

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 669**

51 Int. Cl.:

C12N 9/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.10.2012 PCT/EP2012/070127**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13053801**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2012 E 12775472 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017 EP 2766476**

54 Título: **Variantes de glucoamilasa y polinucleótidos que las codifican**

30 Prioridad:

11.10.2011 US 201161545628 P

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

23.10.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FRIIS, ESBEN PETER;
DE MARIA, LEONARDO;
VIND, JESPER;
POULSEN, THOMAS A.;
SVENDSEN, ALLAN;
DANIELSEN, STEFFEN;
LENHARD, ROLF T.;
FRIIS-MADSEN, HENRIK y
SKOV, LARS K.**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 638 669 T3

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

DESCRIPCIÓN

Variantes de glucoamilasa y polinucleótidos que las codifican

5 **Referencia a un listado de secuencias**

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en formato legible por ordenador.

10 **Antecedentes de la invención**10 **Campo de la invención**

[0002] La presente invención se refiere a variantes de glucoamilasa, polinucleótidos que codifican las variantes, métodos de producción de las variantes y métodos de uso de las variantes.

15 **Descripción de la técnica relacionada**

[0003] La glucoamilasa (1,4-alfa-D-glucano glucohidrolasa, EC 3.2.1.3) es una enzima que cataliza la liberación de D-glucosa desde los extremos no reductores de almidón o moléculas de oligo- y polisacáridos relacionados. Las glucoamilasas son producidas por diferentes hongos filamentosos y levaduras, siendo las de *Aspergillus* las más importantes comercialmente.

[0004] Comercialmente, las glucoamilasas se utilizan para convertir material amiláceo, que ya ha sido parcialmente hidrolizado por una alfa-amilasa, en glucosa. La glucosa luego se puede convertir directa o indirectamente en un producto de fermentación utilizando un organismo fermentador. Ejemplos de productos de fermentación comerciales incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol, 1,3-propanodiol) ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, gluconato, ácido succínico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H₂ y CO₂), y compuestos más complejos, incluyendo, por ejemplo, antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B₁₂, beta-caroteno); hormonas, y otros compuestos que son difíciles de producir sintéticamente. Los procesos de fermentación también se usan habitualmente en las industrias del alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino) y los productos lácteos (por ejemplo, en la producción de yogur y queso).

[0005] El producto final también puede ser jarabe. Por ejemplo, el producto final puede ser glucosa, pero también puede ser convertido, por ejemplo, por glucosa isomerasa en fructosa o una mezcla compuesta casi igualmente de glucosa y fructosa. Esta mezcla, o una mezcla enriquecida con fructosa, es el jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF) más consumido y comercializado en todo el mundo.

[0006] Es un objeto de la presente invención proporcionar polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos y que proporcionan un alto rendimiento en los procesos de producción de productos de fermentación, tales como procesos de producción de etanol, incluyendo procesos de fermentación de etanol en una única fase a partir de almidón no gelatinizado crudo (o no cocinado). La solicitud de patente divisional, WO2011/127802, divulga una glucoamilasa de tipo salvaje de *Penicillium oxalicum*.

[0007] La presente invención proporciona una variante de glucoamilasa con propiedades mejoradas en comparación con su progenitora.

50 **Resumen de la invención**

[0008] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a variantes de glucoamilasa que tienen una termoestabilidad mejorada en comparación con la proteína de la SEQ ID NO: 3, que comprende una sustitución en dos posiciones que corresponde a la sustitución de Thr en la posición 65 y a la sustitución de Gin en la posición 327 del polipéptido de la SEQ ID NO: 3, donde la variante tiene actividad de glucoamilasa y donde la variante tiene al menos 80% identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0009] En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende el polipéptido variante de la invención.

[0010] En otros aspectos, la presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican las variantes; células huésped que comprenden los polinucleótidos; y métodos de producción de las variantes.

[0011] La presente invención también se refiere a métodos de uso de los polipéptidos de la invención en la producción de jarabe y/o un producto de fermentación.

Definiciones

[0012] **Glucoamilasa:** el término glucoamilasa (1,4-alfa-D-glucano glucohidrolasa, EC 3.2.1.3) se define como una enzima que cataliza la liberación de D-glucosa desde los extremos no-reductores de almidón o moléculas de oligo y polisacáridos relacionados. Para los fines de la presente invención, la actividad de glucoamilasa se determina según el procedimiento descrito en la sección "Materiales y métodos" del presente documento.

[0013] Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, preferiblemente al menos 45%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 55%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 65%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, aún más preferiblemente al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, e incluso de la forma más preferible al menos 100% de la actividad de glucoamilasa del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otra forma de realización, los polipéptidos de la presente invención tienen al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, preferiblemente al menos 45%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 55%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 65%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, aún más preferiblemente al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, e incluso de la forma más preferible al menos 100% de la actividad de glucoamilasa del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0014] **Variante alélica:** el término "variante alélica" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de manera natural a través de mutación, y puede resultar en polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0015] **ADNc:** el término "ADNc" significa una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm maduro empalmado obtenida a partir de una célula eucariótica o procariótica. El ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito de ARN primario inicial es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de pasos, incluyendo corte y empalme, antes de aparecer como ARNm empalmado maduro.

[0016] **Secuencia codificante:** el término "secuencia codificante" significa un polinucleótido que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de una variante. Los límites de la secuencia codificante se determinan generalmente por un marco de lectura abierto, que empieza con un codón de inicio tal como ATG, GTG o TTG y termina con un codón de terminación tal como TAA, TAG o TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN genómico, ADNc, ADN sintético, o una combinación de los mismos.

[0017] **Secuencias de control:** el término "secuencias de control" significa secuencias de ácidos nucleicos necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, procedente del mismo gen) o extraña (es decir, procedente de un gen diferente) respecto al polinucleótido que codifica la variante o nativas o extranjeras entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal, y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden estar provistas de enlazadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que facilitan la ligación de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica una variante.

[0018] **Expresión:** el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de una variante, incluyendo, pero sin limitarse a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0019] **Vector de expresión:** el término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica una variante y está operativamente enlazado a secuencias de control que permiten su expresión.

[0020] **Fragmento:** el término "fragmento" significa un polipéptido con uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos ausentes del terminal amino y/o carboxilo de un polipéptido maduro; donde el fragmento tiene actividad de glucoamilasa. En un aspecto, un fragmento contiene al menos 465 residuos de aminoácidos (por ejemplo, los aminoácidos 30 a 494 de la SEQ ID NO: 2).

[0021] **Condiciones de alta astringencia:** el término "condiciones de alta astringencia" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y formamida al 50%, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 65°C.

[0022] **Célula huésped:** el término "célula huésped" significa cualquier tipo de célula que es susceptible a una transformación, transfección, transducción, o similar con un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula progenitora que no es idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

[0023] **Propiedad mejorada:** el término "propiedad mejorada" significa una característica asociada a una variante que está mejorada en comparación con la progenitora. Tales propiedades mejoradas incluyen, pero de forma no limitativa, una termoestabilidad mejorada.

[0024] **Aislado:** el término "aislado" significa una sustancia en una forma o entorno que no se da en la naturaleza. Ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no esté presente de forma natural, (2) cualquier sustancia incluyendo, pero sin limitarse a, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se extrae al menos parcialmente de uno o más o todos los constituyentes de origen natural a los que está asociada en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por el ser humano con respecto a esa sustancia encontrada en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada mediante el aumento de la cantidad de la sustancia con respecto a otros componentes con los cuales se asocia naturalmente (por ejemplo, copias múltiples de un gen que codifica la sustancia; uso de un promotor más fuerte que el promotor naturalmente asociado al gen que codifica la sustancia). Una sustancia aislada puede estar presente en una muestra de caldo de fermentación.

[0025] **Condiciones de baja astringencia:** el término "condiciones de baja astringencia" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y formamida al 25%, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 50°C.

[0026] **Polipéptido maduro:** el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final tras la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como procesamiento en el extremo N-terminal, truncamiento en el extremo C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 616 de la SEQ ID NO: 2 basándose en el programa SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6) que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID NO: 2 son un péptido señal. Se sabe en la técnica que una célula huésped puede producir una mezcla de dos o más polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un aminoácido C-terminal y/o N-terminal diferente) expresados por el mismo polinucleótido.

[0027] **Secuencia codificante de polipéptido maduro:** el término "Secuencia codificante de polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad de glucoamilasa. En un aspecto, la secuencia codificante de polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1848 de la SEQ ID NO: 1 basándose en SignalP (Nielsen et al., 1997, supra) que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID NO: 1 codifican un péptido señal.

[0028] **Condiciones de astringencia media:** el término "Condiciones de astringencia media" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y formamida al 35%, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando 2X SSC, SDS al 0,2% a 55°C.

[0029] **Condiciones de astringencia media-alta:** el término "condiciones de astringencia media-alta" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y formamida 35%, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando 2X SSC, SDS al 0,2% a 60°C.

[0030] **Mutante:** el término "mutante" significa un polinucleótido que codifica una variante.

[0031] **Constructo de ácidos nucleicos:** el término "constructo de ácidos nucleicos" significa una molécula de ácido nucleico, o bien mono o bicatenaria, que se ha aislado de un gen de origen natural o que se ha modificado para contener segmentos de ácidos nucleicos de una manera que no existiría de otro modo en la naturaleza o que es sintética, que comprende una o más secuencias de control.

[0032] **Operativamente enlazado:** el término "operativamente enlazado" significa una configuración en la que una secuencia de control está situada en una posición apropiada respecto a la secuencia codificante de un polinucleótido de modo que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

[0033] **Progenitor o glucoamilasa progenitora:** el término "progenitor" o "glucoamilasa progenitora" significa

una glucoamilasa a la que se realiza una alteración para producir las variantes enzimáticas de la presente invención. El progenitor puede ser un polipéptido (tipo salvaje) de origen natural o una variante o fragmento del mismo.

5 [0034] **Identidad de secuencia:** la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad de secuencia".

[0035] Para fines de la presente invención, la 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) como está implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado "longest identity" (identidad más larga) (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad porcentual y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{(Residuos idénticos x 100)} / \text{(Longitud de alineamiento - Número total de gaps en alineamiento)}$$

[0036] Para los fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, supra) como está implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0,5, y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión de EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado "longest identity" (identidad más larga) (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad porcentual y se calcula de la siguiente manera:

$$\text{(Desoxirribonucleótidos idénticos x 100)} / \text{(Longitud de alineamiento - Número total de gaps en alineamiento)}$$

[0037] **Subsecuencia:** el término "subsecuencia" significa un polinucleótido con uno o más (por ejemplo, varios) nucleótidos ausentes del extremo 5' y/o 3' de una secuencia codificante de polipéptido maduro; donde la subsecuencia codifica un fragmento con actividad de glucoamilasa. En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos 1395 nucleótidos (por ejemplo, los nucleótidos 88 a 1482 de la SEQ ID NO: 1)

[0038] **Variante:** el término "variante" significa un polipéptido con actividad de glucoamilasa que incluye una alteración, es decir, una sustitución, inserción, y/o delección, en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. Una sustitución significa la sustitución del aminoácido que ocupa una posición por un aminoácido diferente; delección significa la eliminación del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa añadir un aminoácido adyacente e inmediatamente detrás del aminoácido que ocupa una posición. Las variantes de la presente invención tienen al menos 20%, por ejemplo, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100% de la actividad de glucoamilasa del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. Las variantes de la presente invención tienen al menos 20%, por ejemplo, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos 100% de la actividad de glucoamilasa del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0039] **Condiciones de astringencia muy alta:** el término "condiciones de astringencia muy alta" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y formamida al 50%, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 70°C.

[0040] **Condiciones de astringencia muy baja:** el término "condiciones de astringencia muy baja" significa, para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, y formamida al 25%, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas. El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2% a 45°C.

[0041] **Glucoamilasa de tipo salvaje:** el término glucoamilasa "de tipo salvaje" significa una glucoamilasa expresada por un microorganismo de origen natural, tal como una bacteria, levadura, u hongo filamentoso encontrado en la naturaleza.

Convenciones para la designación de variantes

65 [0042] Para los fines de la presente invención, el polipéptido maduro comprendido en la SEQ ID NO: 2 o el

polipéptido consistente en la SEQ ID NO: 3 (PE001) se usa para determinar el residuo de aminoácido correspondiente en otra glucoamilasa. La secuencia de aminoácidos de otra glucoamilasa se alinea con el polipéptido maduro descrito como los aminoácidos 22 a 616 de la SEQ ID NO: 2 o los aminoácidos 1-595 de la SEQ ID NO: 3, y basándose en el alineamiento, el número de posición del aminoácido que corresponde con cualquier residuo de aminoácido en el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID NO: 2 o el polipéptido de la SEQ ID NO: 3 se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J.Mol. Biol. 48: 443-453) según está implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros usados son penalización por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62).

[0043] La identificación del residuo de aminoácido correspondiente en otra glucoamilasa se puede determinar por un alineamiento de múltiples secuencias de polipéptidos usando diferentes programas informáticos incluyendo, pero sin limitarse a, MUSCLE (comparación de secuencia múltiple por log-expectativa; versión 3.5 o posterior; Edgar, 2004, Nucleic Acids Research 32: 1792-1797), MAFFT (versión 6.857 o posterior; Katoh y Kuma, 2002, Nucleic Acids Research 30: 3059-3066; Katoh et al., 2005, Nucleic Acids Research 33: 511-518; Katoh y Toh, 2007, Bioinformatics 23: 372-374; Katoh et al., 2009, Methods in Molecular Biology 537: 39-64; Katoh and Toh, 2010, Bioinformatics 26: 1899-1900), y EMBOSS EMMA utilizando ClustalW (1.83 o posterior; Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680), usando sus parámetros por defecto respectivos.

[0044] Cuando la otra enzima ha divergido del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de manera que comparación basada en secuencias tradicional no logra detectar su relación (Lindahl y Elofsson, 2000, J. Mol. Biol. 295: 613-615), se pueden usar otros algoritmos de comparación de secuencias por pares. Una mayor sensibilidad en la búsqueda basada en secuencias se puede lograr mediante programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de (perfiles de) familias de polipéptidos para buscar en bases de datos. Por ejemplo, el programa PSI-BLAST genera perfiles a través de un proceso de búsqueda reiterativa de bases de datos y es capaz de detectar homólogos remotos (Atschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Se puede conseguir una sensibilidad incluso superior si la familia o superfamilia para el polipéptido tiene uno o más representantes en las bases de datos de estructuras de proteínas. Programas tal como GenTHREADER (Jones, 1999, J. Mol. Biol. 287: 797-815; McGuffin y Jones, 2003, Bioinformatics 19: 874-881) utilizan información procedente de una variedad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de estructuras secundarias, perfiles de alineamiento estructural, y potenciales de disolución) como entrada a una red neuronal que predice el pliegue estructural para una secuencia de consulta. De forma similar, el método de Gough et al., 2000, J. Mol. Biol. 313: 903-919, puede utilizarse para alinear una secuencia de estructura desconocida con los modelos de superfamilia presentes en la base de datos SCOP. Estos alineamientos pueden usarse sucesivamente para generar modelos de homología para el polipéptido, y se puede evaluar la exactitud de tales modelos utilizando una variedad de herramientas desarrolladas para ese fin.

[0045] Para proteínas de estructura conocida, hay disponibles varias herramientas y recursos para recuperar y generar alineamientos estructurales. Por ejemplo las superfamilias de proteínas de la SCOP se han alineado estructuralmente y esos alineamientos son accesibles y descargables. Dos o más estructuras de proteínas se pueden alinear utilizando una variedad de algoritmos como la matriz de alineamiento de distancias (Holm and Sander, 1998, Proteins 33: 88-96) o extensión combinatoria (Shindyalov and Bourne, 1998, Protein Engineering 11: 739-747), y la implementación de estos algoritmos también se puede utilizar adicionalmente para interrogar bases de datos de estructuras con una estructura de interés para descubrir homólogos estructurales posibles (por ejemplo, Holm and Park, 2000, Bioinformatics 16: 566-567).

[0046] Al describir las variantes de la presente invención, la nomenclatura descrita a continuación está adaptada para mayor facilidad de referencia. Se emplea la abreviatura de aminoácidos IUPAC de una única letra o de tres letras.

