llevar sustituyentes que no confieran solubilidad en agua, amidas del ácido antrapirimidincarboxílico, violantrona, isoviolantrona, pigmentos de tipo dioxazina, ftalocianina de cobre, que puede contener hasta 2 átomos de cloro por molécula, ftalocianina de policloro-cobre o ftalocianina de polibromocloro-cobre que contiene hasta 14 átomos de bromo por molécula y mezclas de los mismos.

En otro aspecto, los pigmentos adecuados incluyen pigmentos seleccionados del grupo que consiste en Ultramarine Blue (nombre C.I. Pigment Blue 29), Ultramarine Violet (C.I. Pigment Violet 15) y mezclas de los mismos.

Los agentes de matizado de tejidos anteriormente mencionados pueden usarse en combinación (puede usarse cualquier mezcla de agentes de matizado de tejidos). Pueden adquirirse agentes de matizado de tejidos adecuados de Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, EE. UU.; Ciba Specialty Chemicals, Basel, Suiza; BASF, Ludwigshafen, Alemania; Dayglo Color Corporation, Mumbai, India; Organic Dyestuffs Corp., East Providence, Rhode Island, EE. UU.; Dystar, Frankfurt, Alemania; Lanxess, Leverkusen, Alemania; Megazyme, Wicklow, Irlanda; Clariant, Muttentz, Suiza; Avecia, Manchester, Reino Unido y/o según los ejemplos contenidos en la presente memoria. En US-7.208.459 B2 se describen agentes de matizado adecuados.

Método de ensayo 1

A continuación se indica un protocolo para definir si un material de tinte o de pigmento es un agente de matizado de tejidos para el fin de la presente invención:

1.) Llenar dos recipientes Tergotometer con 800 ml de agua de la red de suministro urbano de Newcastle upon Tyne, Reino Unido (~12 granos por galón americano de dureza total, suministrada por Northumbrian Water, Pity Me, Durham, Co. Durham, Reino Unido).

2) Insertar los recipientes Tergotometer, con la temperatura del agua controlada a 30 °C y la agitación fijada a 40 rpm durante el tiempo que dura el experimento.

3) Añadir 4,8 g de detergente IEC-B (detergente tipo B para una lavadora de referencia base IEC 60456), suministrado por wfk, Brügggen-Bracht, Alemania, a cada recipiente.

4) Al cabo de dos minutos, añadir 2,0 mg de colorante activo al primer recipiente.

5) Al cabo de un minuto, añadir 50 g de camiseta de algodón liso (suministrado por Warwick Equest, Consett, County Durham, Reino Unido), cortado en muestras de 5 cm x 5 cm, a cada recipiente.

6) Al cabo de 10 minutos, vaciar los recipientes y volverlos a llenar con agua fría (16 °C) con un grado de dureza de 14,4 grados de dureza Clark ingleses con una relación molar de calcio a magnesio de 3:1.

7) Al cabo de 2 minutos de aclarado, retirar los tejidos.

8) Repetir las etapas 3-7 durante tres ciclos más usando los mismos tratamientos.

9) Recoger y tender los tejidos en un recinto cerrado durante 12 horas para que se sequen.

10) Analizar las muestras usando un espectrómetro Hunter Miniscan equipado con iluminante D65 y filtro de UVA para obtener valores Hunter a (eje rojo-verde) y Hunter b (eje amarillo-azul).

11) Promediar los valores Hunter a y Hunter b para cada conjunto de tejidos. Si los tejidos tratados con colorante sometidos a valoración muestran una diferencia de tono promedio superior a 0,2 unidades en el eje a o en el eje b, se considera que es un agente de matizado de tejidos para el propósito de la invención.

La composición de limpieza puede comprender además aditivos reforzantes de la detergencia, tales como aditivos reforzantes de la detergencia de tipo carbonato, bicarbonato o silicatos, que pueden ser zeolitas tales como Zeolita A, Zeolita MAP (máximo aluminio de tipo P). Las zeolitas que pueden utilizarse para el lavado de ropa tienen preferiblemente la fórmula $\text{Na}_{12}(\text{AlO}_2)_{12}(\text{SiO}_2)_{12} \cdot 27\text{H}_2\text{O}$ y el tamaño de partículas es usualmente entre 1-10 μm para la zeolita A y 0,7-2 μm para la zeolita MAP. Otros aditivos son el metasilicato sódico ($\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ o $\text{Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) fuertemente alcalino y preferiblemente utilizado en el lavado de vajilla. En realizaciones preferidas, la cantidad de aditivo reforzante de la detergencia puede ser superior a 5 %, superior a 10 %, superior a 20 %, superior a 30 %, superior a 40 % o superior a 50 %, y puede ser inferior a 80 %, 65 %. En un detergente para lavado de vajillas, el nivel de aditivo reforzante de la detergencia es de forma típica 40-65 %, especialmente 50-65 % o incluso 75-90 %.

La composición puede comprender un encapsulado. En un aspecto, un encapsulado comprende un núcleo una envoltura que tiene una superficie interior y una superficie exterior, encapsulando dicha envoltura dicho núcleo.

En un aspecto de dicho encapsulado, dicho núcleo puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en perfumes; abrillantadores; tintes; repelentes de insectos; siliconas; ceras; agentes saborizantes; vitaminas; agentes suavizantes de tejidos; agentes para el cuidado de la piel, en un aspecto, parafinas; enzimas; agentes antibacterianos; blanqueadores; estimulantes sensoriales; y mezclas de los mismos; y dicha envoltura puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en polietilenos; poliamidas; poliestirenos; poliisoprenos; policarbonatos; poliésteres; poliacrilatos; aminoplastos, en un aspecto, dicho aminoplasto puede comprender poliureas, poliuretano, y/o poliureauretano, en un aspecto, dicha poliurea puede comprender polioximetilenurea y/o melamina formaldehído; poliolefinas; polisacáridos, en un aspecto dicho polisacárido puede comprender alginato y/o quitosana; gelatina; goma laca; resinas epoxi; polímeros de vinilo; compuestos inorgánico insolubles en agua; silicona; y mezclas de los mismos.

En un aspecto de dicho encapsulado, dicho núcleo puede comprender perfume.

En un aspecto de dicho encapsulado, dicha envoltura puede comprender melamina formaldehído y/o melamina formaldehído reticulada.

En un aspecto, los encapsulados adecuados pueden comprender un material de núcleo y una envoltura, rodeando dicha envoltura al menos parcialmente dicho material de núcleo, que se describe. Al menos 75 %, 85 % o incluso 90 % de dichos encapsulados pueden tener una resistencia a la fractura de aproximadamente 0,2 MPa a aproximadamente 10 MPa, de aproximadamente 0,4 MPa a aproximadamente 5 MPa, de aproximadamente 0,6 MPa a aproximadamente 3,5 MPa, o incluso de aproximadamente 0,7 MPa a aproximadamente 3 MPa; y un escape de agente beneficioso de 0 % a aproximadamente 30 %, de 0 % a aproximadamente 20 %, o incluso de 0 % a aproximadamente 5 %.

En un aspecto, al menos 75 %, 85 % o incluso 90 % de dichos encapsulados pueden tener un tamaño de partículas de aproximadamente 1 micrómetros a aproximadamente 80 micrómetros, de aproximadamente 5 micrómetros a 60 micrómetros, de aproximadamente 10 micrómetros a aproximadamente 50 micrómetros, o incluso de aproximadamente 15 micrómetros a aproximadamente 40 micrómetros.

En un aspecto, al menos 75 %, 85 % o incluso 90 % de dichos encapsulados pueden tener un espesor de pared de la partícula de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 250 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 180 nm, o incluso de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 160 nm.

En un aspecto, dicho material de núcleo de los encapsulados puede comprender un material seleccionado del grupo que consiste en una materia prima de perfume y/u opcionalmente un material seleccionado del grupo que consiste en aceite vegetal, que incluye aceites vegetales puros y/o mezclados incluidos aceite de ricino, aceite de coco, aceite de algodón, aceite de orujo de uva, colza, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de palma, aceite de lino, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de coco, aceite de almendra de palma, aceite de ricino, aceite de limón y mezclas de los mismos; ésteres de aceites vegetales, ésteres, incluidos adipato de dibutilo, ftalato de dibutilo, benciladipato de butilo, octiladipato de bencilo, fosfato de tricresilo, fosfato de trioctilo y mezclas de los mismos; hidrocarburos de cadena lineal o ramificada, incluidos aquellos hidrocarburos de cadena lineal o ramificada que tienen un punto de ebullición superior a aproximadamente 80 °C; terfenilos parcialmente hidrogenados, ftalatos de dialquilo, alquilbifenilo, incluido monoisopropilbifenilo, naftaleno alquilado, incluido dipropilnaftaleno, sustancias volátiles procedentes del petróleo incluidos queroseno, aceite mineral y mezclas de los mismos; disolventes aromáticos, incluidos benceno, tolueno y mezclas de los mismos; aceites de silicona; y mezclas de los mismos.

En un aspecto, dicho material de la pared de los encapsulados puede comprender una resina que incluye el producto de reacción de un aldehído y una amina, los aldehídos adecuados incluyen formaldehído. Las aminas adecuadas incluyen melamina, urea, benzoguanamina, glicolurilo, y mezclas de los mismos. Las melaminas adecuadas incluyen metilol melamina, metilol melamina metilada, iminomelamina y mezclas de los mismos. Las ureas adecuadas incluyen dimetilol urea, dimetilol urea metilada, urea-resorcinol, y mezclas de las mismas.

En un aspecto, los eliminadores de formaldehído adecuados se pueden emplear con los encapsulados, por ejemplo, en una suspensión acuosa de cápsulas y/o se añaden al producto de consumo antes, durante o después de añadir los encapsulados a dicho producto de consumo.

Las cápsulas adecuadas se pueden preparar siguiendo las enseñanzas de USPA 2008/0305982 A1; y/o de USPA 2009/0247449 A1. Alternativamente, las cápsulas adecuadas se pueden adquirir de Appleton Papers Inc. de Appleton, Wisconsin EE. UU.

Además, los materiales para fabricar los encapsulados anteriormente mencionados pueden obtenerse de Solutia Inc. (St Louis, Missouri, EE. UU.), Cytec Industries (West Paterson, New Jersey, EE. UU.), Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri EE. UU.), CP Kelco Corp. de San Diego, California, EE. UU.; BASF AG de Ludwigshafen, Alemania; Rhodia Corp. de Cranbury, Nueva Jersey, EE. UU.; Hercules Corp. de Wilmington, Delaware, EE. UU.; Agrium Inc. de Calgary, Alberta, Canadá, ISP de New Jersey EE. UU., Akzo Nobel de Chicago, IL, EE. UU.;

Stroever Shellac Bremen de Bremen, Alemania; Dow Chemical Company de Midland, MI, EE. UU.; Bayer AG de Leverkusen, Alemania; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, Missouri, EE. UU.

En un aspecto, la composición puede comprender un estabilizador de enzima seleccionado del grupo que consiste en (a) sales inorgánicas seleccionadas del grupo que consiste en sales de calcio, sales de magnesio y mezclas de las mismas; (b) carbohidratos seleccionados del grupo que consiste en oligosacáridos, polisacáridos y mezclas de los mismos; (c) inhibidores de la proteasa reversibles eficaces para masa seleccionados del grupo que consiste en ácido fenilborónico y derivados de los mismos; y (d) mezclas de los mismos.

En otra realización, la composición comprende: (1) inhibidores de la proteasa reversibles tales como un compuesto que contiene boro; (2) 1-2 propano diol; (3) formiato cálcico y/o formiato sódico; y (4) cualquier combinación de los mismos.

En un aspecto, la composición puede comprender un estructurante seleccionado del grupo que consiste en diglicéridos y triglicéridos, celulosa microcristalina con diestearato de etilenglicol, materiales de tipo celulósico, microfibras de celulosa, biopolímeros, goma xantano, goma gellan y mezclas de los mismos.

El detergente puede comprender uno o más polímeros. Ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinil-pirrolidona), poli(etilenglicol), poli(alcohol vinílico), poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos tales como poliacrilatos, copolímeros de ácido maleico/acrílico y copolímeros de metacrilato de laurilo/ácido acrílico.

El detergente puede incluir un sistema blanqueador, que puede comprender una fuente de H₂O₂ tal como perborato o percarbonato que puede combinarse con un activador del blanqueador formador de perácido tal como una tetraacetiletilendiamina o nonanoiloxibencenosulfonato. Alternativamente, el sistema blanqueador puede comprender peroxiácidos de tipo, por ejemplo, la amida, imida, o sulfona.

En general, cuando se utiliza un agente blanqueante, las composiciones de la presente invención pueden comprender de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 50 % o incluso de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 25 %, de agente blanqueante en peso de la composición de la invención limpiadora.

Las variantes de la enzima de la invención se pueden estabilizar usando agentes estabilizantes convencionales, y/o inhibidores de la proteasa por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol azucarado, sales tales como cloruro sódico y cloruro potásico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado del ácido fenilborónico tal como ácido 4-formilfenil borónico, o un aldehído péptido tal como aldehídos di-, tri- o tetrapéptidos o análogos de aldehído (bien en la forma de B1-B0-R en donde, R es H, CH₃, CX₃, CHX₂, o CH₂X (X=halógeno), B0 es un resto de aminoácido simple (preferiblemente con una cadena lateral alifática o aromática opcionalmente sustituida); y B1 consiste en uno o más residuos de aminoácidos (preferiblemente uno, dos o tres) que comprende opcionalmente un grupo protector de extremo N, o como se describe en WO09118375, WO98/13459) o un inhibidor de proteasa de tipo proteico tal como RASI, BASI, WASI (inhibidores bifuncionales de alfa-amilasa/subtilisina de arroz, cebada y trigo) o Cl2 o SSI. La composición se puede formular como se describe en, por ejemplo, WO 92/19709 y WO 92/19708 o US-6472364. En algunas modalidades, las enzimas empleadas en la presente invención se estabilizan por la presencia de fuentes solubles en agua de zinc (II), calcio (II) y/o iones (II) magnesio en las composiciones terminadas que proporcionan dichos iones a las enzimas, así como además otros iones de metal (p. ej., bario (II), escandio (II), hierro (II), manganeso (II), aluminio (III), estaño (II), cobalto (II), cobre (II), níquel (II), y oxovanadio(IV)).

La composición puede incluir además otros ingredientes detergentes convencionales tales como, por ejemplo, acondicionadores de tejidos incluidos arcillas, reforzadores de espuma, supresores de jabonaduras, agentes anticorrosión, agentes suspensores de la suciedad, agentes antirre deposición de la suciedad, tintes, bactericidas, abrillantadores ópticos, hidrótrofos, inhibidores del deslustre, disolventes orgánicos tales como etanol o perfumes. Además, el detergente podría incluir un pretratante o un reforzador, que se añade al lavado para aumentar el nivel general de limpieza; algunos de estos aditivos también se pueden utilizar como un agente de pretratamiento aplicado a la tela antes de la etapa de lavado.

Se contempla en este momento que se puede añadir a las composiciones detergentes cualquier enzima, en particular la enzima de la invención, en una cantidad correspondiente a 0,001-100 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, preferiblemente 0,005-5 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, más preferiblemente 0,01-1 mg de proteína enzimática por solución de lavado y en particular 0,1-1 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado. Sin embargo, las composiciones de la presente invención comprenden al menos 0,0001 a aproximadamente 0,1 % en peso de proteína enzimática pura, tal como de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 0,01 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,01 % o de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,01 %. Sin embargo, cuando se utiliza una enzima formulada, la composición detergente comprende de aproximadamente 0,02 % a aproximadamente 20 % en peso, tal como de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 15 % en peso, o de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 20 %, o de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 5 %, o de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 3 %.

Las variantes de alfa-amilasa útiles en la presente invención pueden incorporarse adicionalmente a las formulaciones detergentes descritas en WO 97/07202.

La composición detergente de la invención puede estar en cualquier forma conveniente, por ejemplo, una barra, un comprimido, un polvo, un gránulo, una pasta, un gel o un líquido. La composición puede ser un agente limpiador universal "de limpieza intensiva", una forma de pasta universal, un tipo líquido de limpieza intensiva, un líquido para tejidos delicados, un agente para el lavado manual de vajillas, un agente para lavado de vajillas de acción suave, un tipo muy espumante, un agente para lavavajillas automático, diferentes pastillas, un granulado para lavado de vajillas, un líquido para lavado de vajillas, y un producto de tipo auxiliar de enjuague. La composición puede incluir también envases en dosis unitaria, incluidos los conocidos en la técnica y los que son solubles en agua, insolubles en agua y/o permeables en agua. Un detergente líquido puede ser acuoso, conteniendo de forma típica un máximo de 70 % de agua y 0-30 % de disolvente orgánico, o bien no acuoso o bien una solución que contenía más de 0,5 g/l de la composición detergente.

La composición de la invención se puede formular, por ejemplo, como una composición detergente para lavado de ropa a mano o a máquina, incluida una composición aditiva para lavado de ropa adecuada para el pretratamiento de telas manchadas y una composición suavizante de tejidos añadida durante el aclarado, o bien formulada como una composición detergente para usar en operaciones de limpieza doméstica general de superficies duras, o bien se puede formular para operaciones de lavado de vajillas a mano o a máquina. El detergente puede ser una forma pulverulenta o granulada, o puede estar en la forma de un líquido, gel o pasta o bien en forma de un producto en dosis unitaria tal como una pastilla o una bolsa, incluidas las bolsas multicompartimentales, o bien el detergente puede estar en la forma de una lámina.

Ejemplo de composición detergente para lavado de ropa

Las siguientes son composiciones detergentes líquidas para lavado de ropa especialmente adecuadas para lavadoras de carga superior (1 y 2) y lavadoras de carga frontal (3), respectivamente.

Ingrediente	Composición		
	(% en peso de la composición)		
	1	2	3
Alquiletoxi(1,8)sulfato C ₁₂₋₁₅	14,7	11,6	
Alquilbenceno sulfonato C _{11,8}	4,3	11,6	8,3
Alquilsulfato ramificado C ₁₆₋₁₇	1,7	1,29	
Alquil C ₁₂₋₁₄ 9-etoxilato	0,9	1,07	
Óxido de dimetilamina C ₁₂	0,6	0,64	
Ácido cítrico	3,5	0,65	3
Ácido graso C ₁₂₋₁₈	1,5	2,32	3,6
Borato sódico (Bórax)	2,5	2,46	1,2
Alquil C ₁₂₋₁₄ etoxi 3 sulfato sódico			2,9
Alquil C ₁₄₋₁₅ 7-etoxilato			4,2
Alquil C ₁₂₋₁₄ 7-etoxilato			1,7
Formato de calcio	0,09	0,09	
Un compuesto que tiene la siguiente estructura general: bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)-bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n), en donde n = de 20 a 30, y x = de 3 a 8, o variantes sulfatadas o sulfonadas del mismo			1,2
Copolímero de injerto al azar ¹		1,46	0,5
Polietilenimina etoxilada ²	1,5	1,29	
Ácido dietilentriamino pentaacético	0,34	0,64	
Ácido dietilentriamina penta(metilenfosfónico)			0,3
Tinopal AMS-GX		0,06	
Tinopal CBS-X	0,2	0,17	
Polímero de limpieza de grasa alcoxilado anfifílico ³	1,28	1	0,4
Etanol	2	1,58	1,6
Propilenglicol	3,9	3,59	1,3
Dietilenglicol	1,05	1,54	
Polietilenglicol	0,06	0,04	
Monoetanolamina	3,05	2,41	0,4
NaOH	2,44	1,8	
Sulfonato de cumeno sódico			1
Formiato sódico		0,11	
Amilasas de esta invención (25 mg/g de sustancia activa)	0,4	0,7	0,5

Agua, componentes estéticos (Tintes, perfumes) y componentes minoritarios (enzimas, disolventes, estructurantes)	Resto	Resto	Resto
--	-------	-------	-------

- 1 El copolímero de injerto al azar es un copolímero de poli(óxido de etileno) injertado con acetato de polivinilo que tiene una cadena principal de poli(óxido de etileno) y múltiples cadenas laterales de acetato de polivinilo. El peso molecular de la cadena principal del poli(óxido de etileno) es de aproximadamente 6000 y la relación de peso del poli(óxido de etileno) a acetato de polivinilo es de aproximadamente 40 a 60 y no hay más de 1 punto de injerto por 50 unidades de óxido de etileno.
- 2 Polietilenimina (PM = 600) con 20 grupos etoxilados por -NH.
- 3 El polímero de limpieza de grasa anfifílico alcoxlado es una polietilenimina (PM = 600) con 24 grupos etoxilato por -NH y 16 grupos propoxilato por -NH

10 Ejemplos de detergentes para lavavajillas

Los siguientes ejemplos 4-8 de detergentes para lavavajillas son en forma de geles.

	4	5	6	7	8
	(% en peso)	(% en peso)	(% en peso)	(% en peso)	(% en peso)
Agente humectante ¹	1,0	1,3	0,8	1	0,9
Benzoato sódico (33 % de sustancia activa)	0,61	0,61	0,61	0,6	0,6
Goma de xantano	1,0	0,8	1,2	1	1,1
Sulfato de sodio	10,0	10,0	10,0	8	10
Perfume	0,03	0,05	0,03	0,06	0,1
Silicato de sodio	0	0	0	0	2
Ácido cítrico (50 % de sustancia activa)	12,5	0	11	0	12
GLDA	0	7	0	8	0
Savinase Ultra XL (44 mg de sustancia activa/g) ²	0,7	0	0,3	0	0
Ácido 4-formilfenilborónico	0	0	0,05	0	0
Proteasa encapsulada (10 mg/g) ³	0,0	2,0	0,0	0	0
FN3 líquido (48 mg de sustancia activa/g) ⁴	0,0	0,0	0	0,6	0
Pellets de Proteasa (123 mg de sustancia activa/g) ⁴	0	0	0	0	0,5
Etanol	0,0	0,0	0	0,3	0
Hidróxido de potasio (45 % activo)	14,6	14,6	14,6	14	0
Cloruro cálcico (25 % de sustancia activa)	1,8	1,8	1,8	1,1	0,4
Tinte	0,05	0,05	0,05	0,05	0,02
Proxcel GXL TM (19 % de sustancia activa) ⁸	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Acusol TM 820 ⁹	0,34	0,34	0,3	0,35	0,3
Acusol TM 425N (50 % de sustancia activa) ⁹	3,0	3,0	3,5	2,5	2
Amilasas de esta invención (25 mg/g de sustancia activa) ²	0,2	0,5	0,4	0,3	0,1
Agua y otros ingredientes adyuvantes:	Resto hasta 100 %	Resto hasta 100 %	Resto hasta 100 %	Resto hasta 100 %	Resto hasta 100 %

1 Comercializado con el nombre comercial Polytergent® SLF-18 por BASF, Ludwigshafen, Alemania.

2 Comercializado por Novozymes, Dinamarca.

3 Proteasa encapsulada de esta invención

4 Comercializado por Genencor International, California, EE. UU. Los pellets de proteasa adecuados son comercializados con los nombres comerciales FN3® y Properase®.

6 Comercializado por Alco Chemical, Tennessee, EE. UU.

7 Un polímero adecuado de este tipo es comercializado con el nombre comercial Aqualic TL de Nippon Shokubai, Japón.

8 Comercializado por Arch Chemicals Incorporated, Smyrna, Georgia, EE. UU.

9 Comercializado por Rohm and Haas, Philadelphia, Pennsylvania, EE. UU.

2.0R Silicate es suministrado por PQ Corporation, Malvern, PA, EE. UU.

El carbonato sódico es comercializado por Solvay, Houston, Texas, EE. UU.

5 Percarbonato sódico ($2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}_2$) suministrado por Solvay, Houston, Texas, EE. UU.

El hidroxietano-difosfonato (HEDP) es suministrado por Dow Chemical, Midland, Michigan, EE. UU.

Composiciones detergentes para vajillas

10 La enzima de la invención también puede utilizarse en composiciones detergentes para lavado de vajillas, incluidas las siguientes:

1) Composición para lavado de vajillas automático en polvo

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

2) Composición para lavado de vajillas automático en polvo

Tensioactivo no iónico (p. ej., etoxilato de alcohol)	1 - 2 %
Disilicato de sodio	2 - 30 %
Carbonato sódico	10- 50 %
Fosfonato sódico	0- 5 %
Citrato trisódico deshidratado	9- 30 %
Acetato de nitrilotrisodios (NTA)	0- 20 %
Monohidrato de perborato sódico	5-10 %
Tetraacetiletilendiamina (TAED)	1- 2 %
Polímero de poliacrilato (p. ej., copolímero de ácido maleico/ácido acrílico)	6- 25 %
Enzimas	0,0001 - 0,1 %
Perfume	0,1 - 0,5 %
Agua	5-10

20 3) Composición para lavado de vajillas automático en polvo

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

4) Composición para lavado de vajillas automático en polvo

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

5) Composición para lavado de vajillas automático en polvo

Tensioactivo no iónico	1 - 7 %
Disilicato de sodio	18-30 %
Citrato trisódico	10 - 24 %
Carbonato sódico	12 - 20 %
Monopersulfato (2 KHSO ₅ .KHSO ₄ .K ₂ SO ₄)	15-21 %
Estabilizante del blanqueador	0,1- 2 %
Copolímero de ácido maleico/ácido acrílico	0 - 6 %
Pentaacetato de dietilentriamina, sal pentasódica	0- 2,5 %
Enzimas	0,0001 - 0,1 %
Sulfato sódico, agua	Resto

5 6) Composición de lavado de vajillas en polvo y líquida con sistema tensioactivo de limpieza

Tensioactivo no iónico	0- 1,5 %
N-óxido de octadecil dimetilamina dihidrato	0 - 5 %
Mezcla 80:20 C 18/C16 en peso de N-óxido de octadecil dimetilamina dihidrato y N-óxido de hexadecildimetilamina	0 - 4 %
Mezcla 70:30 C 18/C16 en peso de N-óxido de octadecil bis(hidroxietil)amina anhidro y N-óxido de hexadecil bis(hidroxietil)amina anhidro	0- 5 %
Alquil etoxisulfato C ₁₃ -C ₁₅ con un grado promedio de etoxilación de 3	0 -10 %
Alquil etoxisulfato C ₁₂ -C ₁₅ con un grado promedio de etoxilación de 3	0 - 5 %
Alcohol etoxilado C ₁₃ -C ₁₅ con un grado promedio de etoxilación de 12	0 - 5 %
Una mezcla de alcoholes etoxilados C ₁₂ -C ₁₅ con un grado promedio de etoxilación de 9	0 - 6,5 %
Una mezcla de alcoholes etoxilados C ₁₃ -C ₁₅ con un grado promedio de etoxilación de 30	0 - 4 %
Disilicato de sodio	0 - 33 %
Tripolifosfato de sodio	0 - 46 %
Citrato sódico	0 - 28 %
Ácido cítrico	0 - 29 %
Carbonato sódico	0 - 20 %
Monohidrato de perborato sódico	0-11,5 %
Tetraacetiletilendiamina (TAED)	0 - 4 %
Copolímero de ácido maleico/ácido acrílico	0 - 7,5 %
Sulfato sódico	0 - 12,5 %
Enzimas	0,0001 - 0,1 %

7) Composición líquida para lavado de vajillas automático no acuosa

Tensioactivo no iónico líquido (p. ej., etoxilados de alcohol)	2,0-10,0 %
Silicato de metal alcalino	3,0-15,0 %
Fosfato de metal alcalino	0- 40,0 %
Vehículo líquido seleccionado de glicoles, poliglicoles, polióxidos, glicoléteres superiores	25,0- 45,0 %
Estabilizante (p. ej., un éster parcial de ácido fosfórico y un alcohol C ₁₆ -C ₁₈)	0,5- 7,0 %
Supresor de la espuma (p. ej., silicona)	0- 1,5 %
Enzimas	0,0001 - 0,1 %

8) Composición líquida de lavado de vajillas no acuosa

Tensioactivo no iónico líquido (p. ej., etoxilados de alcohol)	2,0-10,0 %
Silicato de sodio	3,0- 15,0 %
Carbonato de metal alcalino	7,0- 20,0 %
Citrato sódico	0,0- 1,5 %
Sistema estabilizante (p. ej., mezclas de silicona finamente dividida y dialquil poliglicol éteres de bajo peso molecular)	0,5- 7,0 %
Polímero de poliacrilato de bajo peso molecular	5,0 -15,0 %
Espesante de gel de arcilla (p. ej., bentonita)	0,0-10,0 %
Polímero de hidroxipropilcelulosa	0,0- 0,6 %
Enzimas	0,0001 - 0,1 %
Vehículo líquido seleccionado de glicoles, poliglicoles, polióxidos, y glicoléteres superiores	Resto

5 9) Composición líquida tixotrópica para lavado de vajillas automático

Ácido graso C ₁₂ -C ₁₄	0 - 0,5 %
Tensionactivo de copolímero en bloques	1,5-15,0 %
Citrato sódico	0 - 12 %
Tripolifosfato de sodio	0 -15 %
Carbonato sódico	0 - 8 %
Triestearato de aluminio	0- 0,1 %
Cumenosulfonato de sodio	0- 1,7 %
Espesante de poliacrilato	1,32- 2,5 %
Poliacrilato de sodio	2,4- 6,0 %
Ácido bórico	0 - 4,0 %
Formiato sódico	0 - 0,45 %
Formato de calcio	0- 0,2 %
N-decildifenilóxido disulfonato sódico	0 - 4,0 %
Monoetanolamina (MEA)	0- 1,86 %
Hidróxido sódico (50 %)	1,9- 9,3 %
1,2-propanodiol	0- 9,4 %
Enzimas	0,0001 - 0,1 %
Supresor de las jabonaduras, tinte, perfumes, agua	Resto

10) Composición líquida para lavado de vajillas automático

Alcohol etoxilado	0 - 20 %
Sulfonato de éster de ácido graso;	0 - 30 %
Sulfato de dodecilo sódico	0 - 20 %
Alquilpoliglucósido	0 - 21 %
Ácido oléico	0 -10 %
Disilicato sódico monohidratado	0 - 33 %
Citrato sódico dihidratado	0 - 33 %
Estearato sódico	0 - 2,5 %
Monohidrato de perborato sódico	0 -13 %
Tetraacetiletilendiamina (TAED)	0- 8 %

Copolímero de ácido maleico/ácido acrílico	4- 8 %
Enzimas	0,0001 - 0,1 %

11) Composición líquida para lavado de vajillas automático que contiene partículas de blanqueador protegidas

Silicato de sodio	5 -10 %
Pirofosfato tetrapotásico	0 - 25 %
Trifosfato sódico	0 - 2 %
Carbonato potásico	4- 8 %
Partículas de blanqueador protegido, por ejemplo, cloro	5 - 10 %
Espesante polimérico	0,7- 1,5 %
Hidróxido de potasio	0 - 2 %
Enzimas	0,0001 - 0,1 %
Agua	Resto

5 12) Composiciones para lavado de vajillas automático como se describe en 1), 2), 3), 4), 6) y 10), en donde el perborato 5 se sustituye por percarbonato.

10 13) Composiciones para lavado de vajillas automático como se describe en 1) - 6) que de forma adicional contienen un catalizador de manganeso. El catalizador de manganeso puede, por ejemplo, ser uno de los compuestos descritos en "Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching", Nature, 369, 1994, pp. 637-639.

La presente invención está también dirigida a métodos de uso de composiciones que comprenden las variantes de alfa-amilasa para la limpieza.

15 La alfa-amilasa variante según la reivindicación 1 se incorpora a composiciones detergentes, por ejemplo a composiciones detergentes para lavado de ropa, por ejemplo composiciones detergentes para lavado doméstico de ropa, especialmente composiciones detergentes líquidas para lavado de ropa. Especialmente, la composición detergente comprende al menos un agente quelante y la composición detergente comprende adyuvantes/ingredientes detergentes convencionales tales como tensioactivos (aniónicos, catiónicos, no iónicos, de ion híbrido, anfóteros),
20 aditivos reforzantes de la detergencia, blanqueadores, polímeros, otras enzimas y otros ingredientes, p. ej., como se describe en W02007/130562 y W02007/149806. Por tanto, en un aspecto útil de la presente invención, se proporciona un método de limpieza que comprende añadir a un proceso de limpieza una composición según la invención. En realizaciones preferidas, dicho proceso de limpieza se selecciona del grupo que consiste en al menos una etapa de limpieza en un proceso de limpieza de lavado de ropa, lavado de vajillas, industrial o institucional.

25 Debido a su actividad en valores de pH alcalinos, las α -amilasas de la invención son muy adecuadas para su uso en diversos procesos industriales, en particular, la enzima encuentra posibles aplicaciones como componente en composiciones detergentes para lavado, lavado de vajillas y limpieza de superficies duras, pero también puede ser útil en la producción de edulcorantes y etanol a partir de almidón. Las condiciones para los procesos
30 convencionales de conversión de almidón y procesos de licuefacción y/o sacarificación se describen, por ejemplo, en las publicaciones de patente US-3.912.590 y en las publicaciones de patente EP 252.730 y 63.909.

Materiales y métodos

35 Enzimas:

SP722: Id. de sec. n.º: 6, comercializada por Novozymes, y descrita en WO 95/26397.

SP707 o n.º 707: Id. de sec. n.º 8

40 AA560: Id. de sec. n.º 10

Métodos generales de biología molecular:

45 Salvo que se indique lo contrario, las manipulaciones y transformaciones de ADN se llevan a cabo utilizando métodos estándar de biología molecular (Sambrook y col. (1989); Ausubel y col. (1995); Harwood and Cutting (1990).

Fermentación de alfa-amilasas y variantes

50 La fermentación puede llevarse a cabo mediante métodos bien conocidos en la técnica o del siguiente modo. Una cepa de *B. subtilis* que contiene el plásmido de expresión relevante se siembra sobre una placa de medio CL con un

antibiótico relevante, y se cultiva durante la noche a 37 °C. Las colonias se transfieren a 100 ml de medio BPX suplementado con un antibiótico relevante (por ejemplo, cloranfenicol a 10 mg/1) en un matraz de agitación de 500 ml.

Composición del medio BPX:

5	Almidón de patata	100	g/1
	Harina de cebada	50	g/1
	BAN 5000 SKB	0,1	g/1
	Caseinato sódico	10	g/1
	Harina de semilla de soja	20	g/1
	Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	9	g/1
	Agente antiespumante	0,1	g/1

El cultivo se agita a 37 °C a 270 rpm durante 4 a 5 días.

10 Las células y residuos celulares se retiran del caldo de fermentación por centrifugación a 4.500 rpm en 20-25 minutos. Posteriormente, el sobrenadante se filtra para obtener una solución completamente transparente. El filtrado se concentra y se lava sobre un filtro de UF (una membrana de corte 10.000) y el tampón se cambia a acetato 20 mM a pH 5,5, por ejemplo, mediante diálisis o filtración en gel. El filtrado de UF se aplica en una S-sepharose F.F. (General Electric, Intercambio de cationes, Matriz: agarosa reticulada, grupo funcional: -OCH₂CHOHCH₂OCH₂CH₂CH₂SO₃) y la elución se lleva a cabo mediante elución por etapas con NaCl 0,2 M en el mismo tampón. El eluato se dializa frente a

15 Tris 10 mM (2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol), pH 9,0 y se aplica en una Q-sepharose F.F. (General Electric, intercambio aniónico, matriz: agarosa reticulada, grupo funcional: -OCH₂CHOHCH₂OCH₂CHOHCH₂N⁺(CH₃)₃) y se eluye con un gradiente lineal de NaCl 0-0,3 M con 6 volúmenes de columna. Se recogen las fracciones, que contienen la actividad (medida mediante el ensayo EnzCheck), se ajusta el pH a pH 7,5 y se elimina el color restante mediante un

20 tratamiento con carbón activo al 0,5 % p/vol. en 5 minutos. Puede además ser ventajoso añadir otra etapa de cambio de tampón, p. ej., mediante diálisis o filtración en gel a un sistema de tampón que no afecta al resultado del lavado en sí mismo, p. ej., a un tampón EPPS, un tampón glicina, un tampón acetato o similares, preferiblemente con una pequeña concentración de calcio (p. ej., 0,1 mM) para estabilizar la amilasa durante el almacenamiento y aproximadamente un 0,01 % de Triton X-100 para reducir el riesgo de adsorción de proteína enzimática a recipientes y pipetas.

25 Detergente modelo

Composición de detergente modelo A:

Compuesto	Cantidad g/100 g	ingrediente activo %
	Tensioactivos	
Na-LAS (92 %) (Nacconol 90G) (aniónico) (alquilbencenosulfonato lineal)	10,87	10
STEOL CS-370E (70 %) (aniónico), CH ₃ (CH ₂) _m - (OCH ₂ CH ₂) ₃ -OSO ₃ ⁻ , donde m=11-13	7,14	5
Bio-soft N25-7 (99,5 %) (no iónico): CH ₃ (CH ₂) _m - (OCH ₂ CH ₂) ₇ -OH, donde y m=11-14	5	5
Ácido oleico (ácido graso)	2	2
	Disolventes	
H ₂ O	62	65
Etanol	0,5	0,5
STS [p-tolueno sulfonato sódico (40 %)]	3,75	1,5
Monopropilenglicol	2	2
	Aditivo reforzante de la detergencia	
Citrato trisódico	4	4
Trietanolamina (TEA)	0,5	0,5
	Estabilizante	
Ácido bórico	1,5	1,5
	Componentes minoritarios	
NaOH 10 N (para ajuste a pH 8,5)	0,8	0,8

Composición de detergente modelo B:

Compuesto	Cantidad g/100 g	ingrediente activo %
	Tensioactivos	
Na-LAS (92 %) (Nacconol 90G) (aniónico)	10,87	10
STEOL CS-370E (70 %) (aniónico)	7,14	5
Bio-soft N25-7 (99,5 %) (no iónico)	5	5
Ácido oleico (ácido graso)	2	2
	Disolventes	
H ₂ O	62	65
Etanol	0,5	0,5
STS [p-tolueno sulfonato sódico (40 %)]	3,75	1,5
Monopropilenglicol	2	2
	Aditivo reforzante de la detergencia	
Ácido dietilentriamino pentaacético (DTPA)	1,5	1,5
Trietanolamina (TEA)	0,5	0,5
	Estabilizante	
Ácido bórico	1,5	1,5
	Componentes minoritarios	
NaOH 10 N (para ajuste a pH 8,0)	0,8	0,8

5 Ensayo de medición de iones calcio libres

El siguiente ensayo puede utilizarse para la medición de iones calcio libres en solución y por tanto para la determinación de la capacidad de los agentes quelantes (quelantes) para reducir la concentración de iones calcio libres (Ca^{2+}) de, p. ej., 2,0 mM a 0,10 mM a pH 8.

10

Principio de ensayo:

Se añaden diversas cantidades de quelantes a una solución de Ca^{+2} 2,0 mM y la concentración de Ca^{+2} libres se determina utilizando un electrodo selectivo de iones calcio a pH y temperatura fijos. La concentración de quelante necesaria para reducir la concentración de calcio libre de 2,0 mM a 0,10 mM puede determinarse a partir de una representación de la concentración de calcio libre medida frente a la concentración de quelante. En el presente ensayo, la concentración de quelante necesaria para reducir la concentración de calcio libre de 2,0 mM a 0,10 mM se mide a pH 8, a 21 °C, en cloruro potásico y EPPS 49 mM.

15

20 Soluciones:

Solución de electrolito: Cloruro de potasio 4 M en agua ultrapura (agua Milli-Q).

Tampón pH 8: EPPS 50 mM (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazina-1-propanosulfónico) ajustado a pH 8,0 utilizando cantidades mínimas de hidróxido sódico 1 N.

25

Solución madre de calcio: 25 mM Ca^{2+} en tampón de pH 8, preparado a partir de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Solución madre de quelante: Quelante 15 mM (con respecto a quelante seco al 100 %) en tampón de pH 8, reajustado a pH 8,0 utilizando cantidades mínimas de NaOH 1 M o HCl 1 M.

30

Se utiliza agua ultra pura (agua Milli Q) para la preparación de todos los tampones y soluciones.

Equipo:

Electrodo selectivo de iones calcio de Thermo Scientific (n. °Cat. 9720BNWP) calibrado frente a una solución patrón de cloruro cálcico. El electrodo se calibra según describen las directrices correspondientes al electrodo.

35

Procedimiento:

Se prepara una serie de viales, conteniendo cada uno 4 ml de solución madre de calcio (concentración final 2,0 mM), 1 ml de solución electrolítica (concentración final 80 mM de cloruro de potasio), solución madre de

40

quelante en diversas cantidades (0 - 45 ml) y utilizando el tampón de pH 8 para ajustar el volumen total a 50 ml. La concentración final de EPPS en el ensayo es de 49 mM.

Después del mezclado, la concentración de Ca^{2+} libre se mide con el electrodo de calcio. La concentración de calcio libre debería determinarse en una cantidad suficiente de concentraciones de quelante diferentes para cada quelante ensayado, asegurándose de que el conjunto de datos cubra todo el intervalo de 2,0 mM de iones calcio libres a un valor inferior a 0,10 mM o que la concentración final de quelante en el ensayo sea superior a 10,0 mM. Un número adecuado de puntos de datos es 8 o más. La concentración de quelante requerida para reducir los iones calcio libres de 2,0 mM iniciales a 0,10 mM se obtiene de una representación gráfica de la concentración de iones calcio libres medida frente a la concentración de quelante por interpolación.

Las soluciones se equilibran hasta la temperatura deseada, que en el presente ensayo es de 21 °C.

Determinación de log K

Los agentes quelantes también pueden caracterizarse por la constante de unión del agente quelante (quelante) e iones calcio. Esta constante puede determinarse mediante ITC (calorimetría isotérmica de titulación) como se describe en AD Nielsen, CC Fuglsang y P Westh, *Analytical Biochemistry* vol. 314 (2003) pp. 227-234 y T Wiseman, S Williston, JF Brandts y L-N Lin, *Analytical Biochemistry* vol. 179 (1989) pp. 131-137.

Toda la cristalería y botellas de plástico utilizadas se lavan con una solución de EDTA al 1 % (p/p) y posteriormente se aclaran completamente en agua ultrapura tratada Chelex 100 (agua Milli-Q). Las soluciones se almacenan en botellas de plástico y se mantienen a 5 °C hasta su uso.

Tampones:

HEPES 20 mM (ácido 2-[4-(2 hidroxietil)-1-piperazinil]-etanosulfónico), pH 8 preparado con agua ultrapura (agua Milli-Q)

Glicina 20 mM, pH 10 preparada con agua ultrapura (agua Milli-Q)

Soluciones:

- Quelante 125 µM en HEPES 20 mM, pH 8 o quelante 125 µM quelante en glicina 20 mM, pH 10
- CaCl_2 4 mM en HEPES 20 mM, pH 8 o CaCl_2 4 mM en glicina 20 mM, pH 10
- Agua ultrapura (agua Milli-Q)

Todos los tampones se pasan a través de columnas Quelex 100 (Sigma Aldrich C-7901, matriz 1 %, matriz de poliestireno reticulado, grupo activo ácido iminodiacético (forma sódica) unión de matriz a través del grupo metilo a anillos aromáticos) para eliminar los iones calcio. Todas las soluciones se desgasifican mediante agitación al vacío antes de los experimentos.

Instrumento:

MCS ITC (MicroCal Inc., Northampton, MA, EE. UU.)

Procedimiento

La celda de referencia se llena con agua ultrapura (agua Milli-Q). La celda de muestra se llena con la solución quelante al pH seleccionado y la jeringa se llena con la solución de calcio al pH seleccionado. Las soluciones se equilibran hasta la temperatura deseada, por ejemplo, 19 °C.

A continuación, la solución quelante de la celda de muestra se valora volumétricamente con 30-40 alícuotas de 8 µl de la solución de calcio.

Las señales obtenidas de la ITC se integran a continuación utilizando el software Origin proporcionado por MicroCal Inc. Para obtener las isotermas de unión, se elaboran rutinas de regresión utilizando el mismo paquete informático. A continuación, estos datos se ajustan a un modelo utilizando las rutinas incorporadas al software Origin. Actualmente se prefiere el modelo de "OneSites" que proporciona el mejor ajuste para la mayoría de los agentes quelantes habitualmente utilizados, es decir, los residuos se distribuyen uniformemente alrededor de cero. A partir del valor K se calcula el log K como el logaritmo (base 10) del valor K.

Ensayos para determinar la capacidad limpiadora

Para evaluar la capacidad limpiadora de las variantes de alfa-amilasa en una composición detergente, pueden realizarse experimentos de lavado. Las enzimas se someten a ensayo utilizando el Automatic Mechanical Stress Assay

(Ensayo automático de esfuerzo mecánico - AMSA) o la prueba de capacidad de lavado, utilizando vasos de precipitados. Con la prueba AMSA, puede examinarse la capacidad limpiadora de una gran cantidad de soluciones detergentes que contienen enzima de pequeño volumen. La placa AMSA tiene una serie de ranuras para soluciones de ensayo y una tapa que presiona con firmeza la muestra de tejido a lavar contra todas las aberturas de las ranuras.