[0047] Sustituciones. Para una sustitución de un aminoácido, se usa la nomenclatura siguiente: aminoácido original, posición, aminoácido sustituido. Por consiguiente, la sustitución de treonina en la posición 226 con alanina se designa como "Thr226Ala" o "T226A". Las mutaciones múltiples se separan por signos de adición ("+"), por ejemplo, "Gly205Arg + Ser411Phe" o "G205R + S411F", que representan sustituciones en posiciones 205 y 411 de glicina (G) con arginina (R) y serina (S) con fenilalanina (F), respectivamente.

[0048] Deleciones. Para la deleción de un aminoácido, se usa la nomenclatura siguiente: aminoácido original, posición, *. Por consiguiente, la deleción de glicina en la posición 195 se designa como "Gly195*" o "G195*". Las deleciones múltiples se separan por signos de adición ("+"), por ejemplo, "Gly195* + Ser411*" o "G195* + S411*".

[0049] Inserciones. Para la inserción de un aminoácido, se usa la nomenclatura siguiente: aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado. Por consiguiente la inserción de lisina detrás de glicina en la posición 195 se designa "Gly195GlyLys" o "G195GK". Una inserción de múltiples aminoácidos se designa [aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado #1, aminoácido insertado #2, etc.]. Por ejemplo, la inserción de lisina y alanina detrás de glicina en la posición 195 se indica como "Gly195GlyLysAla" o

"G195GKA".

5 [0050] En tales casos, el/los residuo(s) de aminoácidos insertados se numera(n) mediante la adición de letras minúsculas al número de posición del residuo de aminoácido precedente al/a los residuo(s) de aminoácidos insertado(s). En el ejemplo anterior, por lo tanto, la secuencia sería:

Progenitora:	Variante:
195	195 195a 195b
G	G - K - A

10 [0051] Alteraciones múltiples. Las variantes que comprenden múltiples alteraciones se separan por signos de adición ("+"), por ejemplo, "Arg170Tyr+Gly195Glu" o "R170Y+G195E", que representan una sustitución de arginina y glicina en las posiciones 170 y 195 con tirosina y ácido glutámico, respectivamente.

15 [0052] Alteraciones diferentes. Cuando se puede introducir alteraciones diferentes en una posición, las alteraciones diferentes se separan por una coma, por ejemplo, "Arg170Tir, Glu" representa una sustitución de arginina en la posición 170 con tirosina o ácido glutámico. Así, "Tir167Gly, Ala + Arg170Gly, Ala" designa las variantes siguientes:
 "Tyr167Gly+Arg170Gly", "Tyr167Gly+Arg170Ala", "Tyr167Ala+Arg170Gly", y "Tyr167Ala+Arg170Ala".

Descripción detallada de la invención

20 [0053] La presente descripción se refiere a variantes de glucoamilasa aisladas, que comprenden una sustitución en dos posiciones correspondientes a sustitución de Thr en la posición 65 y sustitución de Gin en la posición 327 y opcionalmente una o más posiciones correspondientes a las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 72, 74, 79, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468, 477, 501, 502, 504, 516, 524, 526, 563, 564, 568, 571 del polipéptido de la SEQ ID NO.: 3, donde la variante tiene actividad de glucoamilasa y termoestabilidad mejorada en comparación con la proteína de la SEQ ID NO: 3.

30 [0054] La presente descripción también se refiere a variantes de glucoamilasa aislada, que comprenden una delección en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 80, 502, o 504 del polipéptido de la SEQ ID NO: 3, donde la variante tiene actividad de glucoamilasa y termoestabilidad mejorada en comparación con la proteína de la SEQ ID NO: 3.

35 [0055] Debería entenderse que las variantes anteriormente mencionadas que tienen sustituciones o delecciones comprenden todas las combinaciones posibles de una o más sustituciones o delecciones en las posiciones específicas.

Variantes

40 [0056] La presente descripción proporciona variantes de glucoamilasa que tienen una termoestabilidad mejorada en comparación con la proteína de la SEQ ID NO: 3, que comprende una sustitución en dos posiciones correspondientes a la sustitución de Thr en la posición 65 y sustitución de Gin en la posición 327 del polipéptido de la SEQ ID NO: 3, y opcionalmente que comprenden además una sustitución o delección en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 72, 74, 79, 80, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468, 477, 501, 502, 504, 516, 524, 526, 563, 564, 568, 571 del polipéptido de identidad de la SEQ NO: 3, donde la variante tiene actividad de glucoamilasa.

[0057] Además de las sustituciones o delecciones específicas en otra forma de realización de la invención, la variante se selecciona del grupo consistente en:

- 50 a) un polipéptido con al menos 85% identidad de secuencia respecto al polipéptido de la SEQ ID NO: 3;
 b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 85% de identidad respecto a la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1; y
 c) un fragmento del polipéptido de la SEQ ID NO: 3, que tiene actividad de glucoamilasa.

55 [0058] En una forma de realización de la invención, la variante tiene una identidad de secuencia de al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos del 100%, respecto a la secuencia de aminoácidos de la glucoamilasa progenitora madura.

60 [0059] En otra forma de realización de la invención, la variante tiene al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos del 100%, de identidad de secuencia respecto al

polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0060] En un aspecto de la invención, el número de alteraciones en las variantes de la presente invención es de 1-20, por ejemplo, 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 alteraciones.

[0061] En otro aspecto de la invención, una variante comprende una sustitución o delección en una o más (por ejemplo, varias) posiciones correspondientes a las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 65, 72, 74, 79, 80, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 327, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468, 477, 501, 502, 504, 516, 524, 526, 563, 564, 568, y 571.

[0062] En otro aspecto de la invención, una variante comprende una sustitución o delección en dos posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 65, 72, 74, 79, 80, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 327, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468, 477, 501, 502, 504, 516, 524, 526, 563, 564, 568, y 571.

[0063] En otro aspecto de la invención, una variante comprende una sustitución o delección en tres posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 65, 72, 74, 79, 80, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 327, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468, 477, 501, 502, 504, 516, 524, 526, 563, 564, 568, y 571.

[0064] En otro aspecto de la invención, una variante comprende una sustitución o delección en cuatro posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 65, 72, 74, 79, 80, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 327, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468, 477, 501, 502, 504, 516, 524, 526, 563, 564, 568, y 571.

[0065] En otro aspecto de la invención, una variante comprende una sustitución o delección en cinco posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 65, 72, 74, 79, 80, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 327, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468, 477, 501, 502, 504, 516, 524, 526, 563, 564, 568, y 571.

[0066] En otro aspecto de la invención, una variante comprende una sustitución o delección en seis posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 65, 72, 74, 79, 80, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 327, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468, 477, 501, 502, 504, 516, 524, 526, 563, 564, 568, y 571.

[0067] En otro aspecto de la invención, una variante comprende una sustitución o delección en siete posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 65, 72, 74, 79, 80, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 327, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468, 477, 501, 502, 504, 516, 524, 526, 563, 564, 568, y 571.

[0068] En otro aspecto de la invención, una variante comprende una sustitución o delección en ocho posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 65, 72, 74, 79, 80, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 327, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468, 477, 501, 502, 504, 516, 524, 526, 563, 564, 568, y 571.

[0069] En otro aspecto de la invención, una variante comprende una sustitución o delección en nueve posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 65, 72, 74, 79, 80, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 327, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468, 477, 501, 502, 504, 516, 524, 526, 563, 564, 568, y 571.

[0070] En otro aspecto de la invención, una variante comprende una sustitución o delección en diez posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 65, 72, 74, 79, 80, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 327, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468, 477, 501, 502, 504, 516, 524, 526, 563, 564, 568, y 571.

[0071] En otro aspecto de la invención, una variante comprende una sustitución o delección en once posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 65, 72, 74, 79, 80, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 327, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468, 477, 501, 502, 504, 516, 524, 526, 563, 564, 568, y 571.

[0072] En otro aspecto de la invención, una variante comprende una sustitución o delección en doce posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 65, 72, 74, 79, 80, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 327, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468, 477, 501, 502, 504, 516, 524, 526, 563, 564, 568, y 571.

[0073] En otro aspecto de la invención, una variante comprende una sustitución o delección en trece posiciones

correspondientes con cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 65, 72, 74, 79, 80, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 327, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468, 477, 501, 502, 504, 516, 524, 526, 563, 564, 568, y 571.

- 5 [0074] En otro aspecto de la invención, una variante comprende una sustitución o delección en catorce posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 65, 72, 74, 79, 80, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 327, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468, 477, 501, 502, 504, 516, 524, 526, 563, 564, 568, y 571.
- 10 [0075] En otro aspecto de la invención, una variante comprende una sustitución o delección en quince posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 65, 72, 74, 79, 80, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 327, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468, 477, 501, 502, 504, 516, 524, 526, 563, 564, 568, y 571.
- 15 [0076] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 1. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 1 se sustituye con Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Lys o Glu. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en las sustituciones R1 K o R1 E del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.
- 20 [0077] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 2. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 2 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución P2N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.
- 25 [0078] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 3. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 3 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Trp o Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en las sustituciones D3W o D3N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.
- 30 [0079] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 4. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 4 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Ser o Gly. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en las sustituciones P4S o P4G del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.
- 35 [0080] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 5. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 5 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Ala o Gin. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en las sustituciones K5A o K5Q del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.
- 40 [0081] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 6. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 6 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Arg. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución G6R del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.
- 45 [0082] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 7. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 7 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Ala o Val. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en las sustituciones G7A o G7V del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.
- 50 [0083] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 8. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 8 se sustituye con Ala, Arg, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Ala o Ser. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en las sustituciones N8A o N8S del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.
- 55 [0084] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 10. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 10 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asp, Lys, o Glu. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o
- 60
- 65

consiste en las sustituciones T10D, T10K, o T10E del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

5 [0085] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 11. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 11 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asp, Phe, Ser, o Ala. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en las sustituciones P11D, P11F, P11S, P11W, P11Y, P11H o P11A del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

10 [0086] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 12. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 12 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Tyr. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución F12Y del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

15 [0087] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 18. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 18 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución E18N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

20 [0088] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 26. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 26 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, , o Val, preferiblemente con Cys o Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en las sustituciones D26C o D26N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

25 [0089] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 31. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 31 se sustituye con Ala, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, HIS, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Ser. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución R31S del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

30 [0090] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 33. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 33 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Cys o Val. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en las sustituciones K33C o K33V del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

35 [0091] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 34. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 34 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Tyr. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución K34Y del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

40 [0092] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 65. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 65 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Ala. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución T65A del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

45 [0093] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 72. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 72 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Val. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución L72V del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

50 [0094] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 74. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 74 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución E74N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

55 [0095] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 79. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 79 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser,

Thr, Trp, o Tyr, preferiblemente con Ala, Gly, Ile, Leu, Lys, o Ser. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en las sustituciones V79A, V79G, V79I, V79L, V79S, o V79K del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

5 [0096] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una delección en una posición que corresponde con la posición 80. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la delección F80* del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

10 [0097] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 103. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 103 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución S103N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

15 [0098] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 105. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 105 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Pro. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución S105P del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

20 [0099] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 112. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 112 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Ser. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o
25 consiste en la sustitución K112S del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0100] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 161. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que
30 corresponde con la posición 161 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Ser. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución K161S del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0101] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
35 corresponde con la posición 172. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 172 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Val. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución I172V del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0102] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
40 corresponde con la posición 218. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 218 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Ala. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución K218A del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0103] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
45 corresponde con la posición 220. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 220 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o
50 consiste en la sustitución G220N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0104] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
55 corresponde con la posición 221. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 221 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asp. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución K221 D del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0105] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
60 corresponde con la posición 245. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 245 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, o Val, preferiblemente con Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución Y245N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0106] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
65 corresponde con la posición 253. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 253 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o

consiste en la sustitución Q253N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0107] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 255. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que
5 corresponde con la posición 255 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución S255N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0108] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
10 corresponde con la posición 279. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 279 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución D279N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0109] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
15 corresponde con la posición 325. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 325 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, o Tyr, preferiblemente con Thr. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución V325T del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0110] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
20 corresponde con la posición 327. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 327 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Trp, Tyr o Phe. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en las sustituciones Q327W, Q327Y o Q327F del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0111] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
30 corresponde con la posición 359. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 359 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución S359N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0112] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
35 corresponde con la posición 364. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 364 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Pro. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución S364P del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0113] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
40 corresponde con la posición 370 en otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 370 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución D370N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0114] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
45 corresponde con la posición 375. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 375 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Ala. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución I375A del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0115] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
50 corresponde con la posición 377. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 377 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Thr. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución S377T del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0116] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
60 corresponde con la posición 405. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 405 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Thr. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución Q405T del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0117] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
65 corresponde con la posición 445. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 445 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o

consiste en la sustitución D445N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0118] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 447. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que
5 corresponde con la posición 447 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, o Tyr, preferiblemente con Ser. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución V447S del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0119] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
10 corresponde con la posición 460. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 460 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, o Tyr, preferiblemente con Ser o Thr. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución V460S o V460T del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0120] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
15 corresponde con la posición 463. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 463 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o
20 consiste en la sustitución T463N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0121] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
25 corresponde con la posición 465. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 465 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o
30 consiste en la sustitución S465N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0122] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
35 corresponde con la posición 468. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 468 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Thr. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o
40 consiste en la sustitución P468T del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0123] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
45 corresponde con la posición 477. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 477 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o
50 consiste en la sustitución T477N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0124] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
55 corresponde con la posición 501. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 501 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Val. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o
60 consiste en la sustitución E501V del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0125] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución o delección en una
65 posición que corresponde con la posición 502. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 502 es eliminada o sustituida con Ala, Arg, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Thr. En otro aspecto de la invención, la variante
70 comprende o consiste en la alteración N502* o N502T del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0126] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución o delección en una
75 posición que corresponde con la posición 504. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 504 es eliminada o sustituida con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, o Val, preferiblemente con Thr. En otro aspecto de la invención, la variante
80 comprende o consiste en la alteración Y504* o Y504T del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0127] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
85 corresponde con la posición 516. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 516 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Pro. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o
90 consiste en la sustitución T516P del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

[0128] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que
95 corresponde con la posición 524. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 524 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Thr. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o

consiste en la sustitución K524T del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

5 [0129] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 526. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 526 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Ala. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución G526A del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

10 [0130] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 563. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 563 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Ser. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución P563S del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

15 [0131] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 564. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 564 se sustituye con Ala, Arg, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asp. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución N564D del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

20 [0132] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 568. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 568 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Asn. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en la sustitución T568N del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

30 [0133] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una sustitución en una posición que corresponde con la posición 571. En otro aspecto de la invención, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 571 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, o Val, preferiblemente con Ser o Glu. En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en las sustituciones K571 S o K571 E del polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

35 [0134] En otro aspecto, la variante comprende o consiste en una alteración en posiciones correspondientes a las posiciones 65 y 327, tales como las descritas anteriormente.

[0135] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en alteraciones en posiciones correspondientes a las posiciones 65, 327, y 501, tales como las descritas anteriormente.

40 [0136] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en alteraciones en posiciones correspondientes a las posiciones 65, 327, y 504, tales como las descritas anteriormente.

[0137] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en alteraciones en posiciones correspondientes a las posiciones 65, 327, 501, y 504, tales como las descritas anteriormente.

45 [0138] En otro aspecto de la invención, la variante comprende o consiste en una o más (por ejemplo, varias) sustituciones seleccionadas del grupo consistente en T65A, Q327F, E501V, Y504T, Y504*.

50 [0139] En otro aspecto específico de la invención, la variante comprende una de las siguientes sustituciones o combinaciones de sustituciones:

- T65A; o
- Q327F; o
- E501V; o
- Y504T; o
- 55 Y504*; o
- T65A + Q327F; o
- T65A + E501V; o
- T65A + Y504T; o
- T65A + Y504*; o
- 60 Q327F + E501V; o
- Q327F + Y504T; o
- Q327F + Y504*; o
- E501V + Y504T; o
- E501V + Y504*; o
- 65 T65A + Q327F + E501V; o
- T65A + Q327F + Y504T; o

ES 2 638 669 T3

T65A + E501V + Y504T; o
 Q327F + E501V + Y504T; o
 T65A + Q327F + Y504*; o
 T65A + E501V + Y504*; o
 5 Q327F + E501V + Y504*; o
 T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
 T65A + Q327F + E501V + Y504*

10 [0140] Más específicamente las variantes según la invención comprende las siguientes combinaciones de sustituciones o deleciones al polipéptido de la SEQ ID NO: 3.

E501V + Y504T;
 T65A + K161S;
 T65A + Q405T;
 15 T65A + Q327W;
 T65A + Q327F;
 T65A + Q327Y;
 P11 F + T65A + Q327F;
 R1 K + D3W + K5Q + G7V + N8S + T10K + P11 S + T65A + Q327F;
 20 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F;
 P11 F + D26C + K33C + T65A + Q327F;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327W + E501V + Y504T;
 R1 E + D3N + P4G + G6R + G7A + N8A + T10D+ P11 D + T65A + Q327F;
 P11 F + T65A + Q327W;
 25 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 P11 F + T65A + Q327W + E501V + Y504T;
 T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 T65A + S105P + Q327W;
 T65A + S105P + Q327F;
 30 T65A + Q327W + S364P;
 T65A + Q327F + S364P;
 T65A + S103N + Q327F;
 P2N + P4S + P11 F + K34Y + T65A + Q327F;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + D445N + V447S;
 35 P2N + P4S + P11F + T65A + I172V + Q327F;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + N502*;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + N502T + P563S + K571 E;
 P2N + P4S + P11 F + R31S + K33V + T65A + Q327F + N564D + K571 S;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + S377T;
 40 P2N + P4S + P11 F + T65A + V325T+ Q327W;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + D445N + V447S + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11F + T65A + I72V + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + S377T + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + D26N + K34Y + T65A + Q327F;
 45 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + I375A + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + K218A + K221 D + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + S103N + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + T10D + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + F12Y + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 50 K5A + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + T10E + E18N + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + T10E + E18N + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + T568N;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + K524T + G526A;
 55 P2N + P4S + P11 F + K34Y + T65A + Q327F + D445N + V447S + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + R31S + K33V + T65A + Q327F + D445N + V447S + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + D26N + K34Y + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + F80* + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + K112S + Q327F + E501V + Y504T;
 60 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + T516P + K524T + G526A;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + N502T + Y504*;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11F + T65A + S103N + Q327F + E501V + Y504T;
 K5A + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 65 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + T516P + K524T + G526A;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + V79A + Q327F + E501V + Y504T;

P2N + P4S + P11 F + T65A + V79G + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + V79I + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + V79L + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + V79S + Q327F + E501V + Y504T;
 5 P2N + P4S + P11 F + T65A + L72V + Q327F + E501V + Y504T;
 S255N + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + E74N + V79K + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + G220N + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Y245N + Q327F + E501V + Y504T;
 10 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q253N + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + D279N + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + S359N + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + D370N + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + V460S + E501V + Y504T;
 15 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + V460T + P468T + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + T463N + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + S465N + E501V + Y504T; o
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + T477N + E501V + Y504T

20 [0141] Las variantes pueden comprender además una o más sustituciones adicionales en una o más (por ejemplo, varias) de otras posiciones.

25 [0142] Los cambios en los aminoácidos pueden ser de una naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegamiento y/o actividad de la proteína; deleciones pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino- o carboxi-terminal, tales como un residuo de metionina amino-terminal; un péptido enlazador pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación mediante el cambio de la carga de red u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítopo antigénico o un dominio de unión.

30 [0143] Hay ejemplos de sustituciones conservadoras en los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). En la técnica se conocen sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica y ha sido descritas, por
 35 ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Sustituciones comunes 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.

40 [0144] Alternativamente, los cambios en los aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físicoquímicas de los polipéptidos se ven alteradas. Por ejemplo, los cambios en los aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo, y similares.

45 [0145] Los aminoácidos esenciales de un polipéptido se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis por barrido de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En la técnica anterior, se introducen mutaciones individuales de alanina en cada residuo de la molécula, y se evalúa la actividad de glucoamilasa de las moléculas mutantes resultantes para identificar residuos de aminoácidos que son fundamentales para la actividad de la molécula. Véase también,
 50 Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también se puede determinar mediante análisis físico de estructura, determinar mediante técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica, o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de aminoácidos de sitios de contacto putativos. Véase, por ejemplo, de Vos et al., 1992, *ciencia* 255: 306-312; Smith et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. La identidad de los aminoácidos esenciales también se puede inferir a partir de un alineamiento con un polipéptido relativo.

55 Variantes del dominio catalítico

60 [0146] En una forma de realización, las variantes pueden consistir en al menos el dominio catalítico de 465 aminoácidos, por ejemplo los aminoácidos 30 a 494 de la glucoamilasa progenitora mostrada como la SEQ ID NO: 2, con las sustituciones y/o deleciones que se describen en el presente documento.

65 [0147] Un segundo aspecto de la invención se refiere a un dominio catalítico de glucoamilasa variante que comprende una sustitución en dos posiciones correspondientes a la sustitución de Thr en la posición 65 y la sustitución de Gin en la posición 327 y, opcionalmente, además en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 10, 11, 12, 18, 26, 31, 33, 34, 72, 74, 79, 80, 103, 105, 112, 161, 172, 218, 220, 221, 245, 253, 255, 279, 325, 359, 364, 370, 375, 377, 405, 445, 447, 460, 463, 465, 468 del polipéptido de la SEQ ID NO: 3, donde la variante tiene actividad de glucoamilasa y una termoestabilidad mejorada en comparación con la proteína de la

SEQ ID NO: 3.

[0148] El dominio catalítico de glucoamilasa variante puede, en una forma de realización, seleccionarse del grupo consistente en:

- a) un dominio catalítico con al menos 65% de identidad de secuencia respecto a los amino ácidos 30 a 494 de la SEQ ID NO: 2;
- b) un dominio catalítico codificado por un polinucleótido que se hibridiza bajo condiciones de astringencia media con los nucleótidos (i) 88 a 1482 de la SEQ ID NO: 1 o (ii) el complemento de (i) en toda su longitud;
- c) un dominio catalítico codificado por un polinucleótido con al menos 65% identidad de secuencia respecto a los nucleótidos (i) 88 a 1482 de la SEQ ID NO: 1; y
- d) una variante de los aminoácidos 30 a 494 de la SEQ ID NO: 2 que comprende una sustitución, deleción, y/o inserción en una o más (por ejemplo, varias) posiciones;

y donde el dominio catalítico tiene actividad de glucoamilasa.

[0149] En una forma de realización, se puede considerar que el dominio catalítico incluya la región enlazadora de los aminoácidos 495 a 506 de la SEQ ID NO: 2. Los aminoácidos 507 a 615 de la SEQ ID NO: 2 corresponden a un dominio de unión al almidón.

[0150] En una forma de realización, el dominio catalítico de la glucoamilasa variante tiene una identidad de secuencia de al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos del 100%, respecto a la secuencia de aminoácidos del dominio catalítico de la glucoamilasa progenitora.

[0151] En otra forma de realización, la variante tiene al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos del 100%, de identidad de secuencia respecto al dominio catalítico comprendido en la SEQ ID NO: 2, por ejemplo los aminoácidos 30 a 494 de la SEQ ID NO: 2.

[0152] En otro aspecto de la invención, el dominio catalítico de la glucoamilasa variante es codificado por un polinucleótido que se hibridiza bajo condiciones de astringencia muy baja, condiciones de astringencia baja, condiciones de astringencia media, condiciones de astringencia medio-alta, condiciones de astringencia alta, o condiciones de astringencia muy alta con (i) la secuencia codificante del dominio catalítico de la SEQ ID NO: 1, o (ii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii) (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).

[0153] En una forma de realización, el polipéptido de glucoamilasa variante tiene una termoestabilidad mejorada en comparación con la enzima progenitora.

[0154] En una forma de realización, el dominio catalítico variante tiene una termoestabilidad mejorada en comparación con el dominio catalítico progenitor.

Glucoamilasas progenitoras

[0155] La glucoamilasa progenitora puede ser (a) un polipéptido con al menos 65% de identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2; (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibridiza bajo condiciones de astringencia baja con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1, o (ii) el complemento en toda su longitud de (i); o (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 65% de identidad de secuencia respecto a la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1.

[0156] En un aspecto de la invención, la progenitora tiene una identidad de secuencia respecto al polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%, que tiene actividad de glucoamilasa. En un aspecto de la invención, la secuencia de aminoácidos de la progenitora difiere en no más de 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9, del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

[0157] En otro aspecto de la invención, la progenitora comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto de la invención, la progenitora comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto de la invención, la progenitora comprende o consiste en los aminoácidos 30 a 494 de la SEQ ID NO: 2.

[0158] En otro aspecto de la invención, la progenitora es un fragmento del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 que contiene al menos 465 residuos de aminoácidos, por ejemplo, al menos 470 y al menos 475 residuos de aminoácidos.

5

[0159] En otra forma de realización, la progenitora es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

10

[0160] En otro aspecto de la invención, la progenitora se codifica por un polinucleótido que se hibridiza bajo condiciones de astringencia muy baja, condiciones de astringencia baja, condiciones de astringencia media, condiciones de astringencia medio-alta, condiciones de astringencia alta, o condiciones de astringencia muy alta con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1, o (ii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii) (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).

15

[0161] El polinucleótido de la SEQ ID NO: 1 o una subsecuencia del mismo, al igual que el polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento del mismo, se puede utilizar para diseñar sondas de ácidos nucleicos para identificar y clonar ADN codificando una progenitora de cepas de diferentes géneros o especies según métodos ya conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para la hibridación con el ADN o ADNc genómico de una célula de interés, utilizando procedimientos Southern blot estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían ser de al menos 15, por ejemplo, al menos 25, al menos 35, o al menos 70 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, la sonda de ácidos nucleicos es de al menos 100 nucleótidos de longitud, por ejemplo, al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos, o al menos 900 nucleótidos de longitud. Se pueden usar sondas tanto de ADN como de ARN. Las sondas típicamente están marcadas para la detección del gen correspondiente (por ejemplo, con 32P, 3H, 35S, biotina, o avidina). Tales sondas están abarcadas por la presente invención.

20

25

[0162] Se puede realizar un barrido de una genoteca de ADN o ADNc genómico obtenido a partir de tales otras cepas para encontrar un ADN que se hibridice con las sondas anteriormente descritas y codifique una progenitora. El ADN genómico o de otro tipo de tales otras cepas se puede separar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación. El ADN procedente de las genotecas o el ADN separado se pueden transferir e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que se hibridice con la SEQ ID NO: 1 o una subsecuencia del mismo, el material portador se usa en un Southern blot.

30

35

[0163] Para los fines de la presente descripción, hibridación indica que el polinucleótido se hibridiza a una sonda de ácidos nucleicos marcada que corresponde con (i) la SEQ ID NO: 1; (ii) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1; (iii) el complemento en toda su longitud de la misma; o (iv) una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de astringencia de muy baja a muy alta. Las moléculas a las que la sonda de ácidos nucleicos se hibridiza bajo estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, película radiográfica o cualquiera de los otros medios de detección conocidos en la técnica.

40

[0164] En un aspecto de la invención, la sonda de ácidos nucleicos es la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto de la invención, la sonda de ácidos nucleicos es los nucleótidos 64 a 1848 de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto de la invención, la sonda de ácidos nucleicos es un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO: 2; el polipéptido maduro de la misma; o un fragmento de la misma. En otro aspecto de la invención, la sonda de ácidos nucleicos es la SEQ ID NO: 1.

45

50

[0165] En otra forma de realización, la progenitora es codificada por un polinucleótido con una identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 de al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o 100%.

55

[0166] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido en el que una región de un polipéptido está fusionada en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal de una región de otro polipéptido.

60

[0167] El progenitor puede ser un polipéptido de fusión o polipéptido de fusión escindible en el que otro polipéptido está fusionado en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal del polipéptido de la presente invención. Un polipéptido de fusión se produce por la fusión de un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido de la presente invención. En el estado de la técnica se conocen técnicas para producir polipéptidos de fusión, e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que éstas estén dentro del marco y que la expresión del polipéptido de fusión esté bajo control del/de los mismo(s) promotor(es) y terminador. Los polipéptidos de fusión también se pueden construir utilizando tecnología de inteína en la que polipéptidos de fusión se crean postraduccionalmente (Cooper et al., 1993, EMB J. 12: 2575-

65

2583; Dawson et al., 1994, Science 266: 776-779).

[0168] Un polipéptido de fusión puede comprender además un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Con la secreción de la proteína de fusión, el sitio se escinde y libera los dos polipéptidos. Ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios descritos en Martin et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina et al., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

[0169] En una forma de realización particular, el polipéptido híbrido comprende el dominio catalítico de la glucoamilasa variante fusionado a un enlazador y un dominio de unión a carbohidratos.

[0170] El progenitor se puede obtener de microorganismos de cualquier género. Para los fines de la presente invención, el término "obtener de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente dada significará que el progenitor codificado por un polinucleótido es producido por la fuente o por una cepa en la que se ha insertado el polinucleótido de la fuente. En un aspecto, el progenitor es secretado extracelularmente.

[0171] El progenitor puede ser una glucoamilasa fúngica. Por ejemplo, el progenitor puede ser una glucoamilasa de *Penicillium* tal como, por ejemplo, una glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*.

[0172] En otro aspecto, el progenitor es un *Penicillium oxalicum*, por ejemplo, la glucoamilasa de la SEQ ID NO: 2 o el polipéptido maduro de la misma.

[0173] Se entiende que, para las especies anteriormente mencionadas, la invención abarca los estados perfectos e imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de la especie por el que se conocen. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes apropiados.

[0174] Las cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en un varias colecciones de cultivos, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0175] El progenitor se puede identificar y obtener de otras fuentes, incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas anteriormente mencionadas. En el estado de la técnica se conocen técnicas para el aislamiento de microorganismos y ADN directamente a partir de hábitats naturales. Un polinucleótido que codifica un progenitor se puede obtener de manera similar realizando un barrido de una genoteca de ADN o ADNc genómico de otro microorganismo o muestra de ADN mixto. Una vez que se ha detectado con la(s) sonda(s) un polinucleótido que codifica un progenitor, el polinucleótido se puede aislar o clonar mediante técnicas que son conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

Preparación de variantes

[0176] Las variantes se pueden preparar utilizando cualquier procedimiento de mutagénesis conocido en la técnica, tal como mutagénesis dirigida, construcción de gen sintético, construcción de gen semi-sintético, mutagénesis aleatoria, redistribución, etc.

[0177] La mutagénesis dirigida es una técnica donde una o más (por ejemplo, varias) mutaciones se introducen en uno o más sitios definidos en un polinucleótido que codifica el progenitor.

[0178] La mutagénesis dirigida se puede realizar *in vitro* por PCR con el uso de cebadores oligonucleótidos que contienen la mutación deseada. La mutagénesis dirigida también se puede realizar *in vitro* por mutagénesis de "cassette" con la escisión por una enzima de restricción en un sitio en el plásmido que comprende un polinucleótido que codifica el progenitor y el ligamiento posterior de un oligonucleótido que contiene la mutación en el polinucleótido. Normalmente la enzima de restricción que digiere el plásmido y el oligonucleótido es la misma, lo que permite que los extremos de unión del plásmido y del inserto se enlacen el uno al otro. Véase, por ejemplo, Scherer y Davis, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 76: 4949-4955; y Barton et al., 1990, ácidos nucleicos Res. 18: 7349-4966.

[0179] La mutagénesis dirigida también se puede realizar *in vivo* por métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. nº 2004/0171154; Storici et al., 2001, Nature Biotechnol. 19: 773-776; Kren et al., 1998, Nat. Med. 4: 285-290; y Calissano y Macino, 1996, Fungal Genet.

Newslett. 43: 15-16.

[0180] Cualquier procedimiento de mutagénesis dirigida se puede usar en la presente invención. Hay muchos kits comerciales disponibles que pueden utilizarse para preparar variantes.

[0181] La construcción de un gen sintético implica la síntesis *in vitro* de una molécula de un polinucleótido diseñado para codificar un polipéptido de interés. La síntesis de un gen se puede realizar utilizando varias técnicas, como la tecnología basada en microchip multiplex descrita por Tian et al. (2004, Nature 432: 1050-1054) y tecnologías similares donde se sintetizan oligonucleótidos y se ensamblan sobre chips microfluídicos fotoprogramables.

[0182] Se pueden hacer sustituciones, deleciones, y/o inserciones de aminoácidos únicas o múltiples y se pueden evaluar usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación, y/o redistribución, seguidas de un procedimiento de selección pertinente, tal como los descritos por Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación sobre fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832-10837; patente de EE. UU. n° 5,223,409; WO 92/06204) y mutagénesis dirigida (Derbyshire et al., 1986, Gene 46: 145; Ner et al., 1988, DNA 7: 127).