5 Durante el tiempo de lavado, la placa, soluciones de ensayo, tela y tapa, se agitan intensamente para poner la solución de ensayo en contacto con la tela y aplicar tensión mecánica de una forma periódica oscilante. Para una descripción adicional, ver WO02/42740, especialmente el párrafo "Special method embodiments (Realizaciones especiales del método)" en la página 23-24.

10 Descripción general de la capacidad limpiadora:

Se preparó una solución de ensayo que comprendía agua (15°dH), detergente 0,8 g/l, por ejemplo, detergente A o B como se ha descrito anteriormente, o HCO₃⁻ 50 mM, y la enzima de la invención, por ejemplo, a una concentración de 0, 0,2, 0,4, 0,8 y/o 1,2 mg de proteína enzimática/l. Las telas manchadas con almidón (por ejemplo, CS-28 del Center For Testmaterials BV, P.O. Box 120, 3133 KT, Vlaardingen, Países Bajos) se añaden y lavan durante 30 minutos a 20 °C. Después del enjuague completo bajo agua corriente y secado en la oscuridad, se miden posteriormente los valores de intensidad de luz o de reflectancia de las telas manchadas como una medida de la capacidad limpiadora. El ensayo con 0 mg de proteína enzimática/l se utilizó como blanco para obtener un valor de remisión delta. Preferiblemente se aplica acción mecánica durante la etapa de lavado, por ejemplo, en forma de agitación, giro o revolución de la solución de lavado con el tejido.

Los experimentos de capacidad limpiadora con AMSA pueden llevarse a cabo en las condiciones experimentales especificadas a continuación:

Detergente	Detergente modelo A o B
Dosificación de detergente	0,8 g/l
Volumen de la solución de ensayo	160 micro l
pH	Tal cual
Tiempo de lavado	30 minutos
Temperatura	20 °C
Dureza del agua	15°dH
Concentración de enzima en la solución de ensayo	0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2 mg/l
Material de ensayo	CS-28 (Almidón de arroz sobre algodón)

25 La dureza del agua se ajustó a 15°dH mediante la adición de CaCl₂, MgCl₂, y NaHCO₃ (Ca²⁺:Mg²⁺:HCO₃⁻ = relación molar 4:1:7,5) al sistema de ensayo. Tras el lavado, los tejidos se enjuagaron con agua corriente y se secaron en la oscuridad.

30 La capacidad de la variante enzimática se mide como el brillo del color de la tela lavada con esa amilasa específica. El brillo también se puede expresar como la intensidad de la luz reflejada desde la muestra cuando se ilumina con luz blanca. Cuando la muestra se mancha, la intensidad de la luz reflejada es menor al de la muestra limpia. Por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada puede utilizarse para medir la capacidad limpiadora de una amilasa.

35 Las mediciones de color se realizan con un escáner horizontal profesional (Kodak iQsmart, Kodak), que se utiliza para capturar una imagen del tejido lavado.

40 Para extraer un valor de intensidad de la luz a partir de las imágenes escaneadas, los valores de píxel de 24 bits de la imagen se convierten a valores de rojo (r), verde (g) y azul (b), también conocidos como valor de RGB. El valor de intensidad (Int) se calcula sumando los valores de RGB entre sí como vectores y tomando a continuación la longitud del vector resultante:

$$Int = \sqrt{r^2 + g^2 + b^2}$$

45 *Tejidos:* Las muestras de tejidos CS-28 (almidón de arroz sobre algodón) pueden obtenerse del Center For Test materials BV, P.O. Box 120, 3133 KT Vlaardingen, Países Bajos.

50 La prueba de capacidad limpiadora utilizando vasos de precipitados es un ensayo en un modelo a pequeña escala de una lavadora de carga superior, y se utiliza para evaluar la eficacia de lavado de las amilasas. La prueba de capacidad limpiadora en vaso de precipitados, en la que se utilizan vasos de precipitados de 250 ml y un agitador de paletas que proporciona un movimiento oscilante de rotación, 180° en cada dirección, con una frecuencia de 80 por minuto, comprende las siguientes etapas: proporcionar 100 ml de solución de lavado (6 °C, 15° dH, pH 8,0) que contiene NaHCO₃ 50 mM y enzima a 0,4 mg/l; agregar dos muestras de CS-28 (5x5 cm) y dos muestras de EMPA 162 (5x5 cm) a la solución de lavado para comenzar el lavado; configurar la velocidad de agitación a 80 rpm; detener la agitación al cabo de 60 minutos, aclarar las muestras con agua corriente fría; secar

las muestras aclaradas en la oscuridad durante la noche; y evaluar la capacidad limpiadora midiendo la remisión de la luz incidente a 460 nm utilizando Color Eye como se describe a continuación.

Equipo y materiales

Baño de agua (5 °C) con circulación; Vasos de precipitados de vidrio (250 ml); un brazo giratorio por vaso de precipitados con capacidad de 100 ml de solución de lavado; muestras de ensayo: CS-28 (almidón de arroz sobre algodón) del Center for Testmaterials BV, Vlaardingen, Países Bajos y EMPA 162 (almidón de arroz sobre algodón/poliéster) de EMPA Testmaterials AG, St. Gallen, Suiza, las muestras se cortan en 5x5 cm.

Solución de lavado: solución tampón de NaHCO_3 50 mM, pH 8,0, dureza del agua: 15° dH, relación Calcio:Magnesio de 4:1.

Solución madre de amilasa: 1 mg de proteína enzimática por ml. - Se utiliza una solución de 0,1 % (p/v) de Triton-x-100 y CaCl_2 0,1 mM en agua ultrapura (agua MilliQ) para la dilución de amilasa (regulador de dilución de amilasa).

Medición con Color Eye

La capacidad limpiadora se expresa como un valor de remisión delta (ΔRem). Las evaluaciones de reflectancia de luz de las muestras se realizaron con un espectrofotómetro de reflectancia Macbeth Color Eye 7000 con una abertura oval muy pequeña, es decir, $0,7 \text{ cm}^2$ ($\sim 0,7 \times 1,0 \text{ cm}$). Las mediciones se realizaron sin UV en la luz incidente y se extrajo la remisión a 460 nm. La muestra a medir se puso encima de otra muestra del mismo tipo antes de medirla para reducir el reflejo del pistón que empuja la muestra hacia arriba contra la abertura de medición. Los valores de remisión Delta se calcularon para muestras individuales restando el valor de remisión de la muestra lavada sin la amilasa añadida (control) del valor de remisión de la muestra lavada con amilasa.

Ensayos para la medición de la actividad amilolítica (actividad de alfa-amilasa)

Ensayo EnzChek

La actividad amilasa o la actividad amilasa residual pueden determinarse mediante el siguiente ensayo EnzCheck. El sustrato es un derivado de almidón de maíz, almidón DQ™ (conjugado de almidón de maíz BODIPY FL), que es almidón de maíz marcado con tinte BODIPY® FL (ácido 4,4-difluoro-5,7-dimetil-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacen-3-propiónico) en una medida tal que la fluorescencia se inactiva. Un vial que contiene aprox. 1 mg de sustrato liofilizado se disuelve en 100 μl de acetato sódico 50 mM pH 4,0. El vial se agita en vórtex durante 20 segundos y se deja a temperatura ambiente, en la oscuridad, con mezclado ocasional hasta que se disuelve. A continuación se añaden 950 μl de acetato sódico 10 mM, Triton X100 ((polietilenglicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-feniléter 0,01 % (p/v) ($\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ (n = 9-10)), pH 5,0, se agita bien en vórtex y se almacena a temperatura ambiente, en la oscuridad hasta que esté lista para el uso. Partiendo de 1 ml de esta solución, se preparó la solución de trabajo de sustrato mezclando con 5 mL de HEPES 50 mM, Triton X100 0,01 % (p/v), CaCl_2 1 mM, pH 7,0.

El detergente que contiene enzima se diluye a una concentración de 15 ng de proteína enzimática/ml (dilución de 6826,7 veces) en HEPES 50 mM, Triton X100 0,01 %, CaCl_2 1 mM, pH 7,0. Para el ensayo, se mezclan 25 μl de la solución de trabajo de sustrato durante 10 segundos con 25 μl de la enzima diluida en una placa de microtitulación de 384 pocillos negra. Se mide la intensidad de fluorescencia (excitación: 485 nm, emisión: 555 nm) una vez cada dos minutos durante 30 minutos en cada pocillo a 25 °C y se calcula $V_{\text{máx}}$ como la pendiente de la representación gráfica de intensidad de la fluorescencia frente al tiempo. El gráfico debe ser lineal y la prueba de actividad residual debe ajustarse de modo que la solución enzimática de referencia diluida esté dentro del intervalo lineal del ensayo de actividad.

En algunos casos, existe una interferencia significativa del detergente sin amilasa en el ensayo. En estos casos pueden utilizarse ensayos de amilasa alternativos. La interferencia de un detergente en un ensayo de amilasa puede analizarse añadiendo una cantidad conocida de amilasa al detergente en dos concentraciones y midiendo a continuación la actividad de ambas muestras. Si la diferencia en las actividades medidas corresponde a las diferencias en los niveles entre las amilasas añadidas, el ensayo puede utilizarse para determinar la actividad residual de la amilasa después del almacenamiento.

Ensayo PNP-G7

La actividad alfa-amilasa puede determinarse según un método en el que se emplea el sustrato PNP-G7. PNP-G7, que es una abreviatura de 4,6-etiliden(G7)-p-nitrofenil(G1)- α ,D-maltoheptaósido, un oligosacárido bloqueado que se puede escindir con una endoamilasa, tal como una alfa-amilasa. Tras la escisión, la alfa-glucosidasa incluida en el kit digiere adicionalmente el sustrato hidrolizado liberando una molécula de PNP libre que tiene color amarillo y que por tanto puede medirse por espectrometría en el visible a $\lambda=405 \text{ nm}$ (400-420 nm). Los kits que contienen sustrato PNP-G7 y alfa-glucosidasa son fabricados por Roche/Hitachi (n. °Cat. 11876473).

Reactivos:

El sustrato G7-PNP de este kit contiene 4,6-etiliden- G7-PNP 22 mM y HEPES (ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperazinil]-etanosulfónico), pH 7,0) 52,4 mM.

El reactivo alfa-glucosidasa contiene HEPES 52,4 mM, NaCl 87 mM, MgCl₂ 12,6 mM, CaCl₂ 0,075 mM $\geq$ 4 kU/l de alfa-glucosidasa).

La solución de sustrato de trabajo se prepara mezclando 1 ml del reactivo alfa-glucosidasa con 0,2 ml del sustrato G7-PNP. Esta solución de sustrato de trabajo se prepara inmediatamente antes de usar.

Tampón de dilución: EPPS 50 mM, Triton X100 [polietilenglicol p-(1,1,3,3-tetrametilbutil) -feniléter (C₁₄H₂₂O(C₂H₄O)_n (n = 9-10))] 0,01 % (p/v), CaCl₂ 1 mM, pH7,0.

Procedimiento:

La muestra de amilasa a analizar se diluyó en tampón de dilución para garantizar que el pH de la muestra diluida es 7. El ensayo se llevó a cabo transfiriendo 20 μ l de muestras de enzima diluida a una placa de microtitulación de 96 pocillos, y añadiendo 80 μ l de solución de trabajo de sustrato. La solución se mezcló y se preincubó durante 1 minuto a temperatura ambiente y se midió la absorción cada 20 s durante 5 minutos a una DO de 405 nm.

La pendiente (absorbancia por minuto) en la curva de absorción dependiente del tiempo es directamente proporcional a la actividad específica (actividad por mg de enzima) de la alfa-amilasa en cuestión en el conjunto de condiciones dado. La muestra de amilasa se debe diluir hasta un nivel en el que la pendiente está por debajo de 0,4 unidades de absorbancia por minuto.

Determinación del punto porcentual (pp)

La mejora en puntos porcentuales (pp) en la actividad residual (estabilidad) de la variante con respecto al precursor se calcula como la diferencia entre la actividad residual de la variante y la actividad residual del precursor, es decir, la actividad residual de la variante menos la actividad residual de la parental.

Ejemplos

En los siguientes ejemplos, las variantes comprenden al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183 o 184 y que comprenden además una sustitución en las posiciones 195, 206 y 243, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º: 6 son según la invención, otros ejemplos son ilustrativos.

Ejemplo 1: Preparación de variantes

Las variantes de amilasa de id. de sec. n.º: 6 SP722 se prepararon mediante procedimientos estándar, en resumen: Introduciendo mutaciones aleatorias y/o dirigidas a sitio en el gen, transformando células huésped de *Bacillus subtilis* con los genes mutados, cultivando las células huésped transformadas (por ejemplo, como se describe en el ejemplo 1 de WO 2004/111220) y purificando la amilasa a partir del caldo de fermentación. La amilasa de referencia (id. de sec. n.º: 6) se produjo mediante procesos de recombinación en *Bacillus subtilis* de modo similar.

Ejemplo 2 Caracterización de agentes quelantes

Ejemplo 2a:

Medición de iones calcio libres

Los agentes quelantes (quelantes) pueden clasificarse por su capacidad para reducir la concentración de iones calcio libres (Ca²⁺) de 2,0 mM a 0,10 mM a pH 8, medición desarrollada a partir de un método descrito por M.K. Nagarajan y col., JAOCS, vol. 61, n.º 9 (septiembre 1984), pp. 1475-1478. Se utilizó el ensayo descrito anteriormente en "Materiales y Métodos" para medir los iones calcio libres.

Por tanto, se determinó la concentración de quelante necesaria para reducir la dureza del agua de 2,0 mM a 0,10 mM como se ha descrito anteriormente. El experimento se llevó a cabo con el tampón de pH 8 a 21 °C.

Las concentraciones finales de quelante utilizadas y la concentración de Ca²⁺ libre medida se muestran a continuación en la Tabla I.

Tabla I

Concentración de Ca²⁺ libre determinada en una mezcla de Ca²⁺ 2,0 mM y varias cantidades de agente quelante a pH 8.

ml Solución madre de calcio	ml Solución de electrolito	ml Tampón pH 8	ml quelante	mM concentración final de quelante
4	1	45,0	0,0	0,00
4	1	44,0	1,0	0,30
4	1	43,0	2,0	0,60
4	1	41,0	4,0	1,20
4	1	39,0	6,0	1,80
4	1	38,5	6,5	1,95
4	1	38,0	7,0	2,10
4	1	37,5	7,5	2,25
4	1	37,0	8,0	2,40
4	1	36,5	8,5	2,55
4	1	36,0	9,0	2,70
4	1	35,5	9,5	2,85
4	1	35,0	10,0	3,00
4	1	32,5	12,5	3,75
4	1	30,0	15,0	4,50
4	1	25,0	20,0	6,00
4	1	20,0	25,0	7,50
4	1	15,0	30,0	9,00
4	1	10,0	35,0	10,50

A partir de estos datos, la concentración de agente quelante necesaria para reducir la concentración de Ca^{2+} libre de 2,0 mM a menos de 0,10 mM se determinó por interpolación y los resultados se presentan en la Tabla II.

Se caracterizaron una serie de quelantes utilizando este ensayo, y en la tabla II se muestran las concentraciones de quelante necesarias para reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a pH 8,0 en tampón EPPS 49 mM y cloruro potásico 80 mM.

Tabla II

	mM	Con respecto a citrato
Citrato	8,36	1,00
EGTA	2,60	0,33
EDTA	1,90	0,21
HEDP	1,60	0,20
DTPA	1,87	0,24
DTPMP	1,17	0,15
MGDA	2,56	0,33

Ejemplo 2b.

15 Determinación de log K

De forma alternativa, los agentes quelantes pueden caracterizarse mediante la constante de unión del agente quelante (quelante) y los iones calcio. Esta constante puede determinarse mediante ITC (calorimetría isotérmica de titulación) como se describe en AD Nielsen, CC Fuglsang y P Westh, Analytical Biochemistry vol. 314 (2003) pp. 227-234 y T Wiseman, S Williston, JF Brandts y L-N Lin, Analytical Biochemistry vol. 179 (1989) pp. 131-137. El procedimiento para determinar el log K se describe utilizando este procedimiento, los siguientes valores log K se determinaron a pH 10 (ver la Tabla III):

Tabla III

	LogK	Log K con respecto a log K para el citrato
Citrato	3	1,00
EGTA	9	3,0
EDTA	8	2,7
HEDP	6	2,0

DTPA	7	2,7
MGDA	5	1,3

Ejemplo 3: Actividad residual tras incubación con agente quelante

Ensayo EnzChek

La actividad de amilasa o la actividad de amilasa residual se determina en la presente invención mediante el ensayo EnzCheck tal como se ha descrito anteriormente. En general, la actividad de amilasa residual en el detergente modelo B se determinó tras incubarlo a 31 °C durante 18 horas; la actividad se comparó a continuación con la actividad de una referencia incubada a 4 °C durante 18 horas como se ha descrito anteriormente.

Prueba de la estabilidad de variantes de amilasa en detergente con quelante

Para la determinación de la estabilidad de la amilasa en detergente, las enzimas objeto de ensayo se ajustaron a una concentración de 0,6 mg/ml de proteína enzimática por dilución en HEPES 20 mM, Triton X100 al 0,1 % (p/v), de pH 8,0. Si la concentración de amilasa inicial es demasiado baja, puede concentrarse mediante ultrafiltración (UF) utilizando una membrana de UF con un corte de 10 kDa.

Se transfirieron 25 µl de la solución de amilasa y 125 µl de detergente (detergente modelo B) a una placa de microtitulación de 96 pocillos en 4 réplicas. Se puso un imán pequeño (5 x 2 mm) en cada pocillo y la mezcla se mezcló durante 5 minutos a temperatura ambiente en un agitador magnético. Se prepararon dos placas idénticas. Una de las placas se incubó a 4 °C durante 18 horas (muestra de referencia) y la otra placa se incubó a 31 °C durante 18 horas (muestra a 31 °C).

Inmediatamente tras la incubación, las muestras de las placas se analizaron en términos de actividad amilasa como se describe en el ensayo EnzCheck para determinar la actividad amilasa residual en detergentes. Cabe señalar que para reducir la interferencia de otros ingredientes detergentes aparte de la enzima en el ensayo, tanto la referencia como la muestra a 31 °C se diluyeron hasta la misma concentración proteica. La actividad tanto de las muestras de referencia como de las muestras de 31 °C se determinó en la misma placa de 384 pocillos. Se aseguró que la amilasa de referencia estuviera incluida en todas las placas de microtitulación de ensayo. La actividad residual se calculó como $100 \cdot V_{\text{máx}}(\text{muestra a } 31 \text{ °C}) / V_{\text{máx}}(\text{muestra de referencia})$.

El resultado se muestra en la Tabla IV utilizando SP722 o SP722 + D183* G184* como amilasa de referencia (parental). La mejora en puntos porcentuales (pp) en la actividad residual de la variante con respecto a la parental se calcula como la diferencia entre el porcentaje de actividad residual de la variante y el de la parental.

Tabla IV

Enzima	Actividad residual (%)	Mejora en pp de la actividad residual con respecto a la parental	
		SP722	SP722 + D183*G184*
SP722 (parental)	12	0	-
SP722 + D183* G184* (parental)	65	53	0
SP722 + D183* G184* N195F	88	76	23
SP722 + D183* G184* N195L	79	67	14
SP722 + D183* G184* N197F	95	83	30
SP722 + D183* G184* N197L	81	69	16
SP722 + D183* G184* Y243F	80	68	15
SP722 + D183* G184* A186R, N195F	79	67	14
SP722 + D183* G184* H210Y	74	62	9
SP722 + D183* G184* V206L	91	79	26
SP722 + D183* G184* V213A	87	75	22
SP722 + Q174R* D183* G184, E212V	83	71	18
SP722 + D183* G184* V206L E212G G304V A447V	80	68	15
SP722 + N116T G133E K142R D183* G184* Y198N V206L	90	78	25
SP722 + G133E D183* G184* N195Y Y198N Y200F	83	71	18
SP722 + N116T D183* G184* N195Y Y198N	79	67	14
SP722 + K142R P146S G149K D183* G184* N195Y Y198N V206L	80	68	15

SP722 + D134Y D183* G184*	72	60	7
SP722 + T151R D183* G184* H210Y K320N R359IN418D	78	66	13
SP722 + G147E G149R Q169E D183* G184* Y198N Y203F V206L	87	75	22
SP722 + G133E G149R D183* G184* N195Y Y198N Y203F V206L	91	79	26
SP722 + G147E Y152H Q169E D183* G184* Y198N V206L	90	78	25
SP722 + D183* G184* N195F V206L	98	86	33
SP722 + D183* G184* N195F Y243F	100	88	35
SP722 + D183* G184* N195F H210Y	93	81	28
SP722 + D183* G184* V206L H210Y	95	83	30
SP722 + D183* G184* V213A	93	81	28
SP722 + D183* G184* S193T	85	73	20
SP722 + D183* G184* A186T N195F	96	84	31
SP722 + D183* G184* N195F V206L Y243F	94	82	29
SP722 + D183* G184* V206L Y243F	98	86	33
SP722 + D183* G184* N195Y	93	81	28
SP722 + G133D G149R D183* G184* Y198N V206L	92	80	27
SP722 + N116T G133E G147E Y152H D183* G184* Y198N Y203F V206L	94	82	29
SP722 + G147E G149R D183* G184* N195F Y198N V206L	96	84	31
SP722 + G133E K142R D183* G184* N195F Y198N	95	83	30
SP722 + G133E G149R Y152H D183* G184* N195Y Y198NV206L	97	85	32
SP722 + N116T Q129L K142R D183* G184* N195Y Y198N Y203F V206L	101	89	36
SP722 + G133E G149R Y152H D183* G184* N195Y Y198N Y203F V206L	101	89	36
SP722 + N116T G133E G149R D183* G184* Y198N Y203F V206L	104	92	39
SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F	109	97	44
SP722 + D183* G184* N195F V206C Y243F	113	101	48
SP722 + D183* G184* N195F V206T Y243F	109	97	44
SP722 + D183* G184* N195F V206N Y243F	99	87	34
SP722 + D183* G184* N195F V206C	101	89	36
SP722 + D183* G184* N195F V206H	105	93	40
SP722 + D183* G184* N195F V206Y	110	98	45
SP722 + D183* G184* N195F V206L	111	99	46
SP722 + D183* G184* N195F V206G Y243F	104	92	39
SP722 + D183* G184* V206F Y243F	104	92	39
SP722 + D183* G184* N195F V206I Y243F	105	93	40
SP722 + D183* G184* N195F V206F Y243F	92	80	27
SP722 + D183* G184* N195F V206S Y243F	104	92	39
SP722 + D183* G184* A186T N195F	103	91	38
SP722 + D183* G184* N195F V206L H210Y	102	90	37
SP722 + D183* G184* S193T V206L	101	89	36
SP722 + D183* G184* S193T V213A	108	96	43
SP722 + D183* G184* S193T Y243F	103	91	38
SP722 + D183* G184* N195F V206N	107	95	42

Los resultados muestran claramente que las variantes de la invención son considerablemente más resistentes a la presencia de agentes quelantes fuertes que la alfa-amilasa de referencia. En algunos casos, la actividad residual es superior a 100, lo que refleja la varianza analítica del ensayo.