[0183] Los métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con métodos de selección automatizados de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos clonados y mutagenizados expresados por células huésped (Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente usando métodos estándar conocidos en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de los residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

[0184] La construcción de un gen semi-sintético se realiza por la combinación de aspectos de construcción de un gen sintético, y/o mutagénesis dirigida, y/o mutagénesis aleatoria, y/o redistribución. La construcción semi-sintética se caracteriza por un proceso que utiliza fragmentos de polinucleótidos que son sintetizados, en combinación con técnicas PCR. Regiones definidas de genes pueden así ser sintetizadas de nuevo, mientras que otras regiones se pueden amplificar utilizando cebadores mutagénicos específicos a un sitio, mientras que otras regiones se pueden someter a amplificación con PCR con tendencia al error o PCR sin tendencia al error. Las subsecuencias de polinucleótidos pueden luego ser redistribuidas.

Polinucleótidos

[0185] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican una variante de la presente invención.

Constructos de ácidos nucleicos

[0186] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención operativamente enlazada a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0187] El polinucleótido se puede manipular de varias maneras para conseguir la expresión de una variante. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para la modificación de polinucleótidos utilizando métodos con ADN recombinante son ampliamente conocidas en la técnica.

[0188] La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido que es reconocido por una célula huésped para la expresión del polinucleótido. El promotor contiene secuencias de control transcripcionales que median en la expresión de la variante. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre actividad transcripcional en la célula huésped, incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y se puede obtener de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares o bien homólogos o heterólogos a la célula huésped.

[0189] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos del gen de alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), del gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), del gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP), del gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), del gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (sacB), de los genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis*, del gen criIIIA de *Bacillus thuringiensis* (Agaisse y Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13: 97-107), del operón lac de *E. Coli*, del promotor trc de *E. Coli* (Egon et al., 1988, gen 69: 301-315), del gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (dagA), y del gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci.

EE.UU 75: 3727-3731), al igual que el promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 80: 21-25). Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert et al., 1980, Scientific American 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, supra. Ejemplos de promotores en serie se describen en WO 99/43835.

5 [0190] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidos de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori* (glaA), TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Daria de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, al igual que el promotor NA2-tpi (un promotor modificado a partir de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido procedente de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus*; ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados a partir de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido procedente de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

25 [0191] En un huésped de levadura, los promotores útiles se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*/alcohol deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato (ADH1, ADH2/GAP) triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1), y quinasa de 3-fosfoglicerato de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para las células huésped de levadura son descritas por Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423-488.

35 [0192] La secuencia de control también puede ser un terminador de transcripción, que es reconocido por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está operativamente enlazada al extremo 3'-terminal del polinucleótido que codifica la variante. Cualquier terminador que es funcional en la célula huésped se puede utilizar.

[0193] Los terminadores preferidos para células huésped bacterianas se obtienen de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus clausii* (aprH), de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), y RNA ribosómico de *Escherichia coli* (rrn8).

40 [0194] Los terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

45 [0195] Los terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1), y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, supra.

50 [0196] La secuencia de control también puede ser una región estabilizadora de ARNm hacia abajo respecto de un promotor y hacia arriba respecto de la secuencia codificante de un gen que aumenta expresión del gen.

[0197] Ejemplos de regiones estabilizadoras de ARNm adecuadas se obtienen a partir de un gen *crIII*A de *Bacillus thuringiensis* (WO 94/25612) y un gen SP82 de *Bacillus subtilis* (Hue et al., 1995, Journal of Bacteriology 177: 3465-3471).

60 [0198] La secuencia de control también puede ser un líder, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está operativamente enlazada al extremo 5'-terminal del polinucleótido que codifica la variante. Cualquier líder que sea funcional en la célula huésped puede ser utilizado.

[0199] Los líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

65 [200] Los líderes adecuados para células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de

Saccharomyces cerevisiae, y alcohol deshidrogenasa / gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

5 [0201] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al extremo 3'-terminal de la secuencia de codificación de la variante y, cuando es transcrita, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina a ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped se puede utilizar.

10 [0202] Las secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

15 [0203] Las secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15: 5983-5990.

20 [0204] La secuencia de control también puede ser una región codificante de péptido señal que codifica un péptido señal enlazado al extremo N-terminal de una variante y que dirige la variante hacia la vía secretora de la célula. El extremo 5'-terminal de la secuencia codificante del polinucleótido puede contener intrínsecamente una secuencia codificante de péptido señal enlazada de manera natural en el marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica la variante. Alternativamente, el extremo 5'-terminal de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante de péptido señal que es extraña a la secuencia codificante. Una secuencia codificante de péptido señal extraña puede ser necesaria cuando la secuencia codificante no contiene de manera natural una secuencia codificante de péptido señal. Alternativamente, una secuencia codificante de péptido señal extraña puede reemplazar simplemente la secuencia codificante de péptido señal natural para mejorar la secreción de la variante. Sin embargo, se puede utilizar cualquier secuencia codificante de péptido señal que dirija la variante expresada en la vía secretora de una célula huésped.

30 [0205] Las secuencias codificantes de péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes de péptido señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (*nprT*, *nprS*, *nprM*), y *prsA* de *Bacillus subtilis*. Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.

35 [0206] Las secuencias codificantes de péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias codificantes de péptido señal obtenidas de los genes para amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa de *Humicola lanuginosa*, y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

40 [0207] Los péptidos señal útiles para células huésped de levadura se obtienen de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes de péptido señal útiles son descritas por Romanos et al., 1992, supra.

45 [0208] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante de propéptido que codifica un propéptido posicionado en el extremo N-terminal de una variante. El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido generalmente es inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido a partir del propolipéptido. La secuencia codificante del propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (*aprE*), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (*nprT*), lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

50 [0209] Cuando las secuencias tanto de péptidos señal como de propéptidos están presentes, la secuencia de propéptido está situada junto al extremo N-terminal de la variante y la secuencia de péptido señal está situada junto al extremo N-terminal de la secuencia de propéptido.

55 [0210] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulen la expresión de la variante en función del crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que causan la activación o inactivación de la expresión del gen en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas de los operones *lac*, *tac*, y *trp*. En la levadura, se puede utilizar el sistema ADH2 o sistema GAL1. En hongos filamentosos, se puede utilizar el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, el promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae*, y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica la variante estaría operativamente enlazado a la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

5 [0211] La presente descripción también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención, un promotor, y señales de parada transcripcional y traduccional. Los diversos nucleótidos y secuencias de control se pueden unir para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica la variante en tales sitios. Alternativamente, el polinucleótido se puede expresar mediante la inserción del polinucleótido o un constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante está operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

15 [0212] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y que puede dar lugar a la expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector debe ser introducido. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado.

20 [0213] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el/los cromosoma(s) en el/los que se ha integrado. Además, se puede utilizar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que contienen entre ellos el ADN total que se ha de introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

30 [0214] El vector contiene preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten una fácil selección de las células transformadas, transfectadas o transducidas, o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia a los biocidas o virus, resistencia a los metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares.

35 [0215] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son genes *dal* de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis*, o marcadores que confieren resistencia a antibióticos tales como resistencia a la ampicilina, cloranfenicol, kanamicina, neomicina, espectinomicina o tetraciclina. Los marcadores adecuados para células huésped de levadura incluyen, pero de forma no limitativa, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1, y URA3. Los marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoyltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa), y *trpC* (antranilato sintasa), así como equivalentes de los mismos. Para usar en una célula de *Aspergillus* se prefieren los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y un gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

45 [0216] El vector contiene preferiblemente un elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en el la célula independiente del genoma.

50 [0217] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia que codifica el polinucleótido de la variante o de cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener polinucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una ubicación(es) precisa(s) en el/los cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10000 pares de bases, de 400 a 10000 pares de bases, y de 800 a 10000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencia respecto a la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser polinucleótidos no codificadores o codificadores. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

60 [0218] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita al vector replicarse autónomamente en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador plasmídico que medie en la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador plasmídico" significa un polinucleótido que permite la replicación de un plásmido o vector in vivo.

65 [0219] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177, y pACYC184 que permiten la replicación en *E. Coli*, y pUB110, pE194, pTA1060, y pAM β 1

que permiten la replicación en *Bacillus*.

[0220] Ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

[0221] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, gen 98: 61-67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163-9175; WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se pueden realizar según los métodos descritos en WO 00/24883.

[0222] Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención se puede insertar en una célula huésped para aumentar la producción de una variante. Un aumento en el número de copias del polinucleótido se puede obtener mediante la integración de al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido, donde células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable y, por lo tanto, copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar mediante el cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0223] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para la construcción de los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son conocidos por un experto en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, *supra*).

Células huésped

[0224] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción de una variante de la presente invención. Una construcción o vector que comprende un polinucleótido se introduce en una célula huésped de modo que la construcción o vector se mantiene como integrante cromosómico o como vector extracromosómico que se duplica como se describe anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula progenitora que no es idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen que codifica la variante y su fuente.

[0225] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de una variante, por ejemplo, una procariota o una eucariota.

[0226] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria gram-positiva o gram-negativa. Las bacterias gram-positivas incluyen, pero de forma no limitativa, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, y *Streptomyces*. Las bacterias gram-negativas incluyen, pero de forma no limitativa, *Campylobacter*, *E. Coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, y *Ureaplasma*.

[0227] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus* incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*.

[0228] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus* incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis*, y *Streptococcus equi* subesp. *Zooepidemicus*.

[0229] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces*, incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, y *Streptomyces lividans*.

[0230] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* se puede efectuar por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), transformación de células competentes (véase, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988 biotechniques 6: 742-751), o conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* se puede efectuar por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (véase, por ejemplo, Dower et al., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* se puede efectuar por transformación de protoplastos, electroporación (véase, por ejemplo, Gong et al., 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), conjugación (véase, por ejemplo, Mazodier et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585), o transducción (véase, por ejemplo, Burke et al., 2001, Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU 98: 6289-6294). La

introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* se puede efectuar por electroporación (véase, por ejemplo, Choi et al., 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397), o conjugación (véase, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57. La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* se puede efectuar por competencia natural (ver, por ejemplo, Perry y Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207), electroporación (véase, por ejemplo, Buckley et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804) o conjugación (véase, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436). Sin embargo, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para la introducción de ADN en una célula huésped.

10 [0231] La célula huésped también puede ser una célula eucariota, como una célula de mamífero, insecto, planta, y hongo.

[0232] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Hongos", como se utilizan en este caso incluye los filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota* así como *Oomycota* y todos los hongos mitospóricos (como se definen por Hawkswort et al., en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido).

20 [0233] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este caso incluye levadura ascosporógena (Endomicetales), levadura basidioesporogénea, y levadura de los Fungi Imperfecti (Blastomicetos). Ya que la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, levadura se definirá como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, Passmore, and Davenport, editors, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

25 [0234] La célula huésped de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*, tal como una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis*, o *Yarrowia lipolytica*.

30 [0235] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como se define en Hawkswort et al., 1995, *supra*). Los hongos filamentosos generalmente se caracterizan por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

40 [0236] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes*, o *Trichoderma*.

45 [0237] Por ejemplo, la célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucormiehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

60 [0238] Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos, y la regeneración de la pared celular de un modo conocido de por sí. Procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y de *Trichoderma* se describen en EP 238023, Yelton et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81: 1470-1474, y Christensen et al., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Métodos adecuados para la transformación de especies de fusarium son descritos por Malardier et al., 1989, gen 78: 147-156, y WO 96/00787. La levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito et al., 1983, J. Bacteriol. 153: 163; y Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.

75:1920.

Métodos de producción

5 [0239] La presente invención también se refiere a métodos de producción de una variante, que comprenden: (a) cultivar una célula huésped recombinante de la presente invención bajo condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y (b) recuperar la variante.

10 [0240] Las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción de la variante usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación, o fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentaciones por lote continuo, lote alimentado, o en estado sólido) en laboratorio o fermentadores industriales realizadas en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten la expresión y/o aislamiento de la variante. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos
15 según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Si la variante es secretada en el medio nutritivo, la variante se puede recuperar directamente del medio. Si la variante no es secretada, se puede recuperar de lisados celulares.

20 [0241] La variante se puede detectar utilizando métodos conocidos en la técnica que son específicos para las variantes. Estos métodos de detección incluyen, pero de forma no limitativa, el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático, o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede utilizar un ensayo enzimático para determinar la actividad de la variante.

25 [0242] La variante se puede recuperar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la variante se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitados a, recolección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación, o precipitación.

30 [0243] La variante se puede purificar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitados a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, de cromatoenfoco, y de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, Janson and Ryden, editors, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener variantes sustancialmente puras.
35

[0244] En un aspecto alternativo, la variante no se recupera, sino que una célula huésped de la presente invención que expresa la variante se usa como una fuente de la variante.

Composiciones

40 [0245] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención. Preferiblemente, la composición también comprende un portador y/o un excipiente. Más preferiblemente, las composiciones están enriquecidas en tal polipéptido. El término "enriquecido" indica que la actividad de glucoamilasa de la composición ha sido aumentada, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1.1. Preferiblemente, las composiciones se formulan para proporcionar características deseables tales como color reducido, olor reducido y estabilidad de almacenamiento aceptable.
45

[0246] La composición puede comprender un polipéptido de la presente invención como componente enzimático principal, por ejemplo, una composición de un único componente. Alternativamente, la composición puede comprender múltiples actividades enzimáticas, tal como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasas, quitinasa, cutinasa, ciclodextrin glicosiltransferasa, desoxiribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, o xilanasas.
50

55 [0247] En una forma de realización particular, la composición comprende una alfa amilasa y el polipéptido según la invención.

[0248] En una forma de realización más particular, la composición comprende además una proteasa.

60 [0249] La(s) enzima(s) adicional(es) puede(n) ser producida(s), por ejemplo, por un microorganismo del género *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, o *Aspergillus oryzae*; *Fusarium*, preferiblemente *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*,
65 *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sulphureum*,

Fusarium toruloseum, *Fusarium trichothecioides*, o *Fusarium venenatum*; *Humicola*, preferiblemente *Humicola insolens* o *Humicola lanuginosa*; o *Trichoderma*, preferiblemente *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

5 [0250] Las composiciones de polipéptidos se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden ser en forma de una composición líquida o seca. Por ejemplo, la composición de polipéptidos puede ser en forma de un granulado o un microgranulado. El polipéptido que se va a incluir en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

10 [0251] A continuación se proporcionan ejemplos de usos preferidos del polipéptido o composiciones de polipéptidos de la invención. La dosificación de la composición de polipéptidos de la invención y otras condiciones bajo las que se usa la composición se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

15 Combinación de glucoamilasa y alfa-amilasa

[0252] Según este aspecto de la invención, una glucoamilasa de la invención se puede combinar con una alfa-amilasa. Preferiblemente, la proporción de alfa-amilasa ácida a glucoamilasa es de entre 0,05 y 5,0 AFAU/AGU. Más preferiblemente la proporción entre actividad de alfa-amilasa ácida y actividad de glucoamilasa es al menos 0,10, al menos 0,15, al menos 0,20, al menos 0,25, al menos 0,30, al menos 0,35, al menos 0,40, al menos 0,45, al menos 0,50, al menos 0,55, al menos 0,60, al menos 0,65, al menos 0,70, al menos 0,75, al menos 0,80, al menos 0,85, al menos 0,90, al menos 0,95, al menos 1,00, al menos 1,05, al menos 1,10, al menos 1,20, al menos 1,30, al menos 1,40, al menos 1,50, al menos 1,60, al menos 1,70, al menos 1,80, al menos 1,85, o incluso al menos 1,90 AFAU/AGU. Sin embargo, la proporción entre la actividad de alfa-amilasa ácida y la actividad de glucoamilasa debería preferiblemente ser menos de 4,50, menos de 4,00, menos de 3,50, menos de 3,00, menos de 2,50, o incluso menos de 2,25 AFAU/AGU.

[0253] La composición anterior es adecuada para usar en el proceso de licuefacción, sacarificación, y/o fermentación, preferiblemente en la conversión de almidón, especialmente para producir jarabe y productos de fermentación, tales como etanol.

[0254] A continuación se proporcionan ejemplos de usos preferidos de las composiciones de polipéptidos de la presente invención. La dosificación de la composición de polipéptidos de la invención y otras condiciones bajo las que se usa la composición se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

35 **Usos**

[0255] La presente invención también está destinada al uso de un polipéptido de la presente invención en un proceso de licuefacción, sacarificación y/o fermentación. El polipéptido se puede utilizar en un único proceso, por ejemplo, en un proceso de licuefacción, un proceso de sacarificación, o un proceso de fermentación. El polipéptido también se puede usar en una combinación de procesos, por ejemplo en un proceso de licuefacción y sacarificación, en un proceso de licuefacción y fermentación, o en un proceso de sacarificación y fermentación, preferiblemente en relación con la conversión de almidón.

45 [0256] En un aspecto preferido de la presente invención, el proceso de licuefacción, sacarificación y/o fermentación incluye procesos de licuefacción y sacarificación realizados consecutiva o simultáneamente.

[0257] En el proceso de licuefacción enzimática convencional, se añade alfa-amilasa termoestable y el almidón de cadena larga se degrada hasta convertirse en unidades ramificadas y lineales más cortas (maltodextrinas), pero no se añade glucoamilasa. La glucoamilasa de la presente invención es altamente termoestable, por lo que es ventajoso añadir la glucoamilasa en el proceso de licuefacción. La glucoamilasa de la presente invención tiene un efecto sinérgico cuando se combina con una alfa-amilasa en el proceso de licuefacción. Durante la sacarificación convencional, las dextrinas generadas durante el proceso de licuefacción son además hidrolizadas para producir azúcares moleculares bajos DP1-3 que se pueden metabolizar por el organismo fermentador. La hidrólisis se realiza típicamente usando glucoamilasas; alternativamente, además de glucoamilasas, se puede usar alfa-glucosidasas y/o alfa-amilasas ácidas.

[0258] Cuando se aplica la glucoamilasa de la presente invención, potencialmente en combinación con una alfa-amilasa en un proceso de licuefacción y/o sacarificación, especialmente en un proceso de licuefacción y sacarificación simultáneas, el proceso se puede realizar a una temperatura más elevada. Al llevar a cabo los procesos de licuefacción y/o sacarificación a temperaturas más elevadas, el proceso puede llevarse a cabo en un periodo de tiempo más corto o, alternativamente, el proceso puede llevarse a cabo usando una dosis enzimática más baja. Además, el riesgo de contaminación microbiana se reduce cuando el proceso de licuefacción y/o sacarificación se lleva a cabo a una temperatura más elevada.

65

Conversión de material que contiene almidón

[0259] La presente invención proporciona un uso de la glucoamilasa de la invención para producir glucosas y similares a partir de almidón. Generalmente, el método incluye los pasos de hidrolizar parcialmente almidón precursor usando glucoamilasa de la presente invención o bien sola o en presencia de una alfa-amilasa.

[0260] La glucoamilasa de la invención también se puede usar en combinación con una enzima que hidroliza solo enlaces alfa-(1,6)-glucosídicos en moléculas que comprenden al menos cuatro residuos glicosil.

[0261] En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una glucoamilasa de la invención en la conversión de almidón. Además, la glucoamilasa de la invención se puede utilizar en un proceso de conversión de almidón continuo que incluye un proceso de sacarificación continua.

Producción de jarabe, bebida y/o producto de fermentación

[0262] Los usos de la glucoamilasa de la invención incluyen la conversión de almidón en, por ejemplo, bebida, jarabe, y/o un producto de fermentación, incluyendo etanol.

[0263] La presente invención también proporciona un proceso de uso de una glucoamilasa de la invención para producir jarabe, tal como glucosa y similares, a partir de material que contiene almidón. Las materias primas adecuadas se ejemplifican en la sección "Materiales que contienen almidón". Generalmente, el proceso comprende los pasos de hidrolizar parcial o totalmente el material que contiene almidón (licuefacción y/o sacarificación) en presencia de la glucoamilasa de la presente invención sola o en combinación con alfa-amilasa para liberar glucosa de los extremos no-reductores del almidón o moléculas de oligo o polisacáridos relacionados.

[0264] La glucoamilasa de la invención también se puede usar en forma inmovilizada. Esta es adecuada y se usa frecuentemente para producir jarabes especiales, tales como jarabes de maltosa, así como en el flujo refinado de oligosacáridos en relación con la producción de jarabes de fructosa, por ejemplo, jarabe de alta fructosa (HFS).

[0265] La glucoamilasa de la presente invención también puede usarse para producir varias bebidas, tales como, pero sin limitarse a, bebidas de tomate, patata, patata china, boniato, y/o calabaza.

Productos de fermentación

[0266] El término "producto de fermentación" significa un producto producido por un proceso que incluye un proceso de fermentación utilizando un organismo fermentador. Los productos de fermentación contemplados según la invención incluyen alcoholes (por ejemplo, arabinitol, butanol, etanol, glicerol, metanol, etilenglicol, 1,3-propanodiol

[propilenglicol], butanodiol, glicerina, sorbitol, y xilitol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido acetónico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucárico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutárico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido oxaloacético, ácido propiónico, ácido succínico, y ácido xilónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina, y treonina); un alcano (por ejemplo, pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano, undecano, y dodecano); un cicloalcano (por ejemplo, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano, y ciclooctano); un alqueno (por ejemplo, penteno, hexeno, hepteno, y octeno); gases (por ejemplo, metano, hidrógeno (H₂), dióxido de carbono (CO₂), y monóxido de carbono (CO)); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B₁₂, beta-caroteno); y hormonas. En un aspecto preferido, el producto de fermentación es etanol, por ejemplo, etanol combustible; etanol potable, es decir, bebidas espirituosas neutrales potables; o etanol industrial o productos usados en la industria del alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), la industria láctea (por ejemplo, productos lácteos fermentados), la industria del cuero y la industria del tabaco. Los tipos de cerveza preferidos comprenden cervezas de fermentación alta, *stouts*, de fermentación baja, amargas, licores de malta, happoushu, cerveza de alto contenido de alcohol, cerveza de bajo contenido de alcohol, cerveza baja en calorías o cerveza light. Los procesos de fermentación preferidos usados incluyen procesos de fermentación alcohólica, que son ampliamente conocidos en la técnica. Los procesos de fermentación preferidos son los procesos de fermentación anaeróbica, que son ampliamente conocidos en la técnica.

Elaboración de cerveza

[0267] Las glucoamilasas de la presente invención son altamente termoestables y, por lo tanto, se pueden usar en una industria que requiere la hidrólisis de almidón a altas temperaturas. Por ejemplo, las glucoamilasas de la invención se pueden usar en la industria cervecera. Las glucoamilasas de la invención se añaden en cantidades eficaces que puede determinar fácilmente la persona experta en la técnica.

Producción de un producto de licuefacción, sacarificación y/o fermentación

[0268] En este aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de licuefacción, sacarificación y/o fermentación de material que contiene almidón, que comprende el paso de: tratar material que contiene almidón con un polipéptido de la presente invención.

[0269] En la sección "materiales que contienen almidón" que aparece más adelante se enumeran materias primas adecuadas que contienen almidón. Las enzimas contempladas se enumeran en la sección "enzimas" que aparece más adelante. Preferiblemente, el proceso de la presente invención comprende tratar material que contiene almidón con un polipéptido de la presente invención solo o junto con una alfa-amilasa. El producto de licuefacción y/o de sacarificación de la presente invención es dextrina, o azúcares moleculares bajos, por ejemplo DP1-3. En el proceso de licuefacción, la conversión de almidón en la glucosa, dextrina y/o azúcares de bajo peso molecular es mejorada por la adición de una glucoamilasa de la presente invención. El producto de fermentación, tal como etanol, se puede recuperar opcionalmente después de la fermentación, por ejemplo, por destilación. La fermentación preferiblemente se realiza en presencia de levadura, preferiblemente una cepa de *Saccharomyces*. Los organismos fermentadores adecuados se enumeran en la sección "organismos fermentadores" que aparece más adelante.

Proceso para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón gelatinizado

[0270] En este aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación, especialmente etanol, a partir de material que contiene almidón, dicho proceso que incluye un paso de licuefacción y pasos de fermentación o sacarificación realizados de manera consecutiva o simultánea.

[0271] La invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye los pasos de:

- a) licuar material que contiene almidón; utilizando una alfa amilasa;
- b) sacarificar el material licuado obtenido en el paso (a) utilizando una glucoamilasa; y
- c) fermentar el material sacarificado utilizando un organismo fermentador.

[0272] Preferiblemente, el paso (a) incluye también la utilización de la glucoamilasa de la invención. En una forma de realización la glucoamilasa de la invención también está presente/se añade en el paso (b).

[0273] El producto de fermentación, tal como especialmente etanol, opcionalmente se puede recuperar después de la fermentación, por ejemplo, por destilación. En la sección "materiales que contienen almidón" que aparece más adelante se enumeran materias primas adecuadas que contienen almidón. En la sección "enzimas" que aparece a continuación se enumeran enzimas contempladas. La licuefacción preferiblemente se lleva a cabo en presencia de una alfa-amilasa. La fermentación preferiblemente se realiza en presencia de levadura, preferiblemente una cepa de *Saccharomyces*. En la sección "organismos fermentadores" que aparece a continuación se enumeran organismos fermentadores adecuados. En formas de realización preferidas, los pasos (b) y (c) se realizan de manera consecutiva o simultánea (es decir, como procesos de cultivo en medio sólido).

[0274] En una forma de realización particular, el proceso de la invención comprende además, antes del paso (a), los pasos de:

- x) reducir el tamaño de partícula del material que contiene almidón, preferiblemente por trituración;
- e
- y) formar una suspensión que comprende el material que contiene almidón y agua.

[0275] La suspensión acuosa puede contener 10-40 % en peso, preferiblemente 25-35 % en peso de material que contiene almidón. La suspensión se calienta por encima de la temperatura de gelatinización y se puede añadir alfa-amilasa, preferiblemente alfa-amilasa fúngica bacteriana y/o ácida, para iniciar la licuefacción (dilución). En una forma de realización, la suspensión se puede cocinar por chorro de vapor para gelatinizar más la suspensión antes de someterla a una alfa-amilasa en el paso (a) de la invención.

[0276] Más específicamente, la licuefacción se puede realizar como un proceso de suspensión en caliente en tres pasos. La suspensión se calienta a 60-95°C, preferiblemente 80-85°C, y se añade la alfa-amilasa para iniciar la licuefacción (dilución). Luego la suspensión se puede cocinar a chorro de vapor a una temperatura entre 95-140°C, preferiblemente 105-125°C, durante 1-15 minutos, preferiblemente durante 3-10 minutos, especialmente alrededor de 5 minutos. La suspensión se enfría a 60-95°C y se añade más alfa-amilasa para finalizar la hidrólisis (licuefacción secundaria). El proceso de licuefacción normalmente se realiza a pH 4.5-6.5, en particular a un pH entre 5 y 6. Los granos enteros molidos y licuados se conocen como mosto.

[0277] La sacarificación del paso (b) se puede realizar utilizando condiciones ampliamente conocidas en la

técnica. Por ejemplo, un proceso de sacarificación completo puede durar hasta de aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas; sin embargo, es común realizar solo una pre-sacarificación de típicamente 40-90 minutos a una temperatura entre 30-65°C, típicamente aproximadamente 60°C, seguida de una sacarificación completa durante la fermentación en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (proceso SSF). La sacarificación típicamente se realiza a temperaturas de 30-65°C, típicamente alrededor de 60°C, y a un pH entre 4 y 5, normalmente a alrededor de pH 4.5.

[0278] El proceso más usado en la producción de producto de fermentación, especialmente de etanol, es el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), en el que no hay fase de pausa para la sacarificación, lo que significa que el organismo fermentador, tal como levadura, y la(s) enzima(s) se pueden añadir juntos. La SSF se puede realizar típicamente a una temperatura de entre 25°C y 40°C, como por ejemplo entre 29°C y 35°C, como por ejemplo entre 30°C y 34°C, como por ejemplo alrededor de 32°C. Según la invención, la temperatura se puede aumentar o disminuir durante la fermentación.

[0279] Conforme a la presente invención, el paso de fermentación (c) incluye, sin limitación, procesos de fermentación usados para producir alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, de acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H₂ y CO₂) antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B₁₂, beta-caroteno); y hormonas. Los procesos de fermentación preferidos incluyen procesos de fermentación alcohólica, como se conocen en la técnica. Los procesos de fermentación preferidos son los procesos de fermentación anaeróbica, según se conocen en la técnica.

Procesos para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón no gelatinizado

[0280] En este aspecto, la invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón sin gelatinización del material que contiene almidón (es decir, material que contiene almidón sin cocinar). Según la invención, el producto de fermentación deseado, tal como etanol, se puede producir sin licuefacción de la suspensión acuosa que contiene el material que contiene almidón. En una forma de realización, un proceso de la invención incluye la sacarificación de material que contiene almidón (molido), por ejemplo, almidón granulado, por debajo de la temperatura de gelatinización en presencia de una alfa amilasa para producir azúcares que se pueden fermentar hasta obtener el producto de fermentación deseado mediante un organismo fermentador adecuado. En otra forma de realización, una glucoamilasa de la invención y una alfa amilasa se usan durante la sacarificación y la fermentación. En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que comprende:

- a) sacarificación de material que contiene almidón con una glucoamilasa madura según la invención, preferiblemente que tiene la secuencia mostrada como los aminoácidos 22 a 616 en la SEQ ID NO: 2, a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho material que contiene almidón,
- b) fermentación utilizando un organismo fermentador.

[0281] Los pasos (a) y (b) del proceso de la invención se pueden realizar consecutiva o simultáneamente. En una forma de realización, una suspensión que comprende agua y material que contiene almidón se prepara antes del paso (a).

[0282] En una forma de realización preferida, el paso (a) incluye la adición de una alfa amilasa.

[0283] El proceso de fermentación se puede realizar durante un periodo de 1 a 250 horas, es preferiblemente de 25 a 190 horas, más preferiblemente de 30 a 180 horas, más preferiblemente de 40 a 170 horas, aún más preferiblemente de 50 a 160 horas, aún más preferiblemente de 60 a 150 horas, incluso aún más preferiblemente de 70 a 140 horas, y de la forma más preferible de 80 a 130 horas.

[0284] El término "temperatura inicial de gelatinización" significa la temperatura mínima a la que comienza la gelatinización del almidón. El almidón calentado en agua empieza gelatinizarse entre 50°C y 75°C; la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón específico, y puede ser determinada fácilmente por el experto en la materia. Así, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según la especie de la planta, la variedad particular de las especies de la planta así como según las condiciones de crecimiento. En el contexto de esta invención, la temperatura de gelatinización inicial de un material dado que contiene almidón es la temperatura en la que la birrefringencia se pierde en 5% de los gránulos de almidón utilizando el método descrito por Gorinstein y Lii, 1992, Starch/Stärke 44(12): 461-466.

[0285] Antes del paso (a), se puede preparar una suspensión de material que contiene almidón, tal como almidón granulado, que tiene 10-55 % en peso de sólidos secos, preferiblemente 25-40 % en peso de sólidos secos, más preferiblemente 30-35 % en peso de sólidos secos de material que contiene almidón. La suspensión puede

incluir agua y/o aguas de proceso, tales como vinaza (backset), agua de lavado, condensado o destilado de evaporador, agua de sección de agotamiento de destilación, u otra agua de proceso en planta de producto de fermentación. Debido a que el proceso de la invención se realiza por debajo de la temperatura de gelatinización y, por lo tanto, no tiene lugar ningún aumento de viscosidad significativo, se pueden utilizar niveles altos de vinaza si se desea. En una forma de realización, la suspensión acuosa contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 70 % en vol. de vinaza, preferiblemente 15-60 % en vol. de vinaza, especialmente de aproximadamente 30 a 50 % en vol. de vinaza.

[0286] El material que contiene almidón se puede preparar reduciendo el tamaño de partícula, preferiblemente por molienda en húmedo o en seco, a entre 0,05 y 3,0 mm, preferiblemente 0,1-0,5 mm. Después de ser sometido a un proceso de la invención, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o preferiblemente al menos 99% de los sólidos secos del material que contiene almidón se convierten en un hidrolizado de almidón soluble.

[0287] El proceso de la invención se lleva a cabo a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial. Preferiblemente, la temperatura a la que el paso (a) se realiza es de entre 30-75°C, preferiblemente entre 45-60°C.

[0288] En una forma de realización preferida, el paso (a) y el paso (b) se realizan como un proceso de sacarificación y fermentación secuenciales o simultáneas. En tal forma de realización preferida, el proceso se lleva a cabo típicamente a una temperatura de entre 25°C y 40°C, tal como entre 29°C y 35°C, tal como entre 30°C y 34°C, tal como alrededor de 32°C. Según la invención, la temperatura se puede regular hacia arriba o hacia abajo durante la fermentación.