5 Los resultados muestran que las variantes de la invención, también a pH 8,0, tienen una estabilidad mejorada en comparación con la alfa-amilasa de referencia, que puede ser SP722 de id. de sec. n.º 6 o id. de sec. n.º + D183* G184*, que es la id. de sec. n.º 6 en donde se ha eliminado el aminoácido 183 y 184.

10 Ejemplo 4: Actividad residual tras incubación con agente quelante a pH 8 y pH 10

En este ejemplo se usa el ensayo PNP-G7 arriba descrito para determinar la actividad de amilasa residual después de la incubación en presencia del agente quelante DTPA, pero el principio es el mismo que el anterior para determinar la actividad utilizando el ensayo EnzCheck. En general, la actividad amilasa residual se determinó tras la incubación en un tampón que contiene un agente quelante a pH 8 y a 49 °C o a pH 10 y 42 °C

durante 1 hora, y la actividad se compara a continuación con la actividad de una referencia incubada a 4 °C durante 1 hora como se ha descrito anteriormente en “Materiales y Métodos”.

Prueba de estabilidad de variantes de amilasa después de la incubación con agente quelante a pH 8 y pH 10 en tampón

Principio:

Se incubaron muestras de enzimas en tampón a pH 8,0 con una concentración final de 1,5 % de DTPA a 49 °C durante 1 h, y las muestras de referencia se incubaron a 4 °C durante 1 h. Además, se incubaron muestras de enzimas en tampón a pH 10,0 con una concentración final de 1,5 % de DTPA a 42 °C durante 1 h y sus muestras de referencia se incubaron a 4 °C durante 1 h. Tras la incubación se determinó la actividad residual utilizando el ensayo PNP-G7 de actividad de amilasa.

Reactivos:

Tampón a pH 8 con DTPA: EPPS 50 mM, Tritón X100 0,01 %, DTPA (ácido dietilentriamino pentaacético, n. °CAS 67-43-6), pH 8,0

Tampón a pH 10 con DTPA: EPPS 50 mM, Tritón X100 0,01 %, DTPA (ácido dietilentriamino pentaacético, n. °CAS 67-43-6), pH 10,0

Soluciones de amilasa: 0,25 y 0,5 mg de proteína de amilasa activa/ml en EPPS 5 mM, Triton X-100 (p/v) 0,01 %, pH 8,0

Procedimiento:

160 µl de tampón (tampón a pH 8 con DTPA o tampón a pH 10 con DTPA) y 40 µl de las soluciones de amilasa se transfirieron a una placa de microtitulación de PCR de 96 pocillos por duplicado y el contenido se mezcló durante 1 minuto (PCR: reacción en cadena de la polimerasa). La concentración final de DTPA fue de 1,5 % en cada pocillo. Se transfirieron 20 µl de cada pocillo a una nueva placa de microtitulación de PCR (MTP de PCR), que se puso a 4 °C (muestra de referencia). La MTP de PCR se incubó en el equipo de PCR durante 1 h a 49 °C, cuando el tampón tenía un pH de 8,0 (muestras a pH 8, 49 °C) y durante 1 h a 42 °C, cuando el tampón tenía pH 10,0 (muestras a pH 10, 42 °C).

Inmediatamente después de la incubación, las muestras en placas de PCR se diluyeron diez veces en tampón de dilución y se analizó el nivel de actividad de amilasa como se describe en el ensayo PNP-G7. Debe señalarse que para reducir la interferencia del agente quelante, aquí DTPA, en el ensayo, tanto la muestra de referencia como la de pH 8,49 °C/pH 10, 42 °C se diluyeron hasta la misma concentración antes de analizar la actividad residual. La actividad tanto de las muestras de referencia como de las muestras de pH 8, 49 °C o pH 10, 42 °C se determinó en la misma placa de 96 pocillos. Se aseguró que la amilasa parental estuviera incluida en todas las placas de microtitulación de ensayo. La actividad residual se calculó como $100 \times V_{\text{máx}}$ (muestra de pH 8, 42 °C o pH 10, 49 °C) / $V_{\text{máx}}$ (muestra de referencia) y los resultados se muestran en la Tabla V. Las mejoras en puntos porcentuales (pp) se calculan como la actividad residual de la variante menos la actividad residual de la parental.

Tabla V

Enzima	Actividad residual (%)	pH 8, 49 °C		pH 10, 42 °C	
		Mejora en pp con respecto a la parental		Mejora en pp con respecto a la parental	
		SP722	SP722+ D183* 184*	SP722	SP72 2+ D183 * 184*
SP722 (parental)	1	0		8	0
SP722 + D183* G184* (parental)	20		0	20	-
SP722 + D183* G184* N195F V206L Y243F	97	96	77	93	85
SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F	97	96	77	100	92
SP722 + D183* G184* N195F V206N Y243F	96	95	75	92	84
SP722 + D183* G184* N195F V206F Y243F	101	100	80	97	89
SP722 + D183* G184* N195F V206H	92	92	72	88	80
SP722 + D183* G184* N195F V206Y	95	94	74	96	88
SP722 + D183* G184* V206F Y243F	87	86	66	89	81

SP722 + D183* G184* N195F V206L H210Y	98	97	77	96	88	68
SP722 + D183* G184* S193T V206L	79	78	58	73	65	45
SP722+D183* G184* G133E G149R N195Y Y203F V206L	90	89	69	83	75	55

Los resultados muestran claramente que las variantes de la invención son altamente estables y tienen una actividad residual alta después de la incubación a pH 8 49 °C y pH 10 42 °C durante 1 hora, tanto cuando se comparan las actividades residuales de las variantes con la de la parental y cuando se observa la mejora de las variantes en puntos porcentuales. En comparación, la amilasa SP722 + D183* G184* tiene una actividad residual de 20 % y SP722 tiene una actividad residual aún menor.

Ejemplo 5: Actividad residual después de la incubación en tampón con DTPA al 1,5 % (p/v) a pH8 y pH10

En este ejemplo el ensayo PNP-G7 descrito anteriormente se utiliza para determinar la actividad de amilasa residual de variantes SP722 después de la incubación en presencia del agente quelante de DTPA. En general la actividad de amilasa residual se determinó después de la incubación en un tampón que contenía un agente quelante a pH 8 o a pH 10 y a las temperaturas indicadas y se compara a continuación los tiempos de incubación y la actividad con la actividad de una referencia incubada a 4 °C como se ha descrito anteriormente en “Materiales y Métodos”.

Prueba de estabilidad de variantes de amilasa después de la incubación con agente quelante a pH 8 y pH 10 en tampón

Principio:

Las muestras de enzimas se incubaron en tampón a pH 8,0 con concentración final de 1,5 % (p/v) de DTPA a la temperatura y tiempo de incubación que se indica a 4 °C durante el mismo tiempo de incubación. Además, las muestras de enzimas se incubaron en tampón a pH 10,0 con concentración final de 1,5 % (p/v) de DTPA a la temperatura y tiempo de incubación que se indica y sus muestras de referencia se incubaron a 4 °C durante el mismo tiempo de incubación. Tras la incubación se determinó la actividad residual utilizando el ensayo PNP-G7 de actividad de amilasa.

Reactivos:

Tampón a pH 8 con DTPA: EPPS 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), DTPA (ácido dietilentriamino pentaacético, n. °CAS 67-43-6) 1,875 % (p/v), pH 8,0

Tampón a pH 10 con DTPA: Glicina 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), DTPA (ácido dietilentriamino pentaacético, n. °CAS 67-43-6) 1,875 % (p/v), pH 10,0

Soluciones de amilasa: 0,25 y 0,5 mg de proteína de amilasa activa/ml en EPPS 5 mM, Triton X-100 (p/v) 0,01 %, pH 8,0

Procedimiento:

160 µl de tampón (tampón a pH 8 con DTPA o tampón a pH 10 con DTPA) y 40 µl de las soluciones de amilasa se transfirieron a una placa de microtitulación de PCR de 96 pocillos por duplicado y el contenido se mezcló durante 1 minuto (PCR: reacción en cadena de la polimerasa). La concentración final de DTPA fue de 1,5 % (p/v) en cada pocillo. Se transfirieron 20 µl de cada pocillo a una placa de microtitulación (MTP), que se puso a 4 °C (muestra de referencia). La MTP de PCR (muestra sometida a estrés) se incubó en el equipo de PCR tal como se indica más adelante en la tabla.

Inmediatamente después de la incubación, las muestras en placas de PCR se diluyeron diez veces en tampón de dilución y se analizó el nivel de actividad de amilasa como se describe en el ensayo PNP-G7. Debe observarse que para reducir la interferencia del agente quelante, aquí DTPA, en el ensayo, se diluyeron tanto la muestra de referencia como la sometida a estrés hasta la misma concentración antes de analizar la actividad residual. La actividad tanto de las muestras de referencia como de las muestras sometidas a estrés se determinó sobre la misma placa de 96 pocillos. Se aseguró que la amilasa parental estuviera incluida en todas las placas de microtitulación de ensayo. La actividad residual se calculó como $100 \times V_{\text{máx}} (\text{muestra sometida a estrés}) / V_{\text{máx}} (\text{muestra de referencia})$. La mejora en puntos porcentuales (pp) de la actividad residual de las variantes con respecto a la parental se calcula como la actividad residual de la variante menos la actividad residual de la parental. Los resultados se muestran en la tabla 5.1.

Tabla VI: Variantes SP722 con quelante DTPA

	pH 8, 49 °C, 10 minutos, DTPA 1,5 %		pH 10, 42 °C, 20 minutos, DTPA 1,5 %	
Enzima	Actividad residual (%)	Mejora en pp de la	actividad residual (%)	Mejora en pp de la actividad

				residual
		actividad con respecto a la parental		con respecto a la parental
SP722 (parental)	29	0	25	0
SP722 + N195F	51	22	42	17
SP722 + V206L	36	7	32	7
SP722 + V206Y	48	19	41	16
SP722 + Y243F	34	5	35	10
SP722 + N195F V206L	68	39	62	37
SP722 + N195F V206L Y243F	78	49	77	52

A partir de las actividades residuales se observa claramente que las variantes de SP722 son más estables en presencia de DTPA, lo que también se refleja en las mejoras en puntos porcentuales en la estabilidad de la variante en comparación con la parental.

Ejemplo 6: Actividad residual tras incubación con HEDP a pH 10

En este ejemplo, se utiliza el ensayo PNP-G7 descrito anteriormente para determinar la actividad de amilasa residual después de la incubación en presencia del agente quelante de HEDP. En general, la actividad de amilasa residual se determinó después de la incubación en un tampón que contenía un agente quelante a pH 10 y a las temperaturas indicadas, y se compara a continuación los tiempos de incubación y la actividad con la actividad de una referencia incubada a 4 °C como se ha descrito anteriormente en “Materiales y Métodos”.

Prueba de estabilidad de variantes de amilasa tras incubación con agente quelante a pH 10 en tampón

Principio:

Las muestras de enzimas se incubaron en tampón a pH 10,0 con concentración final de 1,5 % (p/v) de DTPA a la temperatura y tiempo de incubación que se indica a 4 °C durante el mismo tiempo de incubación. Tras la incubación se determinó la actividad residual utilizando el ensayo PNP-G7 de actividad de amilasa.

Reactivos:

Tampón a pH 10 con HEDP: Glicina 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), HEDP (ácido 1-hidroxiethylidendifosfónico, n. °CAS 2809-21-4) 1,875 % (p/v), pH 10,0

Soluciones de amilasa: 0,25 y 0,5 mg de proteína de amilasa activa/ml en EPPS 5 mM, Triton X-100 (p/v) 0,01 %, pH 8,0

Procedimiento:

160 µl de tampón (tampón a pH 10 con HEDP) y 40 µl de las soluciones de amilasa se transfirieron a una placa de microtitulación de PCR de 96 pocillos por duplicado y el contenido se mezcló durante 1 minuto (PCR: reacción en cadena de la polimerasa). La concentración final de HEDP fue de 1,5 % (p/v) en cada pocillo. Se transfirieron 20 µl de cada pocillo a una placa de microtitulación (MTP), que se puso a 4 °C (muestra de referencia). La MTP de PCR (muestra sometida a estrés) se incubó en el equipo de PCR tal como se indica más adelante en la Tabla 6.1. La actividad residual se calculó como $100 \times V_{\text{máx}} (\text{muestra sometida a estrés}) / V_{\text{máx}} (\text{muestra de referencia})$. La mejora en puntos porcentuales (pp) de la actividad residual de las variantes con respecto a la parental se calcula como la actividad residual de la variante menos la actividad residual de la parental.

Tabla VII: SP722 y variante de la misma con HEDP

Enzima	pH 10, 42 °C, 20 minutos, HEDP 1,5 %	
	Actividad residual (%)	Mejora en pp con respecto a la parental
SP722 (parental)	44	0
SP722 + N195F V206L Y243F	76	32

Los resultados muestran claramente que la variante es más estable cuando se incuba en presencia de HEDP en comparación con la parental.

Ejemplo 7: Estabilidad de SP722+D183* G184* y variantes de la misma con 1,5 % (p/V) de HEDP

En este ejemplo se utiliza el ensayo PNP-G7 descrito anteriormente para determinar la actividad de amilasa residual después de la incubación en presencia del agente quelante HEDP. En general la actividad de amilasa residual se determinó después de la incubación en un tampón que contenía un agente quelante a pH 8 o a pH 10 y a las temperaturas indicadas, y se comparan a continuación los tiempos de incubación y la actividad con la actividad de una referencia incubada a 4 °C como se ha descrito anteriormente en “Materiales y Métodos”.

Prueba de estabilidad de variantes de amilasa después de la incubación con agente quelante a pH 8 y pH 10 en tampón

Principio:

Las muestras de enzimas se incubaron en tampón a pH 8,0 con concentración final de 1,5 % (p/v) de HEDP a la temperatura y tiempo de incubación que se indica a 4 °C durante el mismo tiempo de incubación. Además, las muestras de enzimas se incubaron en tampón a pH 10,0 con concentración final de 1,5 % (p/v) de HEDP a la temperatura y tiempo de incubación que se indica y sus muestras de referencia se incubaron a 4 °C durante el mismo tiempo de incubación. Tras la incubación se determinó la actividad residual utilizando el ensayo PNP-G7 de actividad de amilasa.

Reactivos:

Tampón a pH 8 con HEDP: EPPS 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), HEDP (ácido 1-hidroxietilidendifosfónico, n. °CAS 2809-21-4) 1,875 % (p/v), pH 8,0

Tampón a pH 10 con HEDP: Glicina 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), HEDP (ácido 1-hidroxietilidendifosfónico, n. °CAS 2809-21-4) 1,875 % (p/v), pH 10,0

Soluciones de amilasa: 0,25 y 0,5 mg de proteína de amilasa activa/ml en EPPS 5 mM, Triton X-100 (p/v) 0,01 %, pH 8,0

Procedimiento:

160 µl de tampón (tampón a pH 8 con DTPA o tampón a pH 10 con DTPA) y 40 µl de las soluciones de amilasa se transfirieron a una placa de microtitulación de PCR de 96 pocillos por duplicado y el contenido se mezcló durante 1 minuto (PCR: reacción en cadena de la polimerasa). La concentración final de HEDP fue de 1,5 % (p/v) en cada pocillo. Se transfirieron 20 µl de cada pocillo a una placa de microtitulación (MTP), que se puso a 4 °C (muestra de referencia). La MTP de PCR (muestra sometida a estrés) se incubó en el equipo de PCR tal como se indica más adelante en la Tabla 7.1. La actividad residual se calculó como $100 \times V_{\text{máx}} (\text{muestra sometida a estrés}) / V_{\text{máx}} (\text{muestra de referencia})$. La mejora en puntos porcentuales (pp) de la actividad residual de las variantes con respecto a la parental se calcula como la actividad residual de la variante menos la actividad residual de la parental.

Tabla VIII: Variantes SP722 + D183* G184* con HEDP

	pH 8, 50 °C, 210 minutos, HEDP 1,5 %		pH 10, 42 °C, 60 minutos, HEDP 1,5 %	
Enzima	Actividad residual (%)	Mejora en pp con respecto a la parental	Actividad residual (%)	Mejora en pp con respecto a la parental
SP722 + D183* G184* (parental)	16	0	16	0
SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F	96	80	95	79
SP722 + D183* G184* S193T V206L	61	45	62	46
SP722+D183* G184* G133E G149R N195Y Y203F V206L	82	66	74	58

Los resultados muestran claramente que las variantes de SP722+D183* G184* son mucho más estables cuando se incuban en presencia de HEDP como agente quelante.

Ejemplo 8: estabilidad de las variantes de AA560 en presencia de DTPA 1,5 % (p/v) o HEDP 1,5 % (p/v)

En este ejemplo se utiliza el ensayo PNP-G7 arriba descrito para determinar la actividad de amilasa residual después de la incubación en presencia del agente quelante DTPA o HEDP. En general la actividad de amilasa residual se determinó después de la incubación en un tampón que contenía un agente quelante a pH 8 o a pH 10 y a las temperaturas indicadas, y se comparan a continuación los tiempos de incubación y la actividad con la actividad de una referencia incubada a 4 °C como se ha descrito anteriormente en “Materiales y Métodos”.

Prueba de estabilidad de variantes de amilasa después de la incubación con agente quelante a pH 8 y pH 10 en tampón

Principio:

Las muestras de enzima se incubaron en tampón a pH 8,0 con concentración final de 1,5 % (p/v) de DTPA o HEDP a la temperatura y tiempo de incubación que se indica a 4 °C durante el mismo tiempo de incubación. Además, las muestras de enzima se incubaron en tampón a pH 10,0 con concentración final de 1,5 % (p/v) de DTPA o HEDP a la temperatura y tiempo de incubación que se indica y sus muestras de referencia se incubaron a 4 °C durante el mismo tiempo de incubación. Tras la incubación se determinó la actividad residual utilizando el ensayo PNP-G7 de actividad de amilasa.

Reactivos:

Tampón a pH 8 con DTPA: EPPS 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), DTPA (ácido dietilentriamino pentaacético, n. °CAS 67-43-6) 1,875 % (p/v), pH 8,0

tampón a pH 10 con DTPA: Glicina 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), DTPA (ácido dietilentriamino pentaacético, n. °CAS 67-43-6) 1,875 % (p/v), pH 10,0

tampón a pH 8 con HEDP: EPPS 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), HEDP (ácido 1-hidroxietilidendifosfónico, n. °CAS 2809-21-4) 1,875 % (p/v), pH 8,0

tampón a pH 10 con HEDP: Glicina 50 mM, Tritón X100 0,01 % (p/v), HEDP (ácido 1-hidroxietilidendifosfónico, n. °CAS 2809-21-4) 1,875 % (p/v), pH 10,0

Soluciones de amilasa: 0,25 y 0,5 mg de proteína de amilasa activa/ml en EPPS 5 mM, Triton X-100 (p/v) 0,01 %, pH 8,0

Procedimiento:

160 µl de tampón (tampón a pH 8 con DTPA o HEDP o tampón a pH 10 con DTPA o HEDP) y 40 µl de las soluciones de amilasa se transfirieron a una placa de microtitulación de PCR de 96 pocillos por duplicado y el contenido se mezcló durante 1 minuto (PCR: reacción en cadena de la polimerasa). La concentración final de DTPA o HEDP fue de 1,5 % (p/v) en cada pocillo. Se transfirieron 20 µl de cada pocillo a una placa de microtitulación (MTP), que se puso a 4 °C (muestra de referencia). La MTP de PCR (muestra sometida a estrés) se incubó en el equipo de PCR tal como se indica más adelante en las Tablas 8.1 y 8.2 más adelante. La actividad residual se calculó como $100 \times V_{\text{máx}}$ (muestra sometida a estrés) / $V_{\text{máx}}$ (muestra de referencia). La mejora en puntos porcentuales (pp) de la actividad residual de las variantes con respecto a la parental se calcula como la actividad residual de la variante menos la actividad residual de la parental.

Tabla IX: Variantes AA560 con DTPA

Enzima	pH 8, 49 °C, 150 minutos, 1,5 % DTPA		pH 10, 42 °C, 60 minutos, 1,5 % DTPA	
	Actividad residual (%)	Mejora en pp con respecto a la parental	Actividad residual (%)	Mejora en pp con respecto a la parental
AA560 + 118KD183* G184* N195F R320K R458K (parental)	20	0	21	0
Parental + I206L	49	29	45	24
Parental + I206Y	77	57	78	57
Parental + Y243F	31	11	36	15

Tabla 8.2: Variantes AA560 con DTPA

Enzima	pH 8, 50 °C, 210 minutos, HEDP 1,5 %		pH 10, 42 °C, 60 minutos, HEDP 1,5 %	
	Actividad residual (%)	Mejora en pp con respecto a la parental	Actividad residual (%)	Mejora en pp con respecto a la parental
AA560 + 118K D183* G184* N195F R320K R458K (parental)	60	0	19	0
Parental + I206L	68	8	38	19
Parental + I206Y	85	25	72	53
Parental + Y243F	59	-1	34	15

Ejemplo 9: Actividad residual tras incubación en detergente con agente quelante

En este ejemplo se utiliza el ensayo PNP-G7 para determinar la actividad amilasa residual tras la incubación en el detergente en presencia de agentes quelantes, como se describe en el ejemplo 5.

- 5 En general, la actividad amilasa residual se determinó tras la incubación en el detergente C que contiene los agentes quelantes DTPMP y HEDP a pH 8,2 al cabo de 3 semanas y 6 semanas a 30 °C. La actividad residual de la amilasa se compara a continuación con la actividad de la amilasa en el detergente recién preparado el día cero (antes de la incubación) como se describe a continuación.