[0289] En una forma de realización, la sacarificación y la fermentación simultáneas se llevan a cabo de manera que el nivel de azúcar, tal como el nivel de glucosa, se mantiene a un nivel bajo tal como por debajo de 6% en peso, preferiblemente por debajo de aproximadamente 3% en peso, preferiblemente por debajo de aproximadamente 2% en peso, más preferiblemente por debajo de aproximadamente 1% en peso, incluso más preferiblemente por debajo de aproximadamente 0,5% en peso, o incluso más preferiblemente 0,25% en peso, tal como por debajo de aproximadamente 0,1% en peso. Tales bajos niveles de azúcar se pueden lograr simplemente empleando cantidades reguladas de enzima y de organismo fermentador. Una persona experta en la técnica puede determinar fácilmente qué cantidades de enzima y de organismo fermentador usar. Las cantidades empleadas de enzima y organismo fermentador también se pueden seleccionar para mantener bajas concentraciones de maltosa en el caldo de fermentación. Por ejemplo, el nivel de maltosa se puede mantener por debajo de aproximadamente 0,5 % en peso o por debajo aproximadamente 0,2 % en peso.

[0290] El proceso se puede realizar en el rango de pH entre 3 y 7, preferiblemente de pH 3.5 a 6, o más preferiblemente de pH 4 a 5.

[0291] La glucoamilasa de la presente invención es altamente termoestable, por lo que la pre-sacarificación y/o sacarificación de la presente invención se puede llevar a cabo a una temperatura más alta que la pre-sacarificación y/o sacarificación convencional. En una forma de realización, un proceso de la invención incluye la pre-sacarificación de material que contiene almidón antes del proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). La pre-sacarificación puede llevarse a cabo a una temperatura elevada (por ejemplo, 50-85°C, preferiblemente 60-75°C) antes de pasar a la SSF.

Materiales que contienen almidón

[0292] Cualquier materia prima adecuada que contenga almidón, incluyendo almidón granulado, se puede utilizar según la presente invención. La materia prima se selecciona generalmente según el producto de fermentación deseado. Ejemplos de materias primas que contienen almidón, adecuadas para usar en un proceso de la presente invención, incluyen tubérculos, raíces, tallos, granos enteros, maíces, carozo, trigo, cebada, centeno, zahína, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, guisantes de arroz, alubias, o boniatos, o mezclas de los mismos, o cereales, materias primas que contienen azúcar, tales como melaza, materiales de fruta, azúcar de caña o remolacha azucarera, patatas, y materiales con celulosa, tales como madera o residuos vegetales, o mezclas de los mismos. Se contemplan los tipos tanto cerosos como no cerosos de maíz y cebada.

Organismos fermentadores

[0293] "Organismo fermentador" se refiere a cualquier organismo, incluyendo organismos bacterianos y fúngicos, adecuados para usar en un proceso de fermentación y capaces de producir un producto de fermentación deseado. Los organismos fermentadores especialmente adecuados son capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares, tales como glucosa o maltosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado. Los ejemplos de organismos fermentadores incluyen organismos fúngicos, tales como levadura. La levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces* spp., en particular, *Saccharomyces cerevisiae*. Las

levaduras disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, Red Star™/Lesaffre Ethanol Red (disponible de Red Star/Lesaffre, EE. UU.) FALI (disponible de Fleischmann's Yeast, una división de Burns Philp Food Inc., EE. UU.), SUPERSTART (disponible de Alltech), GERT STRAND (disponible de Gert Strand AB, Suecia) y FERMIOL (disponible de DSM Specialties).

5

ENZIMAS

Glucoamilasa

10 [0294] La glucoamilasa preferiblemente es una glucoamilasa de la invención. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, una glucoamilasa de la invención también se puede combinar con otras glucoamilasas.

15 [0295] La glucoamilasa se puede añadir en una cantidad de 0,001 a 10 AGU/g de DS, preferiblemente de 0,01 a 5 AGU/g de DS, tal como alrededor de 0,05; 0,1; 0,3; 0,5; 1 o 2 AGU/g de DS, especialmente 0,05 a 0,5 AGU/g de DS, o 0,02-20 AGU/g de DS, preferiblemente 0,1-10 AGU/g de DS.

Alfa-amilasa

20 [0296] La alfa-amilasa puede, según la invención, ser de cualquier origen. Se prefieren las alfa-amilasas de origen fúngico o bacteriano.

25 [0297] En un aspecto preferido, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, por ejemplo, una alfa-amilasa ácida fúngica o una alfa-amilasa ácida bacteriana. El término "alfa-amilasa ácida" significa una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que, al añadirse en una cantidad eficaz, tiene actividad óptima a un pH en el rango de de 3 a 7, preferiblemente de 3.5 a 6, o más preferiblemente de 4-5.

Alfa-amilasas bacterianas

30 [0298] Según la invención, una alfa-amilasa bacteriana puede preferiblemente derivar del género *Bacillus*.

[0299] En un aspecto preferido, la alfa-amilasa de *Bacillus* es derivada de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus* o *B. subtilis*, pero también puede ser derivada de otra especie de *Bacillus*. Los ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (BLA) mostrada en la SEQ ID NO: 4 en WO 99/19467, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (BAN) mostrada en la SEQ ID NO: 5 en WO 99/19467, y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (BSG) mostrada en la SEQ ID NO: 3 en WO 99/19467. En una forma de realización de la invención, la alfa-amilasa es una enzima con un grado de identidad de al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferido al menos 80%, aún más preferido al menos 90%, tal como al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% identidad con cualquiera de las secuencias mostradas como SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, o 5, respectivamente, en WO 99/19467.

45 [0300] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrida, especialmente una descrita en cualquiera de WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059, y WO 02/10355. Variantes de alfa-amilasa específicamente contempladas se describen en las patentes de EE.UU. nº 6,093,562, 6,297,038 o en la patente de EE.UU. nº 6,187,576 e incluyen variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (BSG alfa-amilasa) que tienen una delección de uno o dos aminoácidos en la posición 179 a 182, preferiblemente una delección doble descrita en WO 1996/023873 - véase por ejemplo, página 20, líneas 1-10, preferiblemente correspondientes a delta (181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa de tipo salvaje BSG mostrada en la SEQ ID NO: 3 descrita en WO 99/19467 o la delección de los aminoácidos 179 y 180 usando la SEQ ID NO: 3 en WO 99/19467 para la numeración. Aún más preferidas son las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, que tiene una delección doble que corresponde con delta(181-182) y además comprende una sustitución N193F (denominada también I181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa de tipo salvaje BSG mostrada en la SEQ ID NO: 3 descrita en WO 99/19467.

60 [0301] La alfa-amilasa también puede ser una alfa-amilasa maltogénica. Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa, E.C. 3.2.1.133) es capaz de hidrolizar amilosa y amilopectina en maltosa en la configuración alfa. Una alfa-amilasa maltogénica de la cepa de *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está comercialmente disponible de Novozymes A/S, Dinamarca. La alfa-amilasa maltogénica se describe en las patentes de EE.UU. nº 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628.

Alfa-amilasas híbridas bacterianas

65 [0302] Una alfa-amilasa híbrida específicamente contemplada comprende 445 residuos de aminoácidos C-terminal de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada como SEQ ID NO: 4 en WO 99/19467) y los 37

residuos de aminoácidos N-terminal de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada como SEQ ID NO: 3 en WO 99/194676), con una o más, especialmente todas, de las siguientes sustituciones:

5 G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S (utilizando la numeración de *Bacillus licheniformis*). También se prefieren variantes que tienen una o varias de las siguientes mutaciones (o mutaciones correspondientes en otras estructuras de alfa-amilasa de *Bacillus*): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o la delección de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferiblemente la delección de E178 y G179 (utilizando la numeración de la SEQ ID NO: 5 de WO 99/19467).

Alfa-amilasas fúngicas

10 [0303] Las alfa-amilasas ácidas fúngicas incluyen alfa-amilasas ácidas derivadas de una cepa del género *Aspergillus*, tal como alfa-amilasas de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, o *Aspergillus kawachii*.

15 [0304] Una alfa-amilasa ácida fúngica preferida es una alfa-amilasa de tipo Fungamyl que es preferiblemente derivada de una cepa de *Aspergillus oryzae*. En la presente descripción, el término "alfa-amilasa de tipo Fungamyl" indica una alfa-amilasa que muestra una alta identidad, es decir más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85% más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, más del 99% o incluso 100% de identidad con la parte madura de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10 de WO 96/23874.

20 [0305] Otra alfa-amilasa ácida preferida es derivada de una cepa de *Aspergillus niger*. En un aspecto preferido, la alfa-amilasa fúngica ácida es la de *A. niger* descrita como "AMYA_ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TeEMBL con el número de depósito primario P56271 y descrita con más detalle en WO 89/01969 (Ejemplo 3). La alfa-amilasa ácida de *Aspergillus niger* se muestra también como la SEQ ID NO: 1 de WO 2004/080923 (Novozymes). También se contemplan variantes de dicha amilasa fúngica ácida que tienen al menos 70% identidad, tal como al menos 80% o incluso al menos 90% identidad, tal como al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% identidad con la SEQ ID NO: 1 de WO 2004/080923.

25 [0306] En un aspecto preferido, la alfa-amilasa es derivada de *Aspergillus kawachii* y descrita por Kaneko et al. J. Ferment. Bioeng. 81:292-298(1996) "Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachii*"; y además como EMBL:#AB008370.

30 [0307] La alfa-amilasa ácida fúngica también puede ser una enzima de tipo salvaje que comprende un módulo de unión a carbohidratos (CBM) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir, un no-híbrido), o una variante de la misma. En una forma de realización, la alfa-amilasa ácida de tipo salvaje es derivada de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

35 [0308] Una alfa-amilasa ácida según la invención se puede añadir en una cantidad de 0,01 a 10 AFAU/g de DS, preferiblemente de 0,01 a 5 AFAU/g de DS, especialmente de 0,02 a 2 AFAU/g de DS.

40 Alfa-amilasas híbridas fúngicas

[0309] En un aspecto preferido, la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida. Ejemplos preferidos de alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen las descritas en WO 2005/003311 o la publicación de patente de EE. UU. n° 2005/0054071 (Novozymes) o la solicitud de patente de EEUU n° 2006/0148054 (Novozymes). Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico de alfa-amilasa (CD) y un dominio/módulo de enlace de carbohidratos (CBM) y un enlazador opcional.

50 [0310] Ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen, pero sin limitarse a ellas, las descritas en la solicitud de patente de EE. UU. n° 2006/0148054 incluyendo la variante de Fungamyl con dominio catalítico JA118 y SBD de *Athelia rolfsii* (SEQ ID NO: 100 de la solicitud de EE. UU. n° 2006/0148054), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de AMG y SBD de *Athelia rolfsii* (SEQ ID NO: 101 de la solicitud de EE. UU. n° 2006/0148054) y alfa-amilasa de *Meripilus giganteus* con enlazador de glucoamilasa y SBD de *Athelia rolfsii* (SEQ ID NO: 102 de la solicitud de EE. UU. n° 2006/0148054); y alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa y CBM de *Aspergillus niger* (SEQ ID NO 2 de la publicación internacional n° WO2007/144424).

55 [0311] Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen, pero sin limitarse a ellas, las descritas en la publicación de patente de EE. UU. n° 2005/0054071, incluyendo las descritas en la Tabla 3 de la página 15, tal como alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con enlazador de *Aspergillus kawachii* y dominio de unión a almidón.

60 Productos comerciales de alfa-amilasa

65 [0312] Las composiciones comerciales preferidas que comprenden alfa-amilasa incluyen micolasa de DSM (Gist Brocades), BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ SC, LIQUOZYME™ SC DS, y SAN™

SUPER, SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE™ L-40,000, DEX-LO™, SPEZYME™ FRED, SPEZYME™ AA, SPEZYME™ Ethyl, y SPEZYME™ DELTA AA (Genencor Int.)

[0313] La presente invención se describe con más detalle mediante los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Materiales y métodos

Actividad de glucoamilasa

[0314] La actividad de glucoamilasa se puede medir en unidades AGU.

Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0315] La unidad de glucoamilasa (AGU) se define como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándar (37°C, pH 4.3, sustrato: maltosa 100 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 6 minutos como se ha establecido en la incubación de glucoamilasa que aparece a continuación), generando así glucosa.

<u>incubación de glucoamilasa</u>	
Sustrato:	100 mM de maltosa
Tampón:	0,1 M de acetato
pH:	4.30 ± 0.05
temperatura de incubación:	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	6 minutos
Margen de actuación de la enzima:	0,5-4,0 AGU/mL

[0316] El principio de análisis se describe en 3 pasos de reacción:

El paso 1 es una reacción enzimática:

Glucoamilasa (AMG), EC 3,2,1,3 (exo-alfa-1,4-glucono-glucohidrolasa), hidroliza maltosa para formar alfa-D-glucosa. Tras la incubación, la reacción se detiene con NaOH.

[0317] Los pasos 2 y 3 suponen una reacción de punto final:

La glucosa es fosforilada por ATP, en una reacción catalizada por hexoquinasa. El glucosa-6-fosfato formado se oxida hasta convertirse en 6-fosfogluconato por glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En esta misma reacción, una cantidad equimolar de NAD⁺ se reduce a NADH con un aumento en la absorbancia resultante a 340 nm. Se puede utilizar un sistema autoanalizador tal como Konelab 30 Analyzer (Thermo Fisher Scientific).

Reacción de color	
Tris	aprox. 35 mM
ATP	0,7 mM
NAD ⁺	0,7 mM
Mg ²⁺	1,8 mM
Hexoquinasa	> 850 U/L
Glucosa-6-P-DH	> 850 U/L
pH aprox.	7.8
Temperatura	37,0 °C ± 1,0 °C
Tiempo de reacción	420 seg
Longitud de onda	340 nm

Actividad de alfa-amilasa ácida

[0318] Cuando se usa según la presente invención, la actividad de cualquier alfa-amilasa ácida se puede medir

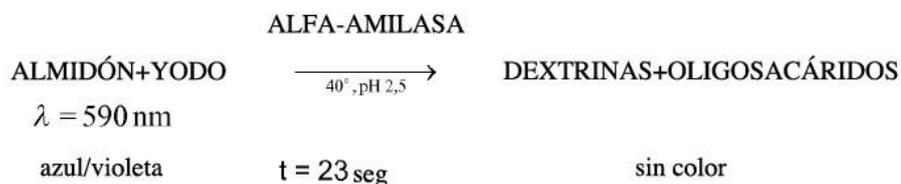
en AFAU (unidades de alfa-amilasa ácida fúngica). Alternativamente, la actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en KNU (Kilo unidades de Novozymes (Termamyl SC)).

Actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)

5 [0319] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa ácida fúngica). 1 AFAU se define como la cantidad de enzima que degrada 5,260 mg de sustancia seca de almidón por hora bajo las condiciones estándar mencionadas a continuación.

10 [0320] Alfa-amilasa ácida, una endo-alfa-amilasa (1,4-alfa-D-glucano-glucanohidrolasa, E.C. 3.2.1.1) hidroliza enlaces alfa-1,4-glucosídicos en las regiones internas de la molécula de almidón para formar dextrinas y oligosacáridos con longitudes de cadena diferentes. La intensidad de color formada con yodo es directamente proporcional a la concentración de almidón. La actividad de amilasa se determina utilizando colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón bajo las condiciones analíticas especificadas.

15



Condiciones estándar/condiciones de reacción:

Sustrato:	almidón soluble, aprox. 0,17 g/L
Tampón:	citrato, aprox. 0,03 M
Yodo (I ₂):	0,03 g/L
CaCl ₂ :	1,85 mM
PH:	2.50 ± 0.05
Temperatura de incubación:	40°C
Tiempo de reacción:	23 segundos
Longitud de onda:	590 nm
Concentración enzimática:	0,025 AFAU/mL
Margen de actuación de la enzima:	0,01-0,04 AFAU/mL

Manipulaciones de ADN

20 [0321] A menos que se indique de otro modo, se realizaron manipulaciones y transformaciones de ADN utilizando métodos estándar de biología molecular como se describe en Sambrook et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab. Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. et al. (eds.) "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R. y Cutting, S. M. (eds.).

25

Secuenciación de ADN

30 [0322] La transformación de *E. coli* para la secuenciación del ADN se efectuó por electroporación (gen BIO-RAD pulsador) o químicamente. Se prepararon plásmidos de ADN por método alcalino (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor) o con el Qiagen® Plasmid Kit. Se recuperaron fragmentos de ADN de gel de agarosa mediante el equipo de extracción de gel Qiagen. Se llevó a cabo una PCR utilizando un motor de ADN PTC-200. Se utilizó el analizador genético ABI PRISMTM 310 para determinar todas las secuencias de ADN.