10 Tabla X

Detergente C	Composición de detergente utilizada para las pruebas de estabilidad
Ingrediente	Composición (% en peso de la composición)
Alquilbenceno sulfonato C _{11,8}	5,89
Ácido cítrico	2,56
Ácido graso C ₁₂₋₁₈	2,56
Alquil C ₁₂₋₁₄ etoxi 3 sulfato sódico	1,96
Alquil C ₁₄₋₁₅ -7-etoxilato	1,94
Alquil C ₁₂₋₁₄ 7-etoxilato	2,21
Ácido bórico	0,5
Un compuesto que tiene la siguiente estructura general: bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n)(CH ₃)-N ⁺ -C _x H _{2x} -N ⁺ -(CH ₃)- bis((C ₂ H ₅ O)(C ₂ H ₄ O) _n), en donde n = de 20 a 30, y x = de 3 a 8, o variantes sulfatadas o sulfonadas del mismo	1,46
DTPMP (ácido dietilen triamino penta(metilenfosfónico))	0,19
HEDP (ácido hidroxietano difosfónico)	1,6
Proteasa*	0,059*
Etanol	1,95
Propilenglicol	1,5
Monoetanolamina	5,15
Agua, ingredientes estéticos (tintes, perfumes), reguladores del pH (hidróxido sódico) y componentes menores (enzimas, disolventes, agentes estructurantes, abrillantadores)	Equilibrar a pH 8,2

* comercializado con el nombre comercial Purafect Prime®, de Genencor International, Palo Alto. Esto se expresa como % de detergente que es enzima proteasa activa (es decir, % en el producto asume 100 % de actividad de la enzima).

- 15 Prueba de estabilidad de variantes de amilasa tras incubación en el detergente C con agentes quelantes a pH 8,2

Método: Se prepararon muestras de detergente C, pH 8,2, que contenían, cada una, una variante de amilasa de la invención o la id. de sec. n.º 6 (SP722) con las siguientes dos delecciones D183* + G184*, también denotadas como SP722 + D183* + G184*. Se determinó para cada muestra de detergente la actividad enzimática residual inicial antes de la incubación (muestras de referencia).

La actividad enzimática residual de cada muestra se determinó después de la incubación a 30 °C durante 3 semanas y 6 semanas y se comparó con su muestra de referencia. Se determinó la actividad residual utilizando el ensayo de actividad amilasa PNP-G7.

Soluciones de amilasa: 13,77 mg de proteína de amilasa activa en 100 g de detergente C, pH 8,2

Procedimiento:

30 Se puso detergente C, 5 g a pH 8,2, que contenía la amilasa por duplicado dentro de un frasco de vidrio de 7 ml con una tapa hermética al aire. Se determinó la actividad enzimática residual para las muestras iniciales, por duplicado, antes de la incubación.

35 Las muestras se pusieron en un incubador durante 3 semanas y 6 semanas a 30 °C. Inmediatamente después de la incubación, se analizaron las muestras residuales para determinar la actividad amilasa como se describe en el ensayo PNP-G7. En este ensayo la actividad residual de 100 % equivale a ausencia de pérdida de actividad de amilasa en comparación con la actividad enzimática residual inicial antes de la incubación (muestra de referencia).

La mejora de punto porcentual (pp) en la actividad residual (estabilidad) de la variante con respecto a la parental se calcula como la diferencia entre la actividad residual de la variante y la actividad residual de la parental.

Tabla XI

5

	Actividad residual pH 8,2, 30 °C		Mejora en pp de la actividad residual con respecto a la parental	
	3 semanas	6 semanas	3 semanas	6 semanas
SP722 + DI 83* G184* (parental)	19	3		
SP722 + D183* G184* N195F	67	47	48	44
SP722 + D183* G184* N195F H210Y	82	78	63	75
SP722 + D183* G184* N195F V206L	87	83	68	80
SP722 + D183* G184* N195F V206Y	98	97	79	94
SP722 + D183* G184* N195F V206Y Y243F	100	97	81	94

Los resultados muestran claramente que las variantes de la invención son altamente estables y tienen una alta actividad residual después de la incubación en el detergente C a pH 8,2, 3 semanas y 6 semanas a 30 °C. En comparación, la amilasa SP722 + D183 * G184 * tiene una actividad residual de 19 % al cabo de 3 semanas y 3 % al cabo de 6 semanas

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE PROCTER AND GAMBLE COMPANY

<120> VARIANTES Y COMPOSICIONES QUE COMPRENDEN VARIANTES CON ALTA ESTABILIDAD EN PRESENCIA DE UN AGENTE QUELANTE

<130> CM3487ML

<160> 26

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 1440

<212> ADN

<213> Bacillus sp.

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1440)

<400> 1

gat gga ttg aac ggt acg atg atg cag tat tat gag tgg cat ttg gaa	48
Asp Gly Leu Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Tyr Glu Trp His Leu Glu	
1 5 10 15	
aac gac ggg cag cat tgg aat cgg ttg cac gat gat gcc gca gct ttg	96
Asn Asp Gly Gln His Trp Asn Arg Leu His Asp Asp Ala Ala Leu	
20 25 30	
agt gat gct ggt att aca gct att tgg att ccg cca gcc tac aaa ggt	144
Ser Asp Ala Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly	
35 40 45	
aat agt cag gcg gat gtt ggg tac ggt gca tac gat ctt tat gat tta	192
Asn Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu	
50 55 60	
gga gag ttc aat caa aag ggt act gtt cga acg aaa tac gga act aag	240
Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys	
65 70 75 80	
gca cag ctt gaa cga gct att ggg tcc ctt aaa tct aat gat atc aat	288
Ala Gln Leu Glu Arg Ala Ile Gly Ser Leu Lys Ser Asn Asp Ile Asn	
85 90 95	
gta tac gga gat gtc gtg atg aat cat aaa atg gga gct gat ttt acg	336
Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Met Gly Ala Asp Phe Thr	
100 105 110	
gag gca gtg caa gct gtt caa gta aat cca acg aat cgt tgg cag gat	384
Glu Ala Val Gln Ala Val Gln Val Asn Pro Thr Asn Arg Trp Gln Asp	
115 120 125	
att tca ggt gcc tac acg att gat gcg tgg acg ggt ttc gac ttt tca	432
Ile Ser Gly Ala Tyr Thr Ile Asp Ala Trp Thr Gly Phe Asp Phe Ser	
130 135 140	
ggg cgt aac aac gcc tat tca gat ttt aag tgg aga tgg ttc cat ttt	480
Gly Arg Asn Asn Ala Tyr Ser Asp Phe Lys Trp Arg Trp Phe His Phe	
145 150 155 160	

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

405										410					415					
cct	aat	tca	ggc	ctt	gcg	act	att	atg	tcg	aat	gga	cct	ggt	ggt	tcc	1296				
Pro	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala	Thr	Ile	Met	Ser	Asn	Gly	Pro	Gly	Gly	Ser					
			420				425						430							
aag	tgg	atg	tat	gta	gga	cgt	cag	aat	gca	gga	caa	aca	tgg	aca	gat	1344				
Lys	Trp	Met	Tyr	Val	Gly	Arg	Gln	Asn	Ala	Gly	Gln	Thr	Trp	Thr	Asp					
			435				440						445							
tta	act	ggt	aat	aac	gga	gcg	tcc	gtt	aca	att	aat	ggc	gat	gga	tgg	1392				
Leu	Thr	Gly	Asn	Asn	Gly	Ala	Ser	Val	Thr	Ile	Asn	Gly	Asp	Gly	Trp					
			450				455						460							
ggc	gaa	ttc	ttt	acg	aat	gga	gga	tct	gta	tcc	gtg	tac	gtg	aac	caa	1440				
Gly	Glu	Phe	Phe	Thr	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Val	Tyr	Val	Asn	Gln					
465						470						475			480					
<210> 2																				
<211> 480																				
<212> PRT																				
<213> Bacillus sp.																				
<400> 2																				
Asp	Gly	Leu	Asn	Gly	Thr	Met	Met	Gln	Tyr	Tyr	Glu	Trp	His	Leu	Glu					
1				5					10					15						
Asn	Asp	Gly	Gln	His	Trp	Asn	Arg	Leu	His	Asp	Asp	Ala	Ala	Ala	Leu					
			20				25						30							
Ser	Asp	Ala	Gly	Ile	Thr	Ala	Ile	Trp	Ile	Pro	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gly					
			35				40						45							
Asn	Ser	Gln	Ala	Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asp	Leu					
50						55						60								
Gly	Glu	Phe	Asn	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly	Thr	Lys					
65						70						75			80					
Ala	Gln	Leu	Glu	Arg	Ala	Ile	Gly	Ser	Leu	Lys	Ser	Asn	Asp	Ile	Asn					
			85						90						95					
Val	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Met	Asn	His	Lys	Met	Gly	Ala	Asp	Phe	Thr					
			100						105						110					
Glu	Ala	Val	Gln	Ala	Val	Gln	Val	Asn	Pro	Thr	Asn	Arg	Trp	Gln	Asp					
			115						120						125					
Ile	Ser	Gly	Ala	Tyr	Thr	Ile	Asp	Ala	Trp	Thr	Gly	Phe	Asp	Phe	Ser					
130						135						140								
Gly	Arg	Asn	Asn	Ala	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp	Phe	His	Phe					

ES 2 734 183 T3

145		150		155		160
Asn Gly Val Asp Trp Asp Gln Arg Tyr Gln Glu Asn His Ile Phe Arg						
		165		170		175
Phe Ala Asn Thr Asn Trp Asn Trp Arg Val Asp Glu Glu Asn Gly Asn						
		180		185		190
Tyr Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Asn Ile Asp Phe Ser His Pro Glu Val						
		195		200		205
Gln Asp Glu Leu Lys Asp Trp Gly Ser Trp Phe Thr Asp Glu Leu Asp						
		210		215		220
Leu Asp Gly Tyr Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Pro Phe Trp Tyr						
		225		230		235
Thr Ser Asp Trp Val Arg His Gln Arg Asn Glu Ala Asp Gln Asp Leu						
		245		250		255
Phe Val Val Gly Glu Tyr Trp Lys Asp Asp Val Gly Ala Leu Glu Phe						
		260		265		270
Tyr Leu Asp Glu Met Asn Trp Glu Met Ser Leu Phe Asp Val Pro Leu						
		275		280		285
Asn Tyr Asn Phe Tyr Arg Ala Ser Gln Gln Gly Gly Ser Tyr Asp Met						
		290		295		300
Arg Asn Ile Leu Arg Gly Ser Leu Val Glu Ala His Pro Met His Ala						
		305		310		315
Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Glu Ser Leu Glu						
		325		330		335
Ser Trp Val Ala Asp Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Thr Ile Leu						
		340		345		350
Thr Arg Glu Gly Gly Tyr Pro Asn Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr Gly						
		355		360		365
Ile Pro Asn Asp Asn Ile Ser Ala Lys Lys Asp Met Ile Asp Glu Leu						
		370		375		380
Leu Asp Ala Arg Gln Asn Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His Asp Tyr Phe						
		385		390		395
						400

Asp His Trp Asp Val Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ser Ser Ser Arg
405 410 415

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

Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Gln Thr Trp Thr Asp
435 440 445

Leu Thr Gly Asn Asn Gly Ala Ser Val Thr Ile Asn Gly Asp Gly Trp
450 455 460

Gly Glu Phe Phe Thr Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Tyr Val Asn Gln
465 470 475 480

<210> 3
<211> 1476
<212> ADN
<213> Bacillus circulans

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1476)

<400> 3
aag aga aat cat acc atg atg cag ttt ttt gaa tgg cac ctg gct gca 48
Lys Arg Asn His Thr Met Met Gln Phe Phe Glu Trp His Leu Ala Ala
1 5 10 15
gac gga gat cat tgg aag cga ctg gct gaa atg gcc ccg gaa ttg aaa 96
Asp Gly Asp His Trp Lys Arg Leu Ala Glu Met Ala Pro Glu Leu Lys
20 25 30
gcc aaa ggc att gat acg gta tgg gtg cct cct gtg acc aaa gcc gta 144
Ala Lys Gly Ile Asp Thr Val Trp Val Pro Pro Val Thr Lys Ala Val
35 40 45
tca gct gag gat aca ggt tat ggt gta tat gat ctg tat gat ttg ggt 192
Ser Ala Glu Asp Thr Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly
50 55 60
gaa ttt gac caa aag ggt acc gtg cgt acc aaa tac ggc acc aag cag 240
Glu Phe Asp Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gln
65 70 75 80
gaa ctg ata gag gcc att gct gag tgt cag aag aac gga atc gcc gtc 288
Glu Leu Ile Glu Ala Ile Ala Glu Cys Gln Lys Asn Gly Ile Ala Val
85 90 95
tat gtg gat ctg gtt atg aat cac aag gcc gga gca gat gag acg gaa 336
Tyr Val Asp Leu Val Met Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Glu Thr Glu
100 105 110
gtt ttt aaa gtg att gag gtt gat ccc aat gat cga acg aag gaa att 384
Val Phe Lys Val Ile Glu Val Asp Pro Asn Asp Arg Thr Lys Glu Ile
115 120 125

tct gag ccg ttc gaa att gag ggc tgg acc aaa ttc aca ttc ccg ggt Ser Glu Pro Phe Glu Ile Glu Gly Trp Thr Lys Phe Thr Phe Pro Gly 130 135 140	432
cgc ggg gat caa tac tcc tct ttt aaa tgg aac tct gaa cac ttc aat Arg Gly Asp Gln Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Asn Ser Glu His Phe Asn 145 150 155 160	480
ggc acg gac ttt gat gcc agg gaa gaa cga aca ggt gta ttc cgc atc Gly Thr Asp Phe Asn Ala Arg Glu Glu Arg Thr Gly Val Phe Arg Ile 165 170 175	528
gca gga gag aat aaa aaa tgg aat gag aat gtc gat gat gag ttt ggt Ala Gly Glu Asn Lys Lys Trp Asn Glu Asn Val Asp Asp Glu Phe Gly 180 185 190	576
aac tat gac tat ctg atg ttc gcc aat ata gat tat aac cac ccg gat Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Phe Ala Asn Ile Asp Tyr Asn His Pro Asp 195 200 205	624
gtt cgg cgc gag atg atc gat tgg ggg aaa tgg ctg atc gat acc ctt Val Arg Arg Glu Met Ile Asp Trp Gly Lys Trp Leu Ile Asp Thr Leu 210 215 220	672
cag tgc ggt ggg ttc cgg ctg gat gcg att aag cat atc aac cat gaa Gln Cys Gly Gly Phe Arg Leu Asp Ala Ile Lys His Ile Asn His Glu 225 230 235 240	720
ttc att aag gag ttc gca gca gag atg atc cgc aaa cgc ggt cag gat Phe Ile Lys Glu Phe Ala Ala Glu Met Ile Arg Lys Arg Gly Gln Asp 245 250 255	768
ttc tac atc gta ggc gag ttc tgg aac tcg aac ctg gat gca tgt cgt Phe Tyr Ile Val Gly Glu Phe Trp Asn Ser Asn Leu Asp Ala Cys Arg 260 265 270	816
gaa ttc ctt gat acg gta gac tat cag atc gac ctg ttt gat gtg tct Glu Phe Leu Asp Thr Val Asp Tyr Gln Ile Asp Leu Phe Asp Val Ser 275 280 285	864
ctt cac tac aag ttg cat gag gct tcg ctt aaa ggc aga gac ttt gat Leu His Tyr Lys Leu His Glu Ala Ser Leu Lys Gly Arg Asp Phe Asp 290 295 300	912
ctc tcc aaa att ttt gat gac acc ttg gtg cag acc cat cct acc cat Leu Ser Lys Ile Phe Asp Asp Thr Leu Val Gln Thr His Pro Thr His 305 310 315 320	960
gcg gta acc ttc gta gat aac cat gac tcc caa cct cat gaa gcg ttg Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro His Glu Ala Leu 325 330 335	1008
gaa tca tgg att ggt gat tgg ttt aag ccg agc gct tat gcg ttg acg Glu Ser Trp Ile Gly Asp Trp Phe Lys Pro Ser Ala Tyr Ala Leu Thr 340 345 350	1056
cta tta cgt cgt gat ggc tat ccg gtt gta ttt tac ggc gat tat tat Leu Leu Arg Arg Asp Gly Tyr Pro Val Val Phe Tyr Gly Asp Tyr Tyr 355 360 365	1104
ggc att ggt ggt cct gaa cct gtg gat ggc aaa aaa gaa att ctg gac Gly Ile Gly Gly Pro Glu Pro Val Asp Gly Lys Lys Glu Ile Leu Asp 370 375 380	1152

att ctg ctg tct gcc cgt tgc aac aaa gcg tat gga gag cag gaa gat 1200
 Ile Leu Leu Ser Ala Arg Cys Asn Lys Ala Tyr Gly Glu Gln Glu Asp
 385 390 395 400

tac ttc gat cac gcc aat acg att ggc tgg gta cgt cgt ggc gta gag 1248
 Tyr Phe Asp His Ala Asn Thr Ile Gly Trp Val Arg Arg Gly Val Glu
 405 410 415

gaa atc gaa ggt tcc ggt tgt gca gtg gtc atc tcc aac ggg gat gac 1296
 Glu Ile Glu Gly Ser Gly Cys Ala Val Val Ile Ser Asn Gly Asp Asp
 420 425 430

ggt gag aag aga atg ttc atc gga gag cat cgt gct ggt gaa gtc tgg 1344
 Gly Glu Lys Arg Met Phe Ile Gly Glu His Arg Ala Gly Glu Val Trp
 435 440 445

gtg gat ctg acg aag agc tgt gat gat cag att acc att gag gaa gac 1392
 Val Asp Leu Thr Lys Ser Cys Asp Asp Gln Ile Thr Ile Glu Glu Asp
 450 455 460

ggc tgg gcc acc ttc cat gtg tgc ggt gga ggt gtc tcg gta tgg gct 1440
 Gly Trp Ala Thr Phe His Val Cys Gly Gly Val Ser Val Trp Ala
 465 470 475 480

ctt cct gaa cag aat gag gac tgc gct gac gct gag 1476
 Leu Pro Glu Gln Asn Glu Asp Cys Ala Asp Ala Glu
 485 490

<210> 4
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> *Bacillus circulans*

<400> 4

Lys Arg Asn His Thr Met Met Gln Phe Phe Glu Trp His Leu Ala Ala
 1 5 10 15

Asp Gly Asp His Trp Lys Arg Leu Ala Glu Met Ala Pro Glu Leu Lys
 20 25 30

Ala Lys Gly Ile Asp Thr Val Trp Val Pro Pro Val Thr Lys Ala Val
 35 40 45

Ser Ala Glu Asp Thr Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly
 50 55 60

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

Glu Leu Ile Glu Ala Ile Ala Glu Cys Gln Lys Asn Gly Ile Ala Val
 85 90 95

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

ES 2 734 183 T3

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

355		360		365	
Gly Ile Gly Gly Pro Glu Pro Val Asp Gly Lys Lys Glu Ile Leu Asp					
370		375		380	
Ile Leu Leu Ser Ala Arg Cys Asn Lys Ala Tyr Gly Glu Gln Glu Asp					
385		390		395	400
Tyr Phe Asp His Ala Asn Thr Ile Gly Trp Val Arg Arg Gly Val Glu					
	405		410		415
Glu Ile Glu Gly Ser Gly Cys Ala Val Val Ile Ser Asn Gly Asp Asp					
	420		425		430
Gly Glu Lys Arg Met Phe Ile Gly Glu His Arg Ala Gly Glu Val Trp					
	435		440		445
Val Asp Leu Thr Lys Ser Cys Asp Asp Gln Ile Thr Ile Glu Glu Asp					
	450		455		460
Gly Trp Ala Thr Phe His Val Cys Gly Gly Gly Val Ser Val Trp Ala					
465		470		475	480
Leu Pro Glu Gln Asn Glu Asp Cys Ala Asp Ala Glu					
	485		490		
<210> 5					
<211> 1455					
<212> ADN					
<213> bacillus sp.					
<220>					
<221> CDS					
<222> (1) .. (1455)					
<400> 5					
cat cat aat ggg aca aat ggg acg atg atg caa tac ttt gaa tgg cac					48
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His					
1 5 10 15					
ttg cct aat gat ggg aat cac tgg aat aga tta aga gat gat gct agt					96
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ser					
20 25 30					
aat cta aga aat aga ggt ata acc gct att tgg att ccg cct gcc tgg					144
Asn Leu Arg Asn Arg Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Trp					
35 40 45					
aaa ggg act tcg caa aat gat gtg ggg tat gga gcc tat gat ctt tac					192
Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr					
50 55 60					
gat tta ggg gaa ttt aat caa aag ggg acg gtt cgt act aag tat ggg					240

Asp 65	Leu	Gly	Glu	Phe	Asn 70	Gln	Lys	Gly	Thr	Val 75	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly 80	
aca	cgt	agt	caa	ttg	gag	tct	gcc	atc	cat	gct	tta	aag	aat	aat	ggc	288
Thr	Arg	Ser	Gln	Leu	Glu	Ser	Ala	Ile	His	Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Gly	
				85					90					95		
ggt	caa	ggt	tat	ggg	gat	gta	gtg	atg	aac	cat	aaa	gga	gga	gct	gat	336
Val	Gln	Val	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Met	Asn	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp	
			100					105					110			
gct	aca	gaa	aac	ggt	ctt	gct	gtc	gag	gtg	aat	cca	aat	aac	cgg	aat	384
Ala	Thr	Glu	Asn	Val	Leu	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Asn	Asn	Arg	Asn	
		115					120					125				
caa	gaa	ata	tct	ggg	gac	tac	aca	att	gag	gct	tgg	act	aag	ttt	gat	432
Gln	Glu	Ile	Ser	Gly	Asp	Tyr	Thr	Ile	Glu	Ala	Trp	Thr	Lys	Phe	Asp	
	130					135					140					
ttt	cca	ggg	agg	ggt	aat	aca	tac	tca	gac	ttt	aaa	tgg	cgt	tgg	tat	480
Phe	Pro	Gly	Arg	Gly	Asn	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp	Tyr	
145					150					155					160	
cat	ttc	gat	ggt	gta	gat	tgg	gat	caa	tca	cga	caa	ttc	caa	aat	cgt	528
His	Phe	Asp	Gly	Val	Asp	Trp	Asp	Gln	Ser	Arg	Gln	Phe	Gln	Asn	Arg	
				165				170						175		
atc	tac	aaa	ttc	cga	ggt	gat	ggc	aaa	gct	tgg	gat	tgg	gaa	gta	gat	576
Ile	Tyr	Lys	Phe	Arg	Gly	Asp	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Asp	
			180					185					190			
tcg	gaa	aat	gga	aat	tat	gat	tat	tta	atg	tat	gca	gat	gta	gat	atg	624
Ser	Glu	Asn	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Val	Asp	Met	
		195				200						205				
gat	cat	ccg	gag	gta	gta	aat	gag	ctt	aga	aga	tgg	gga	gaa	tgg	tat	672
Asp	His	Pro	Glu	Val	Val	Asn	Glu	Leu	Arg	Arg	Trp	Gly	Glu	Trp	Tyr	
	210					215					220					
aca	aat	aca	tta	aat	ctt	gat	gga	ttt	agg	atc	gat	gcg	gtg	aag	cat	720
Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Val	Lys	His	
225					230					235					240	
att	aaa	tat	agc	ttt	aca	cgt	gat	tgg	ttg	acc	cat	gta	aga	aac	gca	768
Ile	Lys	Tyr	Ser	Phe	Thr	Arg	Asp	Trp	Leu	Thr	His	Val	Arg	Asn	Ala	
				245				250						255		
acg	gga	aaa	gaa	atg	ttt	gct	ggt	gct	gaa	ttt	tgg	aaa	aat	gat	tta	816
Thr	Gly	Lys	Glu	Met	Phe	Ala	Val	Ala	Glu	Phe	Trp	Lys	Asn	Asp	Leu	
			260					265					270			
ggt	gcc	ttg	gag	aac	tat	tta	aat	aaa	aca	aac	tgg	aat	cat	tct	gtc	864
Gly	Ala	Leu	Glu	Asn	Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Asn	Trp	Asn	His	Ser	Val	
		275					280					285				
ttt	gat	gtc	ccc	ctt	cat	tat	aat	ctt	tat	aac	gcg	tca	aat	agt	gga	912
Phe	Asp	Val	Pro	Leu	His	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ala	Ser	Asn	Ser	Gly	
	290					295					300					
ggc	aac	tat	gac	atg	gca	aaa	ctt	ctt	aat	gga	acg	ggt	ggt	caa	aag	960
Gly	Asn	Tyr	Asp	Met	Ala	Lys	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Val	Gln	Lys	
305					310					315					320	

cat cca atg cat gcc gta act ttt gtg gat aat cac gat tct caa cct 1008
 His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro
 325 330 335

ggg gaa tca tta gaa tca ttt gta caa gaa tgg ttt aag cca ctt gct 1056
 Gly Glu Ser Leu Glu Ser Phe Val Gln Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala
 340 345 350

tat gcg ctt att tta aca aga gaa caa ggc tat ccc tct gtc ttc tat 1104
 Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr
 355 360 365

ggt gac tac tat gga att cca aca cat agt gtc cca gca atg aaa gcc 1152
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Ser Val Pro Ala Met Lys Ala
 370 375 380

aag att gat cca atc tta gag gcg cgt caa aat ttt gca tat gga aca 1200
 Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Asn Phe Ala Tyr Gly Thr
 385 390 395 400

caa cat gat tat ttt gac cat cat aat ata atc gga tgg aca cgt gaa 1248
 Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
 405 410 415

gga aat acc acg cat ccc aat tca gga ctt gcg act atc atg tcg gat 1296
 Gly Asn Thr Thr His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp
 420 425 430

ggg cca ggg gga gag aaa tgg atg tac gta ggg caa aat aaa gca ggt 1344
 Gly Pro Gly Gly Glu Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Asn Lys Ala Gly
 435 440 445

caa gtt tgg cat gac ata act gga aat aaa cca gga aca gtt acg atc 1392
 Gln Val Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Lys Pro Gly Thr Val Thr Ile
 450 455 460

aat gca gat gga tgg gct aat ttt tca gta aat gga gga tct gtt tcc 1440
 Asn Ala Asp Gly Trp Ala Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
 465 470 475 480

att tgg gtg aaa cga 1455
 Ile Trp Val Lys Arg
 485

<210> 6
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> bacillus sp.

<400> 6

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

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

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

ES 2 734 183 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Trp Val Lys Arg
485

<210> 7
<211> 1455
<212> ADN
<213> Bacillus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1455)

<400> 7
cat cat aac ggt acg aac ggg aca atg atg caa tac ttt gaa tgg tat
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr

ES 2 734 183 T3

1	5	10	15	
cta cct aat gac gga aat cat tgg aat cga tta aac tct gat gcg agt				96
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Asn Ser Asp Ala Ser	20	25	30	
aac ctt aaa agc aaa ggg att aca gcg gtg tgg att cct cca gca tgg				144
Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp	35	40	45	
aag ggc gct tct caa aat gac gta gga tac gga gcc tat gac ctg tat				192
Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr	50	55	60	
gat ctg gga gaa ttt aat caa aaa ggt acc gtc cgt aca aaa tat gga				240
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly	65	70	75	80
aca cgt agt cag tta caa gct gcg gta acc tcc tta aaa aat aat gga				288
Thr Arg Ser Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly	85	90	95	
att caa gta tat ggt gac gtt gtt atg aat cac aaa ggt ggc gca gac				336
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp	100	105	110	
gct act gaa atg gta agg gcc gtt gaa gtg aat ccc aat aac cgt aac				384
Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn	115	120	125	
caa gaa gtg act ggt gaa tat acc att gaa gct tgg act aga ttt gat				432
Gln Glu Val Thr Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Arg Phe Asp	130	135	140	
ttt cca ggg cga gga aat act cat tct agc ttt aaa tgg aga tgg tat				480
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr	145	150	155	160
cat ttt gat ggt gtg gat tgg gat cag tca cgt aga ctg aac aat cgc				528
His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Arg Leu Asn Asn Arg	165	170	175	
atc tat aaa ttt aga ggt cat ggc aaa gct tgg gat tgg gaa gtt gat				576
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly His Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp	180	185	190	
acg gaa aat ggt aat tat gat tat tta atg tac gct gat att gat atg				624
Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met	195	200	205	
gat cac cca gaa gta gta aat gaa tta aga aat tgg ggt gtt tgg tac				672
Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr	210	215	220	
aca aac aca tta gga ctc gat gga ttt aga ata gat gcg gtt aaa cat				720
Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His	225	230	235	240
ata aag tat agc ttt acg cgc gat tgg att aat cac gtt aga agt gca				768
Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala	245	250	255	
aca ggt aaa aat atg ttt gcg gtt gct gag ttt tgg aag aat gat tta				816

Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu	
260 265 270	
ggt gca att gaa aac tat ctg cag aaa aca aac tgg aac cat tca gtc	864
Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Gln Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val	
275 280 285	
ttt gat gtg ccg tta cat tat aat ctt tat aat gca tca aaa agc gga	912
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly	
290 295 300	
ggg aac tat gat atg cga aac ata ttt aat gga acg gtt gtt caa cga	960
Gly Asn Tyr Asp Met Arg Asn Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg	
305 310 315 320	
cat cca agt cat gct gta aca ttt gtt gat aat cat gat tgc cag cct	1008
His Pro Ser His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro	
325 330 335	
gaa gaa gca tta gaa tct ttt gtt gaa gaa tgg ttt aaa cca tta gcg	1056
Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala	
340 345 350	
tat gcg ctt aca tta acg cgt gaa caa gga tac cct tct gta ttt tac	1104
Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr	
355 360 365	
gga gat tat tat ggg att cca aca cat gga gtg cca gca atg aga tca	1152
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Arg Ser	
370 375 380	
aaa atc gat ccg att tta gaa gca cgt caa aag tat gca tac gga aaa	1200
Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Lys	
385 390 395 400	
caa aat gat tac tta gac cat cat aat atc att ggt tgg acg cgt gaa	1248
Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu	
405 410 415	
ggg aat aca gca cac ccc aat tca ggt cta gct acc atc atg tct gat	1296
Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp	
420 425 430	
gga gcg ggt gga agt aag tgg atg ttt gtt ggg cgt aat aag gct ggt	1344
Gly Ala Gly Gly Ser Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly	
435 440 445	
caa gta tgg agt gat att aca gga aac cgt aca ggt acg gtt aca atc	1392
Gln Val Trp Ser Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile	
450 455 460	
aat gca gac ggt tgg ggc aat ttc tct gtg aat gga ggg tca gtt tct	1440
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser	
465 470 475 480	
att tgg gtc aac aaa	1455
Ile Trp Val Asn Lys	
485	

<210> 8
 <211> 485
 <212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 734 183 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Trp Val Asn Lys
485

<210> 9
 <211> 1458
 <212> ADN
 <213> Bacillus sp.

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

<400> 9
 cac cat aat ggt acg aac ggc aca atg atg cag tac ttt gaa tgg tat 48
 His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
 1 5 10 15
 cta cca aat gac gga aac cat tgg aat aga tta agg tct gat gca agt 96
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser
 20 25 30
 aac cta aaa gat aaa ggg atc tca gcg gtt tgg att cct cct gca tgg 144
 Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Ser Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
 35 40 45
 aag ggt gcc tct caa aat gat gtg ggg tat ggt gct tat gat ctg tat 192
 Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
 50 55 60
 gat tta gga gaa ttc aat caa aaa gga acc att cgt aca aaa tat gga 240
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly
 65 70 75 80
 acg cgc aat cag tta caa gct gca gtt aac gcc ttg aaa agt aat gga 288
 Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Asn Ala Leu Lys Ser Asn Gly
 85 90 95
 att caa gtg tat ggc gat gtt gta atg aat cat aaa ggg gga gca gac 336
 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
 100 105 110
 gct acc gaa atg gtt agg gcg gtt gaa gta aac ccg aat aat aga aat 384
 Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn
 115 120 125
 caa gaa gtg tcc ggt gaa tat aca att gag gct tgg aca aag ttt gac 432
 Gln Glu Val Ser Gly Glu Thr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
 130 135 140
 ttt cct gga cga ggt aat acc cat tca aac ttc aaa tgg aga tgg tat 480
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
 145 150 155 160
 cac ttt gat gga gta gat tgg gat cag tca cgt aag ctg aac aat cga 528
 His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Lys Leu Asn Asn Arg
 165 170 175
 att tat aaa ttt aga ggt gat gga aaa ggg tgg gat tgg gaa gtc gat 576
 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Gly Trp Asp Trp Trp Glu Val Asp
 180 185 190
 aca gaa aac ggt aac tat gat tac cta atg tat gca gat att gac atg 624
 Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met

ES 2 734 183 T3

195	200	205	
gat cac cca gag gta gtg aat gag cta aga aat tgg ggt gtt tgg tat Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr 210 215 220			672
acg aat aca tta ggc ctt gat ggt ttt aga ata gat gca gta aaa cat Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His 225 230 235 240			720
ata aaa tac agc ttt act cgt gat tgg atc aat cat gtt aga agt gca Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala 245 250 255			768
act ggc aaa aat atg ttt gcg gtt gcg gaa ttt tgg aaa aat gat tta Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu 260 265 270			816
ggt gct att gaa aac tat tta aac aaa aca aac tgg aac cat tca gtc Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val 275 280 285			864
ttt gat gtt ccg ctg cac tat aac ctc tat aat gct tca aaa agc gga Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly 290 295 300			912
ggg aat tat gat atg agg caa ata ttt aat ggt aca gtc gtg caa aga Gly Asn Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg 305 310 315 320			960
cat cca atg cat gct gtt aca ttt gtt gat aat cat gat tcg caa cct His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro 325 330 335			1008
gaa gaa gct tta gag tct ttt gtt gaa gaa tgg ttc aaa cca tta gcg Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala 340 345 350			1056
tat gct ttg aca tta aca cgt gaa caa ggc tac cct tct gta ttt tat Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr 355 360 365			1104
gga gat tat tat ggc att cca acg cat ggt gta cca gcg atg aaa tcg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser 370 375 380			1152
aaa att gac ccg att cta gaa gcg cgt caa aag tat gca tat gga aga Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Arg 385 390 395 400			1200
caa aat gac tac tta gac cat cat aat atc att ggt tgg aca cgt gaa Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu 405 410 415			1248
ggg aat aca gca cac ccc aac tct ggt tta gct act atc atg tcc gat Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp 420 425 430			1296
gga gca gga gga aat aag tgg atg ttt gtt ggg cgt aat aaa gct ggt Gly Ala Gly Gly Asn Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly 435 440 445			1344
caa gtt tgg acc gat atc act gga aat cgt gca ggt act gtt acg att			1392

Gln Val Trp Thr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ala Gly Thr Val Thr Ile
 450 455 460
 aat gct gat gga tgg ggt aat ttt tct gta aat gga gga tca gtt tct 1440
 Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
 465 470 475 480
 att tgg gta aac aaa taa 1458
 Ile Trp Val Asn Lys
 485
 <210> 10
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> Bacillus sp.
 <400> 10
 His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
 1 5 10 15
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser
 20 25 30
 Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Ser Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
 35 40 45
 Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
 50 55 60
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly
 65 70 75 80
 Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Asn Ala Leu Lys Ser Asn Gly
 85 90 95
 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
 100 105 110
 Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn
 115 120 125
 Gln Glu Val Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
 130 135 140
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
 145 150 155 160
 His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Lys Leu Asn Asn Arg
 165 170 175

ES 2 734 183 T3

Ile	Tyr	Lys	Phe	Arg	Gly	Asp	Gly	Lys	Gly	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Asp	
			180					185					190			
Thr	Glu	Asn	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Ile	Asp	Met	
		195					200					205				
Asp	His	Pro	Glu	Val	Val	Asn	Glu	Leu	Arg	Asn	Trp	Gly	Val	Trp	Tyr	
	210					215					220					
Thr	Asn	Thr	Leu	Gly	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Val	Lys	His	
225					230					235					240	
Ile	Lys	Tyr	Ser	Phe	Thr	Arg	Asp	Trp	Ile	Asn	His	Val	Arg	Ser	Ala	
				245					250					255		
Thr	Gly	Lys	Asn	Met	Phe	Ala	Val	Ala	Glu	Phe	Trp	Lys	Asn	Asp	Leu	
			260					265					270			
Gly	Ala	Ile	Glu	Asn	Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Asn	Trp	Asn	His	Ser	Val	
		275					280					285				
Phe	Asp	Val	Pro	Leu	His	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ala	Ser	Lys	Ser	Gly	
	290					295					300					
Gly	Asn	Tyr	Asp	Met	Arg	Gln	Ile	Phe	Asn	Gly	Thr	Val	Val	Gln	Arg	
305					310					315					320	
His	Pro	Met	His	Ala	Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Ser	Gln	Pro	
				325					330					335		
Glu	Glu	Ala	Leu	Glu	Ser	Phe	Val	Glu	Glu	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	
			340					345					350			
Tyr	Ala	Leu	Thr	Leu	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	Tyr	Pro	Ser	Val	Phe	Tyr	
		355					360					365				
Gly	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Pro	Thr	His	Gly	Val	Pro	Ala	Met	Lys	Ser	
	370					375					380					
Lys	Ile	Asp	Pro	Ile	Leu	Glu	Ala	Arg	Gln	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Arg	
385					390					395					400	
Gln	Asn	Asp	Tyr	Leu	Asp	His	His	Asn	Ile	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu	
				405					410					415		
Gly	Asn	Thr	Ala	His	Pro	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala	Thr	Ile	Met	Ser	Asp	
			420					425					430			

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

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

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

Ile Trp Val Asn Lys
485

<210> 11
<211> 1455
<212> ADN
<213> Bacillus Sp

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1455)

<400> 11
cat cat aat gga aca aat ggt act atg atg caa tat ttc gaa tgg tat 48
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
1 5 10 15
ttg cca aat gac ggg aat cat tgg aac agg ttg agg gat gac gca gct 96
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala
20 25 30
aac tta aag agt aaa ggg ata aca gct gta tgg att cca cct gca tgg 144
Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp
35 40 45
aag ggg act tcc cag aat gat gta ggt tat gga gcc tat gat tta tat 192
Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
50 55 60
gat ctt gga gag ttt aac cag aag ggg acg gtt cgt aca aaa tat gga 240
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly
65 70 75 80
aca cgc aac cag ctg cag gct gcc gtg aca tct tta aaa aat aac ggc 288
Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly
85 90 95
att cag gta tat ggt gat gtc gtc atg aat cat aaa ggt gga gca gat 336
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
100 105 110
ggt acg gaa att gta aat gcg gta gaa gtg aat cgg agc aac cga aac 384
Gly Thr Glu Ile Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn
115 120 125
cag gaa acc tca gga gag tat gca ata gaa gcg tgg aca aag ttt gat 432
Gln Glu Thr Ser Gly Glu Tyr Ala Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
130 135 140

ttt cct gga aga gga aat aac cat tcc agc ttt aag tgg cgc tgg tat	480
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Asn His Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr	
145 150 155 160	
cat ttt gat ggg aca gat tgg gat cag tca cgc cag ctt caa aac aaa	528
His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Lys	
165 170 175	
ata tat aaa ttc agg gga aca ggc aag gcc tgg gac tgg gaa gtc gat	576
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp	
180 185 190	
aca gag aat ggc aac tat gac tat ctt atg tat gca gac gtg gat atg	624
Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Met	
195 200 205	
gat cac cca gaa gta ata cat gaa ctt aga aac tgg gga gtg tgg tat	672
Asp His Pro Glu Val Ile His Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr	
210 215 220	
acg aat aca ctg aac ctt gat gga ttt aga ata gat gca gtg aaa cat	720
Thr Asn Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His	
225 230 235 240	
ata aaa tat agc ttt acg aga gat tgg ctt aca cat gtg cgt aac acc	768
Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr	
245 250 255	
aca ggt aaa cca atg ttt gca gtg gct gag ttt tgg aaa aat gac ctt	816
Thr Gly Lys Pro Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu	
260 265 270	
ggt gca att gaa aac tat ttg aat aaa aca agt tgg aat cac tcg gtg	864
Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Trp Asn His Ser Val	
275 280 285	
ttt gat gtt cct ctc cac tat aat ttg tac aat gca tct aat agc ggt	912
Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly	
290 295 300	
ggt tat tat gat atg aga aat att tta aat ggt tct gtg gtg caa aaa	960
Gly Tyr Tyr Asp Met Arg Asn Ile Leu Asn Gly Ser Val Val Gln Lys	
305 310 315 320	
cat cca aca cat gcc gtt act ttt gtt gat aac cat gat tct cag ccc	1008
His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro	
325 330 335	
ggg gaa gca ttg gaa tcc ttt gtt caa caa tgg ttt aaa cca ctt gca	1056
Gly Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Gln Gln Trp Phe Lys Pro Leu Ala	
340 345 350	
tat gca ttg gtt ctg aca agg gaa caa ggt tat cct tcc gta ttt tat	1104
Tyr Ala Leu Val Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr	
355 360 365	
ggg gat tac tac ggt atc cca acc cat ggt gtt ccg gct atg aaa tct	1152
Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser	
370 375 380	
aaa ata gac cct ctt ctg cag gca cgt caa act ttt gcc tat ggt acg	1200
Lys Ile Asp Pro Leu Leu Gln Ala Arg Gln Thr Phe Ala Tyr Gly Thr	

385	390	395	400	
cag cat gat tac ttt gat cat cat gat att atc ggt tgg aca aga gag				1248
Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu				
	405	410	415	
gga aat agc tcc cat cca aat tca ggc ctt gcc acc att atg tca gat				1296
Gly Asn Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp				
	420	425	430	
ggt cca ggt ggt aac aaa tgg atg tat gtg ggg aaa aat aaa gcg gga				1344
Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Asn Lys Ala Gly				
	435	440	445	
caa gtt tgg aga gat att acc gga aat agg aca ggc acc gtc aca att				1392
Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Thr Gly Thr Val Thr Ile				
	450	455	460	
aat gca gac gga tgg ggt aat ttc tct gtt aat gga ggg tcc gtt tcg				1440
Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser				
	465	470	475	480
ggt tgg gtg aag caa				1455
Val Trp Val Lys Gln				
	485			
<210>	12			
<211>	485			
<212>	PRT			
<213>	Bacillus Sp			
<400>	12			
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr				
1	5	10	15	
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ala				
	20	25	30	
Asn Leu Lys Ser Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp				
	35	40	45	
Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr				
	50	55	60	
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly				
65	70	75	80	
Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ser Leu Lys Asn Asn Gly				
	85	90	95	
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp				
	100	105	110	
Gly Thr Glu Ile Val Asn Ala Val Glu Val Asn Arg Ser Asn Arg Asn				

ES 2 734 183 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Trp Val Lys Gln
485

<210> 13
<211> 1452
<212> ADN
<213> Bacillus amyloliquefaciens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1449)