Medios

35 [0323] El medio YP con 2% de maltosa estaba compuesto por 10g/L de extracto de levadura, 20g/L de peptona y 20g/L de maltosa.

40 [0324] El medio MLC estaba compuesto por 40g/L de glucosa, 50g/L de polvo de soja, 4 g/L de ácido cítrico, pH 5.0.

45 [0325] El medio M410 estaba compuesto por 50g/L de maltosa-1H₂O, 8g/L de extracto de levadura, 2g/L de MgSO₄.7H₂O, 4g/L de ácido cítrico -1H₂O, 50g/L de glucosa, 2g/L de K₂HPO₄, 0,5ml/L de solución de metales traza AMG, y 2g/L de urea, pH4.5. La solución de metales traza AMG estaba compuesta por 13,9g/L de FeSO₄.7H₂O, 13,5g/L de MnSO₄.1H₂O, 6,8g/L de ZnCl₂, 2,5g/L de CuSO₄.5H₂O, 0,24g/L de NiCl₂.6H₂O, y 3g/L de ácido cítrico.

[0326] A menos que se indique de otro modo, los medios se preparan según Sambrook et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY. Los productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de grado al menos reactivo.

5 [0327] El medio FT X-14 estaba compuesto como se muestra a continuación.

Sulfato de magnesio	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,3	g
Sulfato de potasio	K ₂ SO ₄	0,3	g
Cloruro de sodio	NaCl	1	g
Dihidrogenofosfato de potasio	KH ₂ PO ₄	1	g
Maltosa	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ ·H ₂ O	10	g
Extracto de levadura		1,4	g
Ácido dimetilmalónico	C ₅ H ₈ O ₄	10	g
Metales traza MSA-SUB-FS-0044		0,25	ml
Agua		1000	ml

Enzimas

10 Glucoamilasas:

[0328] Glicoamilasa de *Penicillium oxalicum* como se describe en la SEQ ID NO: 2 de WO2011/127802.

15 [0329] Glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* (que se describe en la publicación internacional WO 99/28448 como la SEQ ID NO: 7)

20 [0330] Glucoamilasa de *Aspergillus niger* (uniprot:P69328) (que se describe en Svensson, B. Larsen, K. Gunnarsson, A.; "Characterization of a glucoamylase G2 from *Aspergillus niger*"; Eur. J. Biochem. 154:497-502 (1986))

[0331] Glucoamilasa de *Trametes cingulata* como se describe en la SEQ ID NO: 2 de WO 2006/069289 y disponible de Novozymes A/S.

Alfa-amilasas:

25 [0332] La alfa-amilasa ácida descrita como la Variante JA001 en la publicación internacional WO 2005/003311

[0333] Alfa-amilasa producida a partir de *Bacillus licheniformis*, p. ej Termamyl™ SC (alfa-amilasa disponible comercialmente de Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca)

30 [0334] Alfa-amilasa híbrida consistente en alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa y SBD de *Aspergillus niger* descrita como V039 en la Tabla 5 en WO 2006/069290 (Novozymes A/S)

35 [0335] Alfa-amilasa A: alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (SEQ ID NO: 3 en EP1023439B1) con las mutaciones I181*+G182*+N193F truncada en 491 aminoácidos mostrados como la SEQ ID NO: 6 de WO2011/082425.

40 [0336] Alfa-amilasa 1407: alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (SEQ ID NO: 3 de EP1023439B1) con las mutaciones I181*+G182*+N193F+V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+ H208Y+K220P+N224L+Q254S truncada en 491 aminoácidos (véase también WO2011/082425).

Proteasas:

45 [0337] Proteasa 196: metaloproteasa derivada de *Thermoascus aurantiacus* CGMCC n° 0670 descrita como los aminoácidos 1-177 de la SEQ ID NO: 2 de WO 2003/048353 con las mutaciones siguientes: A27K+D79L+Y82F+S87G+D104P+A112P+A126V+D142L (véase también WO2011/072191).

Ejemplo 1: clonación del gen de glucoamilasa de una cepa de *Penicillium oxalicum*

50 **Preparación de ADNc de una cepa de *Penicillium oxalicum*.**

[0338] El ADNc se sintetizó siguiendo las instrucciones del sistema de amplificación rápida de extremos 3' de cDNA (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE. UU.).

55

Clonación del gen de glucoamilasa de una cepa de *Penicillium oxalicum*.

[0339] El gen de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se clonó utilizando el cebador de oligonucleótidos mostrado a continuación diseñado para amplificar el gen de glucoamilasa del extremo 5' terminal.

Cebador sentido: 5'-ATGCGTCTCACTCTATTATCAGGTG-3' (SEQ ID NO: 4)

[0340] El gen de longitud completa se amplificó mediante PCR con cebador sentido y AUAP (suministrado por amplificación rápida de extremos 3' de cDNA) usando Platinum Taq ADN polimerasa de alta fidelidad (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE. UU.). La reacción de amplificación estaba compuesta por 5 µl de tampón 10x de PCR, 2 µl MgCl₂ de 25mM, 1 µl de dNTP de 10mM, 1 µl de cebador de sentido de 10uM, 1 µl de AUAP de 10 uM, 2 µl de ADNc de primera cadena, 0,5 µl de Taq de alta velocidad, y 37,5 µl de agua desionizada. El programa de PCR fue: 94°C, 3 mins; 10 ciclos de 94°C durante 40 seg, 60°C 40 seg con una reducción de 1°C por ciclo, 68°C durante 2min; 25 ciclos de 94°C durante 40 seg, 50°C durante 40 seg, 68°C durante 2 min; extensión final a 68°C durante 10 min.

[0341] El fragmento de PCR obtenido se clonó en el vector pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, EE. UU) utilizando un Sistema de vector pGEM-T Promega Corporation, Madison, WI, EE. UU) para generar el plásmido AMG 1. El gen de glucoamilasa insertado en el plásmido AMG 1 fue confirmado por secuenciación. La cepa de *E. coli* TOP10 que contiene el plásmido AMG 1 (designada como NN059173), se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) el 23 de noviembre de 2009, y se le asignó el número de depósito DSM 23123.

Ejemplo 2: expresión de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* clonada

[0342] El gen de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se volvió a clonar a partir del plásmido AMG 1 en un vector de expresión de *Aspergillus* por PCR usando dos cebadores de clonación F y R mostrados a continuación, que se diseñaron basándose en la secuencia conocida y marcadores añadidos para la clonación directa mediante la estrategia IN-FUSION™.

Cebador F: 5' ACACAAGTGGGGATCCACCATGCGTCTCACTCTATTATC (SEQ ID NO: 5)

Cebador R: 5' AGATCTCGAGAAGCTTAAACTGCCACACGTCGTTGG (SEQ ID NO: 6)

[0343] Se llevó a cabo una reacción por PCR con plásmido AMG 1 para amplificar el gen de longitud completa. La reacción por PCR estaba compuesta por 40 µg de ADN del plásmido AMG 1, 1 µl de cada cebador (100 µM); 12,5 µl de mezcla maestra 2X de extensor de alta fidelidad (Extensor Hi-Fidelity Master Mix, ABgene, Reino Unido), y 9,5 µl de agua de grado PCR. La reacción por PCR se realizó utilizando una máquina DYAD PCR (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU) programada para 2 minutos a 94°C seguidos de 25 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 50°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto; y luego 10 minutos a 72°C.

[0344] Los productos de la reacción se aislaron por electroforesis en gel de agarosa al 1,0% utilizando tampón TAE 1x donde se extrajo una banda de producto de PCR de aproximadamente 1,9 kb del gel y se purificó utilizando un kit de purificación GFX® PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Reino Unido) según las instrucciones del fabricante. EL ADN correspondiente al gen de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se clonó en un vector de expresión *Aspergillus* linearizado con *Bam*HI y *Hind*III, utilizando un kit de clonación IN-FUSION™ Dry-Down PCR Cloning Kit (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE.UU) según las instrucciones del fabricante. La construcción del vector linearizado es como se describe en WO 2005/042735 A1.

[0345] Un volumen de 2 µl de la mezcla de ligamiento se usó para transformar 25 µl de células Fusion Blue de *E. coli* (incluido en el kit de clonación IN-FUSION™ Dry-Down PCR Cloning Kit). Después de un choque térmico a 42°C durante 45 seg, y enfriamiento en hielo, se añadieron 250 µl de medio SOC, y las células se incubaron a 37°C a 225 r.p.m. durante 90 min antes de ser colocadas en placas de agar LB que contenían 50 µg de ampicilina por ml, y se cultivaron durante toda la noche a 37°C. Se inocularon colonias seleccionadas en 3 ml de medio LB suplementado con 50 µg de ampicilina por ml y se incubaron a 37°C a 225 r.p.m. durante toda la noche. Se purificó ADN plasmídico de las colonias seleccionadas utilizando Mini JETSTAR (Genomed; Alemania) según las instrucciones del fabricante. La secuencia de genes de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se verificó por secuenciación de Sanger antes de la expresión heteróloga. Uno de los plásmidos se seleccionó para posterior expresión, y se le denominó XYZ XYZ1471-4.

[0346] Se prepararon protoplastos de *Aspergillus niger* MBin118 como se describe en WO 95/02043. Cien µl de suspensión de protoplastos se mezclaron con 2,5 µg del plásmido XYZ1471-4 y 250 microlitros de PEG 4000 al 60% (Applichem) (polietilenglicol, peso molecular 4,000), 10 mM de CaCl₂, y 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 se añadieron y se mezclaron lentamente. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos y los protoplastos se mezclaron con agarosa de baja fusión al 6% (Biowhittaker Molecular Applications) en placas de sacarosa COVE (COVE, 1996, Biochim. Biophys. Acta 133:51-56) (1 M) suplementadas con 10 mM de acetamida y 15 mM de CsCl y se añadieron como una capa superior en las placas de sacarosa COVE (1M) suplementadas con 10 mM

de acetamida y 15 mM de CsCl para la selección de transformantes (4 ml de top agar por placa). Tras la incubación durante 5 días a 37°C, se recogieron esporas de dieciséis transformantes y se sembraron en 750 µl de medio YP con maltosa al% en placas MT de 96 pocillos profundos. Después de 5 días de cultivo fijo a 30°C, 10 µl del caldo de cultivo de cada pocillo se analizaron en un gel SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio), gel Griton XT Precast (BioRad, CA, EE.UU) para identificar los mejores transformantes en función de la capacidad para producir una gran cantidad de glucoamilasa. Se identificó un transformante seleccionado en la placa de transformación original y se conservó como esporas en un portainjerto de glicerol al 20% y se almacenó congelado (-80°C).

10 [0347] **Cultivo.** El transformante seleccionado se inoculó en 100ml de medio MLC y se cultivó a 30 °C durante 2 días en frascos de agitación de 500 ml en un agitador rotatorio. 3 ml del caldo de cultivo se inocularon en 100 ml de medio M410 y se cultivaron a 30°C durante 3 días. El caldo de cultivo se centrifugó y el sobrenadante se filtró utilizando filtros de membrana de 0,2 µm.

15 [0348] **Gel de afinidad de alfa-ciclodextrina.** Diez gramos de polvo de sefarosa 6B activada por epoxi (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, U.K) se suspendieron y se lavaron en agua destilada en un filtro de vidrio sinterizado. El gel se suspendió en solución de acoplamiento (100 ml de de alfa-ciclodextrina 12,5 mg/ml, NaOH 0,5 M) y se incubó a temperatura ambiente durante un día con agitación suave. El gel se lavó con agua destilada en un filtro de vidrio sinterizado, se suspendió en 100 ml de etanolamina 1 M, pH 10, y se incubó a 50°C durante 20 4 horas para el bloqueo. El gel luego se lavó varias veces utilizando 50 mM de Tris-HCl, pH 8 y 50 mM de NaOAc, pH 4.0 alternativamente. El gel finalmente se envasó en una columna de 35-40 ml usando un tampón de equilibrio (NaOAc 50 mM, NaCl 150 mM, pH 4.5).

25 [0349] **Purificación de glucoamilasa a partir de caldo de cultivo.** Se filtró caldo de cultivo de fermentación de *A. niger* MBin118 que contenía el gen de glucoamilasa a través de un filtro de PES de 0,22 µm, y se aplicó en una columna de gel de afinidad de alfa-ciclodextrina previamente equilibrada en 50 mM de NaOAc, 150 mM de NaCl, tampón de pH 4.5. El material no unido se retiró de la columna mediante lavado con tampón de equilibrado y la glucoamilasa se eluyó usando el mismo tampón que contenía 10 mM de beta-ciclodextrina en 3 volúmenes de columna.

30 [0350] La actividad de glucoamilasa del eluyente se controló para comprobar si la glucoamilasa se había ligado al gel de afinidad de alfa-ciclodextrina. La muestra de glucoamilasa purificada luego se dializó contra 20 mM de NaOAc, pH 5.0. La pureza se controló finalmente mediante SDS-PAGE, y solo se descubrió una única banda.

35 **Ejemplo 3: construcción y expresión de una variante dirigida de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum***

[0351] Se realizaron dos reacciones PCR con el plásmido XYZ1471-4, descrito en ejemplo 2, usando cebadores K79V F y K79VR mostrados a continuación, que se prepararon para sustituir la lisina K en la posición 79 de la secuencia madura por valina V y los cebadores F-NP003940 y R-NP003940 mostrados a continuación, que se diseñaron basándose en la secuencia conocida y marcadores añadidos para la clonación directa mediante la estrategia IN-FUSION™.

Cebador K79V F 18mer GCAGTCTTTCCAATTGAC (SEQ ID NO: 7)
 Cebador K79V R 18mer AATTGGAAAGACTGCCCG (SEQ ID NO: 8)
 45 Cebador F-NP003940: 5' ACACAAC TGGGGATCCACCATGCGTCTCACTCTATTATC (SEQ ID NO: 9)
 Cebador R-NP003940: 5' AGATCTCGAGAAGCTTAAACTGCCACACGTCGTTGG (SEQ ID NO: 10)

[0352] La PCR se realizó utilizando un motor de ADN PTC-200 bajo las condiciones descritas a continuación.

Sistema de reacción PCR:	Condiciones:
48,5 micro L de H ₂ O	1 94°C 2 min
2 Perlas puRe Taq Ready-To- GO PCR Beads (Amersham biosciences)	2 94°C 30 seg
Cebadores 0,5micro L X 2100 pmol/micro L	3 55°C 30 seg
(K79V F + cebador R-NP003940; K79V R + Cebador F-NP003940)	4 72°C 90 seg
0,5 Micro L ADN Modelo	2-4 25 ciclos
	5 72°C 10 min

55 [0353] Se recuperaron fragmentos de ADN de gel de agarosa mediante el kit de extracción de gel Qiagen según las instrucciones del fabricante. Los dos fragmentos purificados resultantes se clonaron en un vector de expresión *Aspergillus* linearizado con *Bam*HI e *Hind*III, utilizando kit de clonación IN-FUSION™ Dry-Down PCR Cloning Kit (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. La construcción de

vector linearizado es como se describe en WO 2005/042735 A1.

5 [0354] La mezcla de ligamiento se usó para transformar células de *E. coli* DH5 α (TOYOBO). Se inocularon colonias seleccionadas en 3 ml de medio LB suplementado con 50 μ g de ampicilina por ml y se incubaron a 37°C a 225 r.p.m. durante toda la noche. El ADN plasmídico de las colonias seleccionadas se purificó utilizando el kit de purificación de plásmidos Qiagen plasmid mini kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. La secuencia de genes variante de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* dirigida se verificó antes de la expresión heteróloga y uno de los plásmidos se seleccionó para posterior expresión, y se le denominó pPoPE001.

10 [0355] Se prepararon protoplastos de *Aspergillus niger* MBin118 como se describe en WO 95/02043. Cien μ l de suspensión de protoplastos se mezclaron con 2,5 μ g del plásmido pPoPE001 plásmido y 250 microlitros de PEG 4000 al 60% (Applichem) (polietilenglicol, peso molecular 4,000), 10 mM de CaCl₂, y 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 se añadieron y se mezclaron lentamente. La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos y los protoplastos se mezclaron con 1% de agarosa L (Nippon gen) en placas de sacarosa COVE (COVE, 1996, Biochim. Biophys. Acta 133:51-56) suplementadas con 10 mM de acetamida y 15 mM de CsCl y se añadieron como una capa superior en las placas de sacarosa COVE suplementadas con 10 mM de acetamida y 15 mM de CsCl para la selección de transformantes (4 ml de top agar por placa). Tras la incubación durante 5 días a 37°C, se recogieron esporas de dieciséis transformantes y se sembraron en 750 μ l de medio YP con maltosa al 2 % en placas MT de 96 pocillos profundos. Después de 5 días de cultivo fijo a 30°C, 10 μ l del caldo de cultivo de cada pocillo se analizaron en un gel SDS-PAGE para identificar los mejores transformantes en función de la capacidad para producir una gran cantidad de la glucoamilasa.