<400> 13
gta aat ggc acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tat acg ccg aac gac 48
Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
1 5 10 15
ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat gcg gaa cat tta tcg gat 96
Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
20 25 30
atc gga atc act gcc gtc tgg att cct ccc gca tac aaa gga ttg agc 144
Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser
35 40 45
caa tcc gat aac gga tac gga cct tat gat ttg tat gat tta gga gaa 192
Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
50 55 60
ttc cag caa aaa ggg acg gtc aga acg aaa tac ggc aca aaa tca gag 240
Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ser Glu
65 70 75 80

ctt	caa	gat	gcg	atc	ggc	tca	ctg	cat	tcc	cgg	aac	gtc	caa	gta	tac	288
Leu	Gln	Asp	Ala	Ile	Gly	Ser	Leu	His	Ser	Arg	Asn	Val	Gln	Val	Tyr	
			85						90					95		
gga	gat	gtg	gtt	ttg	aat	cat	aag	gct	ggt	gct	gat	gca	aca	gaa	gat	336
Gly	Asp	Val	Val	Leu	Asn	His	Lys	Ala	Gly	Ala	Asp	Ala	Thr	Glu	Asp	
			100					105					110			
gta	act	gcc	gtc	gaa	gtc	aat	ccg	gcc	aat	aga	aat	cag	gaa	act	tcg	384
Val	Thr	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Ala	Asn	Arg	Asn	Gln	Glu	Thr	Ser	
		115					120					125				
gag	gaa	tat	caa	atc	aaa	gcg	tgg	acg	gat	ttt	cgt	ttt	ccg	ggc	cgt	432
Glu	Glu	Tyr	Gln	Ile	Lys	Ala	Trp	Thr	Asp	Phe	Arg	Phe	Pro	Gly	Arg	
	130					135					140					
gga	aac	acg	tac	agt	gat	ttt	aaa	tgg	cat	tgg	tat	cat	ttc	gac	gga	480
Gly	Asn	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	His	Trp	Tyr	His	Phe	Asp	Gly	
145					150					155					160	
gcg	gac	tgg	gat	gaa	tcc	cgg	aag	atc	agc	cgc	atc	ttt	aag	ttt	cgt	528
Ala	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Ile	Ser	Arg	Ile	Phe	Lys	Phe	Arg	
				165					170					175		
ggg	gaa	gga	aaa	gcg	tgg	gat	tgg	gaa	gta	tca	agt	gaa	aac	ggc	aac	576
Gly	Glu	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Ser	Ser	Glu	Asn	Gly	Asn	
			180					185					190			
tat	gac	tat	tta	atg	tat	gct	gat	gtt	gac	tac	gac	cac	cct	gat	gtc	624
Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Val	Asp	Tyr	Asp	His	Pro	Asp	Val	
		195					200					205				
gtg	gca	gag	aca	aaa	aaa	tgg	ggt	atc	tgg	tat	gcg	aat	gaa	ctg	tca	672
Val	Ala	Glu	Thr	Lys	Lys	Trp	Gly	Ile	Trp	Tyr	Ala	Asn	Glu	Leu	Ser	
	210					215					220					
tta	gac	ggc	ttc	cgt	att	gat	gcc	gcc	aaa	cat	att	aaa	ttt	tca	ttt	720
Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Ile	Lys	Phe	Ser	Phe	
225					230					235					240	
ctg	cgt	gat	tgg	gtt	cag	gcg	gtc	aga	cag	gcg	acg	gga	aaa	gaa	atg	768
Leu	Arg	Asp	Trp	Val	Gln	Ala	Val	Arg	Gln	Ala	Thr	Gly	Lys	Glu	Met	
				245					250					255		
ttt	acg	gtt	gcg	gag	tat	tgg	cag	aat	aat	gcc	ggg	aaa	ctc	gaa	aac	816
Phe	Thr	Val	Ala	Glu	Tyr	Trp	Gln	Asn	Asn	Ala	Gly	Lys	Leu	Glu	Asn	
		260						265					270			
tac	ttg	aat	aaa	aca	agc	ttt	aat	caa	tcc	gtg	ttt	gat	gtt	ccg	ctt	864
Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Ser	Phe	Asn	Gln	Ser	Val	Phe	Asp	Val	Pro	Leu	
		275					280					285				
cat	ttc	aat	tta	cag	gcg	gct	tcc	tca	caa	gga	ggc	gga	tat	gat	atg	912
His	Phe	Asn	Leu	Gln	Ala	Ala	Ser	Ser	Gln	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asp	Met	
	290					295					300					
agg	cgt	ttg	ctg	gac	ggt	acc	gtt	gtg	tcc	agg	cat	ccg	gaa	aag	gcg	960
Arg	Arg	Leu	Leu	Asp	Gly	Thr	Val	Val	Ser	Arg	His	Pro	Glu	Lys	Ala	
305					310					315					320	
gtt	aca	ttt	gtt	gaa	aat	cat	gac	aca	cag	ccg	gga	cag	tca	ttg	gaa	1008
Val	Thr	Phe	Val	Glu	Asn	His	Asp	Thr	Gln	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	
				325					330					335		

tcg aca gtc caa act tgg ttt aaa ccg ctt gca tac gcc ttt att ttg	1056
Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu	
340 345 350	
aca aga gaa tcc ggt tat cct cag gtg ttc tat ggg gat atg tac ggg	1104
Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly	
355 360 365	
aca aaa ggg aca tcg cca aag gaa att ccc tca ctg aaa gat aat ata	1152
Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp Asn Ile	
370 375 380	
gag ccg att tta aaa gcg cgt aag gag tac gca tac ggg ccc cag cac	1200
Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro Gln His	
385 390 395 400	
gat tat att gac cac ccg gat gtg atc gga tgg acg agg gaa ggt gac	1248
Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp	
405 410 415	
agc tcc gcc gcc aaa tca ggt ttg gcc gct tta atc acg gac gga ccc	1296
Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro	
420 425 430	
ggc gga tca aag cgg atg tat gcc ggc ctg aaa aat gcc ggc gag aca	1344
Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys Asn Ala Gly Glu Thr	
435 440 445	
tgg tat gac ata acg ggc aac cgt tca gat act gta aaa atc gga tct	1392
Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Lys Ile Gly Ser	
450 455 460	
gac ggc tgg gga gag ttt cat gta aac gat ggg tcc gtc tcc att tat	1440
Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp Gly Ser Val Ser Ile Tyr	
465 470 475 480	
gtt cag aaa taa	1452
Val Gln Lys	

<210> 14
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 14

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

ES 2 734 183 T3

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

ES 2 734 183 T3

305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Gln Lys

<210> 15
<211> 1548
<212> ADN
<213> Bacillus stearothermophilus

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

<400> 15
gcc gca ccg ttt aac ggc acc atg atg cag tat ttt gaa tgg tac ttg 48
Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu
1 5 10 15
ccg gat gat ggc acg tta tgg acc aaa gtg gcc aat gaa gcc aac aac 96

Pro	Asp	Asp	Gly	Thr	Leu	Trp	Thr	Lys	Val	Ala	Asn	Glu	Ala	Asn	Asn	
			20					25					30			
tta	tcc	agc	ctt	ggc	atc	acc	gct	ctt	tgg	ctg	ccg	ccc	gct	tac	aaa	144
Leu	Ser	Ser	Leu	Gly	Ile	Thr	Ala	Leu	Trp	Leu	Pro	Pro	Ala	Tyr	Lys	
		35					40				45					
gga	aca	agc	cgc	agc	gac	gta	ggg	tac	gga	gta	tac	gac	ttg	tat	gac	192
Gly	Thr	Ser	Arg	Ser	Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Val	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asp	
	50					55					60					
ctc	ggc	gaa	ttc	aat	caa	aaa	ggg	acc	gtc	cgc	aca	aaa	tac	gga	aca	240
Leu	Gly	Glu	Phe	Asn	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly	Thr	
65					70					75					80	
aaa	gct	caa	tat	ctt	caa	gcc	att	caa	gcc	gcc	cac	gcc	gct	gga	atg	288
Lys	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Ala	Ile	Gln	Ala	Ala	His	Ala	Ala	Gly	Met	
				85					90					95		
caa	gtg	tac	gcc	gat	gtc	gtg	ttc	gac	cat	aaa	ggc	ggc	gct	gac	ggc	336
Gln	Val	Tyr	Ala	Asp	Val	Val	Phe	Asp	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp	Gly	
			100					105					110			
acg	gaa	tgg	gtg	gac	gcc	gtc	gaa	gtc	aat	ccg	tcc	gac	cgc	aac	caa	384
Thr	Glu	Trp	Val	Asp	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Ser	Asp	Arg	Asn	Gln	
		115					120					125				
gaa	atc	tcg	ggc	acc	tat	caa	atc	caa	gca	tgg	acg	aaa	ttt	gat	ttt	432
Glu	Ile	Ser	Gly	Thr	Tyr	Gln	Ile	Gln	Ala	Trp	Thr	Lys	Phe	Asp	Phe	
	130					135					140					
ccc	ggg	cgg	ggc	aac	acc	tac	tcc	agc	ttt	aag	tgg	cgc	tgg	tac	cat	480
Pro	Gly	Arg	Gly	Asn	Thr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp	Tyr	His	
145					150					155					160	
ttt	gac	ggc	gtt	gat	tgg	gac	gaa	agc	cga	aaa	ttg	agc	cgc	att	tac	528
Phe	Asp	Gly	Val	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Arg	Ile	Tyr	
				165					170					175		
aaa	ttc	cgc	ggc	atc	ggc	aaa	gcg	tgg	gat	tgg	gaa	gta	gac	acg	gaa	576
Lys	Phe	Arg	Gly	Ile	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Asp	Thr	Glu	
			180				185						190			
aac	gga	aac	tat	gac	tac	tta	atg	tat	gcc	gac	ctt	gat	atg	gat	cat	624
Asn	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Leu	Asp	Met	Asp	His	
		195					200					205				
ccc	gaa	gtc	gtg	acc	gag	ctg	aaa	aac	tgg	ggg	aaa	tgg	tat	gtc	aac	672
Pro	Glu	Val	Val	Thr	Glu	Leu	Lys	Asn	Trp	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Asn	
	210					215					220					
aca	acg	aac	att	gat	ggg	ttc	cgg	ctt	gat	gcc	gtc	aag	cat	att	aag	720
Thr	Thr	Asn	Ile	Asp	Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys	
	225				230					235					240	
ttc	agt	ttt	ttt	cct	gat	tgg	ttg	tcg	tat	gtg	cgt	tct	cag	act	ggc	768
Phe	Ser	Phe	Phe	Pro	Asp	Trp	Leu	Ser	Tyr	Val	Arg	Ser	Gln	Thr	Gly	
				245					250					255		
aag	ccg	cta	ttt	acc	gtc	ggg	gaa	tat	tgg	agc	tat	gac	atc	aac	aag	816
Lys	Pro	Leu	Phe	Thr	Val	Gly	Glu	Tyr	Trp	Ser	Tyr	Asp	Ile	Asn	Lys	
			260					265					270			

ttg cac aat tac att acg aaa aca gac gga acg atg tct ttg ttt gat	864
Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp	
275 280 285	
gcc ccg tta cac aac aaa ttt tat acc gct tcc aaa tca ggg ggc gca	912
Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala	
290 295 300	
ttt gat atg cgc acg tta atg acc aat act ctc atg aaa gat caa ccg	960
Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro	
305 310 315 320	
aca ttg gcc gtc acc ttc gtt gat aat cat gac acc gaa ccc ggc caa	1008
Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln	
325 330 335	
gcg ctg cag tca tgg gtc gac cca tgg ttc aaa ccg ttg gct tac gcc	1056
Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala	
340 345 350	
ttt att cta act cgg cag gaa gga tac ccg tgc gtc ttt tat ggt gac	1104
Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp	
355 360 365	
tat tat ggc att cca caa tat aac att cct tcg ctg aaa agc aaa atc	1152
Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile	
370 375 380	
gat ccg ctc ctc atc gcg cgc agg gat tat gct tac gga acg caa cat	1200
Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His	
385 390 395 400	
gat tat ctt gat cac tcc gac atc atc ggg tgg aca agg gaa ggg ggc	1248
Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Gly	
405 410 415	
act gaa aaa cca gga tcc gga ctg gcc gca ctg atc acc gat ggg ccg	1296
Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro	
420 425 430	
gga gga agc aaa tgg atg tac gtt ggc aaa caa cac gct gga aaa gtg	1344
Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val	
435 440 445	
ttc tat gac ctt acc ggc aac cgg agt gac acc gtc acc atc aac agt	1392
Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser	
450 455 460	
gat gga tgg ggg gaa ttc aaa gtc aat ggc ggt tcg gtt tcg gtt tgg	1440
Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp	
465 470 475 480	
gtt cct aga aaa acg acc gtt tct acc atc gct cgg ccg atc aca acc	1488
Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr	
485 490 495	
cga ccg tgg act ggt gaa ttc gtc cgt tgg acc gaa cca cgg ttg gtg	1536
Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val	
500 505 510	
gca tgg cct tga	1548
Ala Trp Pro	
515	

ES 2 734 183 T3

<210> 16
 <211> 515
 <212> PRT
 <213> Bacillus stearothermophilus

<400> 16

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

Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn
 20 25 30

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

Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp
 50 55 60

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

Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met
 85 90 95

Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly
 100 105 110

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

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

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

Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr
 165 170 175

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

Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His
 195 200 205

Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn
 210 215 220

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

Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly
245 250 255

Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys
260 265 270

Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asp Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp
275 280 285

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

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

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

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

Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp
355 360 365

Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile
370 375 380

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

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

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

Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val
435 440 445

Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser
450 455 460

Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp

465		470		475		480										
Val	Pro	Arg	Lys	Thr	Thr	Val	Ser	Thr	Ile	Ala	Arg	Pro	Ile	Thr	Thr	
				485					490				495			
Arg	Pro	Trp	Thr	Gly	Glu	Phe	Val	Arg	Trp	Thr	Glu	Pro	Arg	Leu	Val	
			500					505					510			
Ala	Trp	Pro														
			515													
<210>	17															
<211>	1455															
<212>	ADN															
<213>	bacillus sp.															
<220>																
<221>	CDS															
<222>	(1) .. (1455)															
<400>	17															
cat	cat	aat	ggg	acg	aat	ggg	acc	atg	atg	cag	tat	ttt	gaa	tgg	cat	48
His	His	Asn	Gly	Thr	Asn	Gly	Thr	Met	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	His	
1				5				10					15			
ttg	cca	aat	gac	ggg	aac	cac	tgg	aac	agg	tta	cga	gat	gac	gca	gct	96
Leu	Pro	Asn	Asp	Gly	Asn	His	Trp	Asn	Arg	Leu	Arg	Asp	Asp	Ala	Ala	
			20					25					30			
aac	tta	aag	agt	aaa	ggg	att	acc	gct	gtt	tgg	att	cct	cct	gca	tgg	144
Asn	Leu	Lys	Ser	Lys	Gly	Ile	Thr	Ala	Val	Trp	Ile	Pro	Pro	Ala	Trp	
		35					40					45				
aag	ggg	act	tcg	caa	aat	gat	gtt	ggg	tat	ggt	gcc	tat	gat	ttg	tac	192
Lys	Gly	Thr	Ser	Gln	Asn	Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Leu	Tyr	
	50					55					60					
gat	ctt	ggt	gag	ttt	aac	caa	aag	gga	acc	gtc	cgt	aca	aaa	tat	ggc	240
Asp	Leu	Gly	Glu	Phe	Asn	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly	
65					70					75					80	
aca	agg	agt	cag	ttg	caa	ggt	gcc	gtg	aca	tct	ttg	aaa	aat	aac	ggg	288
Thr	Arg	Ser	Gln	Leu	Gln	Gly	Ala	Val	Thr	Ser	Leu	Lys	Asn	Asn	Gly	
				85				90						95		
att	caa	gtt	tat	ggg	gat	gtc	gtg	atg	aat	cat	aaa	ggt	gga	gca	gac	336
Ile	Gln	Val	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Met	Asn	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp	
			100					105					110			
ggg	aca	gag	atg	gta	aat	gcg	gtg	gaa	gtg	aac	cga	agc	aac	cga	aac	384
Gly	Thr	Glu	Met	Val	Asn	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Arg	Ser	Asn	Arg	Asn	
		115					120					125				
caa	gaa	ata	tca	ggt	gaa	tac	acc	att	gaa	gca	tgg	acg	aaa	ttt	gat	432
Gln	Glu	Ile	Ser	Gly	Glu	Tyr	Thr	Ile	Glu	Ala	Trp	Thr	Lys	Phe	Asp	
	130					135					140					
ttc	cct	gga	aga	gga	aat	acc	cat	tcc	aac	ttt	aaa	tgg	cgc	tgg	tat	480

Phe 145	Pro	Gly	Arg	Gly	Asn 150	Thr	His	Ser	Asn 155	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp	Tyr 160	
cat	ttt	gat	ggg	aca	gat	tgg	gat	cag	tca	cgt	cag	ctt	cag	aac	aaa	528
His	Phe	Asp	Gly	Thr	Asp	Trp	Asp	Gln	Ser	Arg	Gln	Leu	Gln	Asn	Lys	
				165				170						175		
ata	tat	aaa	ttc	aga	ggt	acc	gga	aag	gca	tgg	gac	tgg	gaa	gta	gat	576
Ile	Tyr	Lys	Phe	Arg	Gly	Thr	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Asp	
			180					185					190			
ata	gag	aac	ggc	aac	tat	gat	tac	ctt	atg	tat	gca	gac	att	gat	atg	624
Ile	Glu	Asn	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Ile	Asp	Met	
		195					200					205				
gat	cat	cca	gaa	gta	atc	aat	gaa	ctt	aga	aat	tgg	gga	gtt	tgg	tat	672
Asp	His	Pro	Glu	Val	Ile	Asn	Glu	Leu	Arg	Asn	Trp	Gly	Val	Trp	Tyr	
	210					215					220					
aca	aat	aca	ctt	aat	cta	gat	gga	ttt	aga	atc	gat	gct	gtg	aaa	cat	720
Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Val	Lys	His	
225					230					235					240	
att	aaa	tac	agc	tat	acg	aga	gat	tgg	cta	aca	cat	gtg	cgt	aac	acc	768
Ile	Lys	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Arg	Asp	Trp	Leu	Thr	His	Val	Arg	Asn	Thr	
			245					250						255		
aca	ggt	aaa	cca	atg	ttt	gca	gtt	gca	gaa	ttt	tgg	aaa	aat	gac	ctt	816
Thr	Gly	Lys	Pro	Met	Phe	Ala	Val	Ala	Glu	Phe	Trp	Lys	Asn	Asp	Leu	
			260					265					270			
gct	gca	atc	gaa	aac	tat	tta	aat	aaa	aca	agt	tgg	aat	cac	tcc	gtg	864
Ala	Ala	Ile	Glu	Asn	Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Ser	Trp	Asn	His	Ser	Val	
		275				280						285				
ttc	gat	gtt	cct	ctt	cat	tat	aat	ttg	tac	aat	gca	tct	aat	agt	ggt	912
Phe	Asp	Val	Pro	Leu	His	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ala	Ser	Asn	Ser	Gly	
	290					295					300					
ggc	tat	ttt	gat	atg	aga	aat	att	tta	aat	ggt	tct	gtc	gta	caa	aaa	960
Gly	Tyr	Phe	Asp	Met	Arg	Asn	Ile	Leu	Asn	Gly	Ser	Val	Val	Gln	Lys	
305					310					315					320	
cac	cct	ata	cat	gca	gtc	aca	ttt	gtt	gat	aac	cat	gac	tct	cag	cca	1008
His	Pro	Ile	His	Ala	Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Ser	Gln	Pro	
				325					330					335		
gga	gaa	gca	ttg	gaa	tcc	ttt	gtt	caa	tcg	tgg	ttc	aaa	cca	ctg	gca	1056
Gly	Glu	Ala	Leu	Glu	Ser	Phe	Val	Gln	Ser	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	
			340					345					350			
tat	gca	ttg	att	ctg	aca	agg	gag	caa	ggt	tac	cct	tcc	gta	ttt	tac	1104
Tyr	Ala	Leu	Ile	Leu	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly	Tyr	Pro	Ser	Val	Phe	Tyr	
		355					360					365				
ggt	gat	tac	tac	ggt	ata	cca	act	cat	ggt	gtt	cct	tcg	atg	aaa	tct	1152
Gly	Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Pro	Thr	His	Gly	Val	Pro	Ser	Met	Lys	Ser	
	370					375					380					
aaa	att	gat	cca	ctt	ctg	cag	gca	cgt	caa	acg	tat	gcc	tac	gga	acc	1200
Lys	Ile	Asp	Pro	Leu	Leu	Gln	Ala	Arg	Gln	Thr	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Thr	
385					390					395					400	

caa cat gat tat ttt gat cat cat gat att atc ggc tgg acg aga gaa 1248
 Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu
 405 410 415

ggg gac agc tcc cac cca aat tca gga ctt gca act att atg tcc gat 1296
 Gly Asp Ser Ser His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp
 420 425 430

ggg cca ggg ggt aat aaa tgg atg tat gtc ggg aaa cat aaa gct ggc 1344
 Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys His Lys Ala Gly
 435 440 445

caa gta tgg aga gat atc acc gga aat agg tct ggt acc gtc acc att 1392
 Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Gly Thr Val Thr Ile
 450 455 460

aat gca gat ggt tgg ggg aat ttc act gta aac gga ggg gca gtt tcg 1440
 Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Thr Val Asn Gly Gly Ala Val Ser
 465 470 475 480

gtt tgg gtg aag caa 1455
 Val Trp Val Lys Gln
 485

<210> 18

<211> 485

<212> PRT

<213> bacillus sp.

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 734 183 T3

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

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

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

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

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

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

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

Val Trp Val Lys Gln
485

<210> 19
<211> 1452
<212> ADN
<213> *Bacillus licheniformis*

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1452)

<400> 19
gca aat ctt aat ggg acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tac atg ccc 48
Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro
1 5 10 15
aat gac ggc caa cat tgg agg cgt ttg caa aac gac tcg gca tat ttg 96
Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu
20 25 30
gct gaa cac ggt att act gcc gtc tgg att ccc ccg gca tat aag gga 144
Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly
35 40 45
acg agc caa gcg gat gtg ggc tac ggt gct tac gac ctt tat gat tta 192
Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu
50 55 60
ggg gag ttt cat caa aaa ggg acg gtt cgg aca aag tac ggc aca aaa 240
Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys
65 70 75 80
gga gag ctg caa tct gcg atc aaa agt ctt cat tcc cgc gac att aac 288
Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn

ES 2 734 183 T3

				85				90				95							
gtt	tac	ggg	gat	gtg	gtc	atc	aac	cac	aaa	ggc	ggc	gct	gat	gcg	acc	336			
Val	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Ile	Asn	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp	Ala	Thr				
				100				105				110							
gaa	gat	gta	acc	gcg	gtt	gaa	gtc	gat	ccc	gct	gac	cgc	aac	cgc	gta	384			
Glu	Asp	Val	Thr	Ala	Val	Glu	Val	Asp	Pro	Ala	Asp	Arg	Asn	Arg	Val				
				115				120				125							
att	tca	gga	gaa	cac	cta	att	aaa	gcc	tgg	aca	cat	ttt	cat	ttt	ccg	432			
Ile	Ser	Gly	Glu	His	Leu	Ile	Lys	Ala	Trp	Thr	His	Phe	His	Phe	Pro				
				130				135				140							
ggg	cgc	ggc	agc	aca	tac	agc	gat	ttt	aaa	tgg	cat	tgg	tac	cat	ttt	480			
Gly	Arg	Gly	Ser	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	His	Trp	Tyr	His	Phe				
				145				150				155				160			
gac	gga	acc	gat	tgg	gac	gag	tcc	cga	aag	ctg	aac	cgc	atc	tat	aag	528			
Asp	Gly	Thr	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Asn	Arg	Ile	Tyr	Lys				
				165				170				175							
ttt	caa	gga	aag	gct	tgg	gat	tgg	gaa	gtt	tcc	aat	gaa	aac	ggc	aac	576			
Phe	Gln	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Ser	Asn	Glu	Asn	Gly	Asn				
				180				185				190							
tat	gat	tat	ttg	atg	tat	gcc	gac	atc	gat	tat	gac	cat	cct	gat	gtc	624			
Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Ile	Asp	Tyr	Asp	His	Pro	Asp	Val				
				195				200				205							
gca	gca	gaa	att	aag	aga	tgg	ggc	act	tgg	tat	gcc	aat	gaa	ctg	caa	672			
Ala	Ala	Glu	Ile	Lys	Arg	Trp	Gly	Thr	Trp	Tyr	Ala	Asn	Glu	Leu	Gln				
				210				215				220							
ttg	gac	ggt	ttc	cgt	ctt	gat	gct	gtc	aaa	cac	att	aaa	ttt	tct	ttt	720			
Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys	Phe	Ser	Phe				
				225				230				235				240			
ttg	cgg	gat	tgg	gtt	aat	cat	gtc	agg	gaa	aaa	acg	ggg	aag	gaa	atg	768			
Leu	Arg	Asp	Trp	Val	Asn	His	Val	Arg	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Glu	Met				
				245				250				255							
ttt	acg	gta	gct	gaa	tat	tgg	cag	aat	gac	ttg	ggc	gcg	ctg	gaa	aac	816			
Phe	Thr	Val	Ala	Glu	Tyr	Trp	Gln	Asn	Asp	Leu	Gly	Ala	Leu	Glu	Asn				
				260				265				270							
tat	ttg	aac	aaa	aca	aat	ttt	aat	cat	tca	gtg	ttt	gac	gtg	ccg	ctt	864			
Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Asn	Phe	Asn	His	Ser	Val	Phe	Asp	Val	Pro	Leu				
				275				280				285							
cat	tat	cag	ttc	cat	gct	gca	tcg	aca	cag	gga	ggc	ggc	tat	gat	atg	912			
His	Tyr	Gln	Phe	His	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asp	Met				
				290				295				300							
agg	aaa	ttg	ctg	aac	ggt	acg	gtc	gtt	tcc	aag	cat	ccg	ttg	aaa	tcg	960			
Arg	Lys	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Val	Ser	Lys	His	Pro	Leu	Lys	Ser				
				305				310				315				320			
gtt	aca	ttt	gtc	gat	aac	cat	gat	aca	cag	ccg	ggg	caa	tcg	ctt	gag	1008			
Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Thr	Gln	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu				
				325				330				335							
tcg	act	gtc	caa	aca	tgg	ttt	aag	ccg	ctt	gct	tac	gct	ttt	att	ctc	1056			

Ser	Thr	Val	Gln	Thr	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	Tyr	Ala	Phe	Ile	Leu	
			340					345					350			
aca	agg	gaa	tct	gga	tac	cct	cag	gtt	ttc	tac	ggg	gat	atg	tac	ggg	1104
Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Tyr	Pro	Gln	Val	Phe	Tyr	Gly	Asp	Met	Tyr	Gly	
		355					360				365					
acg	aaa	gga	gac	tcc	cag	cgc	gaa	att	cct	gcc	ttg	aaa	cac	aaa	att	1152
Thr	Lys	Gly	Asp	Ser	Gln	Arg	Glu	Ile	Pro	Ala	Leu	Lys	His	Lys	Ile	
	370					375				380						
gaa	ccg	atc	tta	aaa	gcg	aga	aaa	cag	tat	gcg	tac	gga	gca	cag	cat	1200
Glu	Pro	Ile	Leu	Lys	Ala	Arg	Lys	Gln	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Ala	Gln	His	
385					390					395					400	
gat	tat	ttc	gac	cac	cat	gac	att	gtc	ggc	tgg	aca	agg	gaa	ggc	gac	1248
Asp	Tyr	Phe	Asp	His	His	Asp	Ile	Val	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu	Gly	Asp	
				405				410						415		
agc	tcg	gtt	gca	aat	tca	ggt	ttg	gcg	gca	tta	ata	aca	gac	gga	ccc	1296
Ser	Ser	Val	Ala	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Thr	Asp	Gly	Pro	
			420				425						430			
ggt	ggg	gca	aag	cga	atg	tat	gtc	ggc	cgg	caa	aac	gcc	ggt	gag	aca	1344
Gly	Gly	Ala	Lys	Arg	Met	Tyr	Val	Gly	Arg	Gln	Asn	Ala	Gly	Glu	Thr	
		435					440					445				
tgg	cat	gac	att	acc	gga	aac	cgt	tcg	gag	ccg	gtt	gtc	atc	aat	tcg	1392
Trp	His	Asp	Ile	Thr	Gly	Asn	Arg	Ser	Glu	Pro	Val	Val	Ile	Asn	Ser	
	450					455				460						
gaa	ggc	tgg	gga	gag	ttt	cac	gta	aac	ggc	ggg	tcg	gtt	tca	att	tat	1440
Glu	Gly	Trp	Gly	Glu	Phe	His	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Ile	Tyr	
465					470				475						480	
ggt	caa	aga	tag													1452
Val	Gln	Arg														

<210> 20
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> Bacillus licheniformis

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile
370 375 380

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

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

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

Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr
435 440 445

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

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

Val Gln Arg

<210> 21
<211> 1455
<212> ADN
<213> bacillus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1455)

<400> 21
cac cat aat ggc aca aat gga aca atg atg caa tat ttt gaa tgg tat 48
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr
1 5 10 15

ttg cca aat gac ggt aat cat tgg aat aga tta aga tca gat gca agt 96
Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser
20 25 30

aat ctt aaa gat aaa ggg att aca gcg gtt tgg att cca cct gct tgg	144
Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp	
35 40 45	
aaa ggg gct tct caa aat gat gta ggg tat gga gcc tat gat ctg tat	192
Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr	
50 55 60	
gat tta gga gaa ttc aat caa aaa gga acc gta cgt aca aag tac gga	240
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly	
65 70 75 80	
acc cgt aat caa tta caa gct gca gta acc gcc tta aaa agt aat ggt	288
Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Thr Ala Leu Lys Ser Asn Gly	
85 90 95	
att caa gta tac gga gat gtc gta atg aat cat aag ggt gga gcg gat	336
Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp	
100 105 110	
gcc act gag tgg gtt cga gcg gtt gaa gtg aac cca agt aat cgt aat	384
Ala Thr Glu Trp Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asn Arg Asn	
115 120 125	
caa gaa gtc tct ggt gat tat acg att gag gct tgg act aag ttt gat	432
Gln Glu Val Ser Gly Asp Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp	
130 135 140	
ttt cct ggt cga ggt aat acc cac tct aac ttt aaa tgg aga tgg tat	480
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr	
145 150 155 160	
cat ttc gat ggt gta gat tgg gat cag tca cgt caa ttg cag aat cga	528
His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Leu Gln Asn Arg	
165 170 175	
atc tat aaa ttc aga gga gat gga aaa ggt tgg gac tgg gaa gtt gat	576
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp	
180 185 190	
aca gag aac gga aac tat gac tat cta atg tac gcg gat att gat atg	624
Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met	
195 200 205	
gat cac cct gaa gta gtg aat gaa ctc aga aac tgg ggt gta tgg tat	672
Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr	
210 215 220	
acc aat aca ctg ggg cta gac ggg ttc aga ata gat gcg gta aaa cat	720
Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His	
225 230 235 240	
ata aaa tat agc ttt act cgt gat tgg ctt act cac gtt aga aat acg	768
Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Leu Thr His Val Arg Asn Thr	
245 250 255	
aca ggt aaa aat atg ttt gca gtt gca gag ttc tgg aag aat gac ata	816
Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Ile	
260 265 270	
ggt gca att gaa aat tac tta agt aaa aca aat tgg aat cat tca gtt	864
Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Ser Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val	

275	280	285	
ttt gat gtg ccc ctg cat tat aac ctt tat aat gca tcg aga agt ggt Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Arg Ser Gly 290 295 300			912
ggc aat tat gat atg agg caa ata ttt aat gga aca gtt gtt cag aga Gly Asn Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg 305 310 315 320			960
cat cct aca cat gct gta aca ttt gtt gat aac cat gat tca cag ccg His Pro Thr His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro 325 330 335			1008
gaa gaa gcc cta gag tca ttt gtt gaa gag tgg ttc aaa ccg tta gcg Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala 340 345 350			1056
tat gct ctc aca cta aca cgt gat caa gga tat cct tcc gtt ttt tat Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Asp Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr 355 360 365			1104
gga gat tat tat ggg att ccg acg cat ggt gta cca gca atg aaa tct Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser 370 375 380			1152
aag att gat ccg att tta gaa gca cgt caa aag tat gcg tac gga aaa Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Lys 385 390 395 400			1200
caa aat gat tat ttg gat cac cat aat atg att ggc tgg acg cgt gaa Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Met Ile Gly Trp Thr Arg Glu 405 410 415			1248
ggt aat aca gca cat ccc aac tca gga cta gca act att atg tcg gat Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp 420 425 430			1296
ggc cca gga gga aat aaa tgg atg tat gtt ggg cgt aat aag gct gga Gly Pro Gly Gly Asn Lys Trp Met Tyr Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly 435 440 445			1344
caa gtt tgg aga gat att aca gga aat cgc tca ggt acg gtg acg att Gln Val Trp Arg Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Gly Thr Val Thr Ile 450 455 460			1392
aac gca gat ggg tgg ggt aat ttt tct gta aat ggt ggg tct gta tct Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser 465 470 475 480			1440
ata tgg gta aat aat Ile Trp Val Asn Asn 485			1455
<210> 22			
<211> 485			
<212> PRT			
<213> bacillus sp.			
<400> 22			
His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr			

ES 2 734 183 T3

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

ES 2 734 183 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Trp Val Asn Asn
485

<210> 23
<211> 1452
<212> ADN

<213> bacillus sp

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1452)

<400> 23

gga agt gtg ccg gta aat ggc aca atg atg caa tat ttc gaa tgg tac	48
Gly Ser Val Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr	
1 5 10 15	
ctt cca gac gat gga aca cta tgg acg aaa gta gca aat aac gct caa	96
Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Asn Ala Gln	
20 25 30	
tct tta gcg aat ctt ggc att act gcc ctt tgg ctt ccc cct gcc tat	144
Ser Leu Ala Asn Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr	
35 40 45	
aaa gga aca agc agc agt gac gtt gga tat ggc gtt tat gat tta tat	192
Lys Gly Thr Ser Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr	
50 55 60	
gac ctt gga gag ttt aat caa aaa gga act gtc cga aca aaa tac ggg	240
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly	
65 70 75 80	
aca aaa aca caa tat atc caa gca atc caa gcg gcg cat aca gca ggg	288
Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Thr Ala Gly	
85 90 95	
atg caa gta tat gca gat gtc gtc ttt aac cat aaa gcc ggt gca gat	336
Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala Asp	
100 105 110	
gga aca gaa cta gtc gat gca gta gaa gta aat cct tct gac cgc aat	384
Gly Thr Glu Leu Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn	
115 120 125	
caa gaa ata tca gga aca tat caa atc caa gcg tgg aca aaa ttt gat	432
Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp	
130 135 140	
ttt cct ggt cgt gga aac acc tat tct agt ttt aaa tgg cgt tgg tat	480
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr	
145 150 155 160	
cat ttc gat gga acg gac tgg gat gag agt aga aaa cta aat cgt att	528
His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile	
165 170 175	
tac aag ttc cgc ggc acg gga aaa gca tgg gat tgg gaa gta gat aca	576
Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr	
180 185 190	
gaa aac ggg aat tat gac tat ctc atg tat gca gat tta gat atg gat	624
Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp	
195 200 205	
cat cca gag gtt gta tcc gaa cta aaa aat tgg gga aag tgg tat gta	672
His Pro Glu Val Val Ser Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val	
210 215 220	

acc	aca	acc	aat	atc	gac	gga	ttc	cgt	ctg	gat	gca	gtg	aag	cat	att	720
Thr	Thr	Thr	Asn	Ile	Asp	Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	
225					230					235					240	
aaa	tat	agc	ttt	ttc	ccg	gac	tgg	cta	tcg	tac	gta	cga	acc	caa	aca	768
Lys	Tyr	Ser	Phe	Phe	Pro	Asp	Trp	Leu	Ser	Tyr	Val	Arg	Thr	Gln	Thr	
			245						250					255		
caa	aag	cct	ctt	ttt	gcc	gtt	ggg	gaa	ttt	tgg	agc	tat	gac	att	agc	816
Gln	Lys	Pro	Leu	Phe	Ala	Val	Gly	Glu	Phe	Trp	Ser	Tyr	Asp	Ile	Ser	
			260					265					270			
aag	ttg	cac	aac	tat	att	aca	aag	acg	aac	ggc	tct	atg	tcc	cta	ttc	864
Lys	Leu	His	Asn	Tyr	Ile	Thr	Lys	Thr	Asn	Gly	Ser	Met	Ser	Leu	Phe	
		275					280					285				
gat	gcc	ccg	ctg	cat	aac	aat	ttt	tat	ata	gca	tcg	aaa	tca	ggc	ggc	912
Asp	Ala	Pro	Leu	His	Asn	Asn	Phe	Tyr	Ile	Ala	Ser	Lys	Ser	Gly	Gly	
	290					295					300					
tat	ttt	gat	atg	cgc	aca	tta	ctc	aac	aac	aca	ttg	atg	aaa	gat	cag	960
Tyr	Phe	Asp	Met	Arg	Thr	Leu	Leu	Asn	Asn	Thr	Leu	Met	Lys	Asp	Gln	
305					310					315					320	
cct	aca	tta	gca	gtc	aca	tta	gtg	gat	aat	cac	gat	act	gag	cca	ggg	1008
Pro	Thr	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Val	Asp	Asn	His	Asp	Thr	Glu	Pro	Gly	
				325					330					335		
caa	tct	ctg	cag	tca	tgg	gtc	gag	cca	tgg	ttt	aaa	ccg	tta	gct	tac	1056
Gln	Ser	Leu	Gln	Ser	Trp	Val	Glu	Pro	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	Tyr	
			340					345					350			
gca	ttt	atc	ttg	acc	cgc	caa	gaa	ggc	tat	cct	tgc	gtc	ttt	tat	gga	1104
Ala	Phe	Ile	Leu	Thr	Arg	Gln	Glu	Gly	Tyr	Pro	Cys	Val	Phe	Tyr	Gly	
		355					360					365				
gat	tac	tat	ggc	att	cca	aaa	tac	aac	att	cct	gcg	ctg	aaa	agc	aaa	1152
Asp	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Pro	Lys	Tyr	Asn	Ile	Pro	Ala	Leu	Lys	Ser	Lys	
	370					375					380					
ctt	gat	ccg	ctg	tta	att	gcc	aga	aga	gat	tat	gcc	tat	gga	aca	cag	1200
Leu	Asp	Pro	Leu	Leu	Ile	Ala	Arg	Arg	Asp	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Thr	Gln	
385					390					395					400	
cac	gac	tat	att	gac	agt	gcg	gat	att	atc	ggc	tgg	acg	cgg	gaa	gga	1248
His	Asp	Tyr	Ile	Asp	Ser	Ala	Asp	Ile	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu	Gly	
				405					410					415		
gtg	gct	gaa	aaa	gca	aat	tca	gga	ctg	gct	gca	ctc	att	acc	gac	ggg	1296
Val	Ala	Glu	Lys	Ala	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Thr	Asp	Gly	
			420					425					430			
cct	ggc	gga	agc	aaa	tgg	atg	tat	gtt	gga	aaa	caa	cac	gct	ggc	aaa	1344
Pro	Gly	Gly	Ser	Lys	Trp	Met	Tyr	Val	Gly	Lys	Gln	His	Ala	Gly	Lys	
		435					440					445				
acg	ttt	tat	gat	tta	acc	ggc	aat	cga	agt	gat	aca	gtg	aca	atc	aat	1392
Thr	Phe	Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly	Asn	Arg	Ser	Asp	Thr	Val	Thr	Ile	Asn	
		450				455					460					
gct	gat	gga	tgg	gga	gaa	ttt	aaa	gtc	aat	gga	ggg	tct	gta	tcc	ata	1440
Ala	Asp	Gly	Trp	Gly	Glu	Phe	Lys	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Ile	

465	470	475	480	
tgg gtt cca aaa				1452
Trp Val Pro Lys				
<210> 24				
<211> 484				
<212> PRT				
<213> bacillus sp				
<400> 24				
Gly Ser Val Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr				
1 5 10 15				
Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Asn Ala Gln				
20 25 30				
Ser Leu Ala Asn Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr				
35 40 45				
Lys Gly Thr Ser Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr				
50 55 60				
Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly				
65 70 75 80				
Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Thr Ala Gly				
85 90 95				
Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala Asp				
100 105 110				
Gly Thr Glu Leu Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn				
115 120 125				
Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp				
130 135 140				
Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr				
145 150 155 160				
His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile				
165 170 175				
Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr				
180 185 190				
Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp				

ES 2 734 183 T3

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

Thr Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn
450 455 460

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

Trp Val Pro Lys

<210> 25
<211> 1455
<212> ADN
<213> Bacillus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (1455)

<400> 25
gct aat act gca cct att aac gaa aca atg atg caa tat ttt gaa tgg 48
Ala Asn Thr Ala Pro Ile Asn Glu Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp
1 5 10 15
gat tta ccg aac gat gga acc ctt tgg aca aag gtg aaa aat gaa gcc 96
Asp Leu Pro Asn Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Lys Asn Glu Ala
20 25 30
gca aat ctt tct tcg ctc ggt att aca gcg tta tgg ctt cct cca gcg 144
Ala Asn Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala
35 40 45
tat aaa gga aca agt caa agc gat gtc gga tac ggc gtg tac gat tta 192
Tyr Lys Gly Thr Ser Gln Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu
50 55 60
tat gac ctt ggg gaa ttt aat caa aaa gga acg att cga aca aaa tac 240
Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr
65 70 75 80
gga aca aaa aca caa tat att caa gcc atc caa gct gcc aaa gcc gca 288
Gly Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala Lys Ala Ala
85 90 95
ggg atg caa gta tat gca gat gtt gtc ttt aat cat aag gcg gga gct 336
Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala
100 105 110
gac ggc aca gaa ttt gtc gat gcg gtt gag gta gac cct tct aat cga 384
Asp Gly Thr Glu Phe Val Asp Ala Val Glu Val Asp Pro Ser Asn Arg
115 120 125
aat caa gaa aca tct gga aca tat caa att caa gca tgg aca aaa ttt 432
Asn Gln Glu Thr Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe
130 135 140
gat ttt ccc ggt cgg ggg aac aca tac tcg agt ttt aaa tgg cgt tgg 480
Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp
145 150 155 160

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

ggc att gat aca aaa cca aac tct gga ctg gcg gct tta att acc gac 1296
 Gly Ile Asp Thr Lys Pro Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp
 420 425 430

ggc cct ggc gga agc aaa tgg atg tat gtc ggt aaa aaa cat gct gga 1344
 Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Lys His Ala Gly
 435 440 445

aaa gta ttt tat gat tta acc gga aac cga agt gac aca gta acg att 1392
 Lys Val Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile
 450 455 460

aat gcg gat ggt tgg gga gaa ttt aaa gta aac gga ggc tcc gtt tcg 1440
 Asn Ala Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser
 465 470 475 480

att tgg gtg gct aaa 1455
 Ile Trp Val Ala Lys
 485

<210> 26
 <211> 485
 <212> PRT
 <213> Bacillus sp.

<400> 26

Ala Asn Thr Ala Pro Ile Asn Glu Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp
 1 5 10 15

Asp Leu Pro Asn Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Lys Asn Glu Ala
 20 25 30

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

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

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

Gly Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala Lys Ala Ala
 85 90 95

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

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

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

ES 2 734 183 T3

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

ES 2 734 183 T3

385				390				395				400			
Gln	Arg	Asp	Tyr	Ile	Asp	His	Gln	Asp	Ile	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu
				405					410					415	
Gly	Ile	Asp	Thr	Lys	Pro	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Thr	Asp
			420					425					430		
Gly	Pro	Gly	Gly	Ser	Lys	Trp	Met	Tyr	Val	Gly	Lys	Lys	His	Ala	Gly
		435					440					445			
Lys	Val	Phe	Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly	Asn	Arg	Ser	Asp	Thr	Val	Thr	Ile
	450					455					460				
Asn	Ala	Asp	Gly	Trp	Gly	Glu	Phe	Lys	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser
465					470					475					480
Ile	Trp	Val	Ala	Lys											
				485											

REIVINDICACIONES

1. Una composición limpiadora que comprende:
 - 5 (a) una variante de una alfa-amilasa parental en donde la variante tiene actividad amilolítica y al menos 70 % de identidad con la id. de sec. n.º 6 y comprende al menos una, al menos dos o al menos tres delecciones en la región de aminoácidos de 181, 182, 183, o 184 y además comprende una sustitución en las posiciones 195, 206 y 243, utilizando la numeración según la id. de sec. n.º 6; y
 - 10 (b) un adyuvante de limpieza, preferiblemente en una cantidad de 0,01 a 99,9 % en peso; y
 - (c) al menos un agente quelante, en donde dicho agente quelante a una concentración inferior a 10 mM es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM cuando se mide a 21 °C y pH 8,0.
- 15 2. Una composición limpiadora según la reivindicación 1 en donde el agente quelante es capaz de reducir la concentración de iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM a una concentración de agente quelante inferior a 0,9 veces la concentración de citrato capaz de reducir los iones calcio libres de 2,0 mM a 0,10 mM, cuando se mide a 21 °C y pH 8,0.
- 20 3. La composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde el agente quelante se selecciona del grupo que consiste en: EDTA (etilendiamina tetraacetato), MGDA (ácido metilglicindiacético o N,N'-bis(carboximetil)alanina), EGTA (ácido etilenglicol tetraacético), DTPA (ácido dietilenetriamino pentaacético), DTPMP (ácido dietilentriamino penta(metilenfosfónico), HEDP (ácido 1-hidroxietiliden-1,1-difosfónico) y mezclas de los mismos.
- 25 4. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la variante que tiene actividad amilolítica tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, más preferiblemente al menos 85 %, aún más preferiblemente al menos 90 %, y con máxima preferencia al menos 95 % de identidad con el polipéptido maduro de la id. de sec. n.º 6.
- 30 5. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la amilasa es una variante de una alfa-amilasa parental, en donde la alfa-amilasa parental es la de la id. de sec. n.º 6, y la variante comprende las delecciones D183* y G184* y una de las siguientes series de mutaciones:
 - 35 (a) N195F+V206Y+Y243F;
 - (b) N195F+V206L+Y243F;
- 40 6. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente quelante se selecciona del grupo que consiste en: DTPA, HEDP, MGDA, DTPMP y mezclas de los mismos.
7. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el adyuvante de limpieza comprende uno o más de: microcápsula de perfume, agente de matizado de tejidos, proteasa, polímero de polietilenimina, lipasa, y cualquier mezcla de los mismos.
- 45 8. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición es una composición detergente líquida para lavado de ropa.
9. Un método de lavado de ropa, que comprende lavar una prenda de vestir con una composición según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, preferiblemente a una temperatura de 30 °C o menos, o más preferiblemente, a una temperatura de 20 °C o menos.
- 50