Ejemplo 4: purificación de la variante de Po AMG PE001 dirigida

25 [0356] El transformante seleccionado de la variante y la cepa que expresa la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* de tipo salvaje descrito en ejemplo 1 se cultivó en 100 ml de medio YP con maltosa al 2% y el cultivo se filtró a través de un filtro PES de 0,22 μ m, y se aplicó en una columna de gel de afinidad de alfa-ciclodextrina previamente equilibrada en 50 mM de NaOAc, 150 mM de NaCl, tampón de pH 4.5. Los materiales no unidos se retiraron de la columna mediante lavado con tampón de equilibrado y la glucoamilasa se eluyó usando el mismo tampón que contenía 10 mM de beta-ciclodextrina en 3 volúmenes de columna.

30 [0357] La actividad de glucoamilasa del eluyente se controló para comprobar si la glucoamilasa se había ligado al gel de afinidad de alfa-ciclodextrina. Las muestras de glucoamilasa purificada luego se dializaron contra 20 mM de NaOAc, pH 5.0.

Ejemplo 5: caracterización de PE001

Estabilidad de proteasa

40 [0358] 40 μ l de soluciones enzimáticas (1 mg/ml) en tampón de acetato sódico 50 mM , pH 4.5, se mezclaron con un volumen de 1/10 de soluciones de 1mg/ml de proteasa tales como aspergillopepsina I descrita en Biochem J. 1975 Apr; 147(1):45-53. o el producto comercialmente disponible de Sigma y aorsina descrita en Biochemical journal [0264-6021] Ichishima yr:2003 vol:371 iss:Pt 2 pg:541 y se incubaron a 4 o 32°C durante toda la noche. Como experimento de control, se añadió H₂O a la muestra en vez de proteasas. Las muestras se cargaron en SDS-PAGE para ver si las glucoamilasas son degradadas por proteasas.

45 [0359] En SDS-PAGE, PE001 solo mostró una banda correspondiente a la molécula intacta, mientras que la glucoamilasa de tipo salvaje fue degradada por proteasas y mostró una banda de tamaño molecular inferior a 60 kCa.

Tabla 1 El resultado de SDS-PAGE después del tratamiento con proteasa

Proteasa	Glucoamilasa de tipo salvaje				PE001				Control
	aspergillopepsina I		aorsina		aspergillopepsina I		aorsina		
Temperatura de incubación (°C)	4	32	4	32	4	32	4	32	4
Glucoamilasa intacta (ca. 70 KDa)	100%	90%	40%	10%	100%	100%	100 %	100 %	100%
Glucoamilasa degradada (ca. 60 KDa)	N.D.	10%	60%	90%	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
N.D.: no detectado.									

Ejemplo 6: menos degradación durante el cultivo

[0360] El transformante de *Aspergillus* de la variante y la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* de tipo salvaje se cultivaron en placas MT de 6 pocillos que contenían medio YP con maltosa al 2 % diluido 4x suplementado con 10 mM de tampón de acetato sódico, pH4.5, a 32°C durante 1 semana.

[0361] Los sobrenadantes de cultivo se cargaron en SDS-PAGE.

TABLA 2 El resultado de SDS-PAGE de los sobrenadantes de cultivo

	Glucoamilasa de tipo salvaje	PE001
glucoamilasa intacta (ca. 70 KDa)	90%	100%
glucoamilasa degradada (ca. 60 KDa)	10%	N.D.
N.D.: no detectado.		

[0362] La glucoamilasa de tipo salvaje fue degradada por proteasas huésped durante la fermentación, mientras que la variante produjo solo moléculas intactas.

Ejemplo 7: Actividad de glucoamilasa de la variante en comparación con la progenitora

[0363] La actividad de glucoamilasa medida como AGU como se ha descrito anteriormente se controló para las enzimas purificadas de *Penicillium oxalicum* de tipo salvaje y la glucoamilasa variante.

[0364] La unidad de glucoamilasa (AGU) se definió como la cantidad de enzima que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándar (37°C, pH 4.3, sustrato: maltosa 100 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 6 minutos).

Tabla 3

Actividad específica relativa	AGU/mg
peso de <i>Penicillium oxalicum</i>	100%
<i>Penicillium oxalicum</i> PE001 (SEQ ID NO: 3)	102%

Ejemplo 8: purificación de variantes de glucoamilasa con termoestabilidad aumentada

[0365] Las variantes de la invención que muestran una termoestabilidad aumentada se pueden construir y expresar de manera similar al procedimiento descrito en el Ejemplo 3. Todas las variantes según la presente invención fueron derivadas de la PE001 como glucoamilasa progenitora, y descrita en la SEQ ID NO: 3. Después de la expresión en el medio YPM, las variantes que comprendían la sustitución T65A o Q327F fueron micro-purificadas de la siguiente manera:

El micelio se retiró por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. Se añadieron 50 µl de material de columna (alfa-ciclodextrina acoplada a medio de agarosa activada por divinilsulfona Mini-Leak según las recomendaciones del fabricante) a los pocillos de una placa de filtración (Whatman, Unifilter 800 µl, 25- 30 µm MBPP). El material de columna se equilibró con tampón de unión (200 mM de acetato sódico a pH 4.5) mediante la adición, dos veces, de 200 µl de tampón, con agitación intensa durante 10 min (Heidolph, Titramax 101,1000 r.p.m.) y eliminación de tampón por vacío (Whatman, UniVac 3). Posteriormente, se añadieron 400 µl de sobrenadante de cultivo y 100 µl de tampón de unión y la placa se incubó 30 min con agitación intensa. El material no unido se retiró por vacío y se repitió el paso de unión. Normalmente se usaron 4 pocillos por variante. Luego se realizaron tres pasos de lavado con la adición de 200 µl de tampón de fuerza iónica decreciente (50/10/5 mM de acetato sódico, pH 4.5), agitación durante 15 min y eliminación de tampón por vacío. La elución de la AMG ligada se logró mediante la adición, dos veces, de 100 µl de tampón de elución (250 mM de acetato sódico, alfa-ciclodextrina al 0,1% , pH 6.0), agitación durante 15 min y recolección de material eluido en una placa de microtitulación por vacío. Los eluidos agrupados se concentraron y el tampón se cambió a 50 mM de acetato sódico a pH 4.5 usando unidades de filtro centrífugo con orificios de 10 kDa (filtro Millipore Microcon Ultracel YM-10). Las muestras micropurificadas se almacenaron a -18°C hasta la prueba de termoestabilidad.

Ejemplo 9: Análisis del desplegamiento térmico de proteínas (TSA, ensayo de desplazamiento térmico).

[0366] El desplegamiento térmico de proteínas de las variantes T65A y Q327F se observó utilizando Sypro Orange (In-vitrogen; S-6650) y se realizó utilizando un instrumento de PCR en tiempo real (Applied Biosystems; Step-One-Plus).

[0367] En una placa de 96 pocillos, se mezclaron 25 microlitros de muestra micropurificada en 50 mM de acetato pH 4.5 a aprox. 100 microgramos/ml (5:1) con Sypro Orange (concentración resultante = 5X; solución madre de un proveedor = 5000X). La placa se selló con un sello óptico para PCR. El instrumento de PCR se configuró a un índice de exploración de 76 grados C por hora, empezando a 25°C y acabando a 96°C.

[0368] El desplegamiento térmico de proteínas de las variantes E501V + Y504T se observó utilizando Sypro Orange (In-vitrogen; S-6650) y se realizó utilizando un instrumento de PCR en tiempo real (Applied Biosystems; Step-One-Plus).

[0369] En una placa de 96 pocillos, 15 microlitros de muestra purificada en 50 mM de acetato pH4,5 a aprox. 50 microgramos/ml se mezclaron (1:1) con Sypro Orange (concentración resultante = 5X; solución madre de un proveedor = 5000X) con o sin 200 ppm de acarbosa (Sigma A8980). La placa se selló con un sello óptico para PCR. El instrumento de PCR se configuró a un índice de exploración de 76 grados C por hora, empezando a 25°C y acabando a 96°C.

[0370] La fluorescencia se observó cada 20 segundos usando la luz azul LED del propio instrumento para la excitación y ROX-filter (610 nm, emisión).

[0371] Los valores de Tm se calcularon como el valor máximo de la primera derivada (dF/dK) (ref.: Gregory et al; J Biomol Screen 2009 14: 700.)

Tabla 4a

Muestra	Tm (Grados. Celsius) +/-0,4
PO-AMG (PE001)	80,3
Variante Q327F	82,3
Variante T65A	81,9

Tabla 4b

Muestra	Tm (Grados. Celsius) +/-0,4	
Acarbosa:	-	+
PO-AMG (PE001)	79,5	86,9
Variante E501 V Y504T	79,5	95,2

Ejemplo 10: Análisis de termoestabilidad por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

[0372] Variantes adicionales específicas para determinados sitios con sustituciones y /o deleciones en posiciones específicas se construyeron básicamente como se describe en el ejemplo 3 y se purificaron como se describe en el ejemplo 4.

[0373] La termoestabilidad de las variantes derivadas de Po-AMG PE001 purificadas se determinó a pH 4.0 o 4.8 (50 mM de acetato sódico) por calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un calorímetro de barrido diferencial CP-Capillary (MicroCal Inc., Piscataway, NJ, EE. UU.). La temperatura de desnaturalización térmica, Td (°C), se tomó como el valor máximo superior de desnaturalización (valor máximo endotérmico principal) en termogramas (Cp vs. T) obtenido después de calentar soluciones enzimáticas en tampones seleccionados (50 mM de acetato sódico, pH 4.0 o 4.8) a un índice de calentamiento programado constante de 200 K/hora.

[0374] Soluciones de muestra y de referencia (aproximadamente 0,3 ml) se cargaron en el calorímetro (referencia: tampón sin enzima) pasando de condiciones de almacenamiento a 10°C y térmicamente preequilibradas durante 10 minutos a 20°C antes de la exploración por DSC de 20°C a 110°C. Las temperaturas de desnaturalización se determinaron con una exactitud de aproximadamente +/- 1°C.

[0375] Las variantes aisladas y los datos de la DSC se describen en la tabla 5 siguiente.

Tabla 5

Nombre Po-AMG	Mutaciones	DSC Td (°C) a pH 4.0	DSC Td (°C) a pH 4.8
PE001 (SEQ ID NO: 3)		82,1	83,4
PE167	E501V Y504T	82,1	
PE481	T65A K161S	84,1	86,0

ES 2 638 669 T3

PE487	T65A Q405T	83,2	
PE490	T65A Q327W	87,3	
PE491	T65A Q327F	87,7	
PE492	T65A Q327Y	87,3	
PE493	P11 F T65A Q327F	87,8	88,5
PE497	R1K D3W K5Q G7V N8S T10K P11S T65A Q327F	87,8	88,0
PE498	P2N P4S P11 F T65A Q327F	88,3	88,4
PE003	P11 F D26C K33C T65A Q327F	83,3	84,0
PE009	P2N P4S P11 F T65A Q327W E501V Y504T	88,8	
PE002	R1E D3N P4G G6R G7A N8A T10D P11 D T65A Q327F	87,5	88,2
PE005	P11 F T65A Q327W	87,4	88,0
PE008	P2N P4S P11 F T65A Q327F E501V Y504T	89,4	90,2
PE010	P11 F T65A Q327W E501V Y504T		89,7
PE507	T65A Q327F E501V Y504T		89,3
PE513	T65A S105P Q327W		87,0
PE514	T65A S105P Q327F		87,4
PE515	T65A Q327W S364P		87,8
PE516	T65A Q327F S364P		88,0
PE517	T65A S103N Q327F		88,9
PE022	P2N P4S P11 F K34Y T65A Q327F		89,7
PE023	P2N P4S P11 F T65A Q327F D445N V447S		89,9
PE032	P2N P4S P11 F T65A I172V Q327F		88,7
PE049	P2N P4S P11 F T65A Q327F N502*		88,4
PE055	P2N P4S P11 F T65A Q327F N502T P563S K571E		88,0
PE057	P2N P4S P11 F R31 S K33V T65A Q327F N564D K571S		89,5
PE058	P2N P4S P11 F T65A Q327F S377T		88,6
PE064	P2N P4S P11 F T65A V325T Q327W		88,0
PE068	P2N P4S P11 F T65A Q327F D445N V447S E501V Y504T		90,2
PE069	P2N P4S P11 F T65A I172V Q327F E501V Y504T		90,2
PE073	P2N P4S P11 F T65A Q327F S377T E501V Y504T		90,1
PE074	P2N P4S P11 F D26N K34Y T65A Q327F		89,1
PE076	P2N P4S P11 F T65A Q327F I375A E501V Y504T		90,2
PE079	P2N P4S P11 F T65A K218A K221 D Q327F E501V Y504T		90,9
PE085	P2N P4S P11 F T65A S103N Q327F E501V Y504T		91,3
PE086	P2N P4S T10D T65A Q327F E501V Y504T		90,4
PE088	P2N P4S F12Y T65A Q327F E501V Y504T		90,4
PE097	K5A P11 F T65A Q327F E501V Y504T		90,0
PE101	P2N P4S T10E E18N T65A Q327F E501V Y504T		89,9
PE102	P2N T10E E18N T65A Q327F E501V Y504T		89,8
PE084	P2N P4S P11 F T65A Q327F E501V Y504T T568N		90,5
PE108	P2N P4S P11 F T65A Q327F E501V Y504T K524T G526A		88,6
PE126	P2N P4S P11 F K34Y T65A Q327F D445N V447S E501V Y504T		91,8
PE129	P2N P4S P11 F R31 S K33V T65A Q327F D445N V447S E501V Y504T		91,7
PE087	P2N P4S P11 F D26N K34Y T65A Q327F E501V Y504T		89,8
PE091	P2N P4S P11 F T65A F80* Q327F E501V Y504T		89,9
PE100	P2N P4S P11 F T65A K112S Q327F E501V Y504T		89,8
PE107	P2N P4S P11 F T65A Q327F E501V Y504T T516P K524T G526A		90,3
PE110	P2N P4S P11 F T65A Q327F E501V N502T Y504*		90,6

Ejemplo 11: análisis de termoestabilidad por prueba de estrés térmico y ensayo pNPG

[0376] Empezando por una de las variantes de sustitución identificadas del Ejemplo 10, identificada como PE008,

se evaluaron variantes adicionales mediante una prueba de estrés térmico en la que el sobrenadante de cultivos de crecimiento se evaluó para detectar la actividad de glucoamilasa (AMG) después de un choque térmico a 83°C durante 5 min. Después del choque térmico, se midió tanto la actividad residual de la variante como de una muestra no sometida al estrés.

5

Descripción del ensayo de actividad de Po-AMG con pNPG:

[0377] El ensayo de actividad de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* con pNPG es un ensayo de criterio de evaluación espectrométrico donde las muestras se dividen en dos y se miden según criterios de sometida a estrés térmico y no sometida a estrés térmico. Los datos resultantes son, por lo tanto, una medición de actividad residual en las muestras sometidas a estrés.

10

Crecimiento:

[0378] En una placa de microtitulación estéril (MTP) se añadieron 200µL de medio de crecimiento rico (FT X-14 sin Dowfax) en cada pocillo. Las cepas de interés se inocularon por triplicado directamente de injertos congelados en la MTP. Se inoculó el valor de referencia en 20 pocillos. Los pocillos en los que no se inoculó el medio se usaron como blancos del ensayo. La MTP se colocó en una caja de plástico que contenía tejido mojado para evitar la evaporación del contenido de los pocillos durante la incubación. La caja de plástico se puso a 34°C durante 4 días.

15

20

Ensayo:

[0379] 50µL de sobrenadante se transfirieron a 50µL de NaAc de 0,5M a pH 4.8 para obtener un pH de la muestra correcto.

25

Los 50µL de dilución se transfirieron a una placa de PCR y se sometieron a estrés térmico a 83°C durante 5 minutos en una máquina de PCR. La mitad restante de la dilución se mantuvo a temperatura ambiente.

20µL de cada una de las muestras sometida a estrés y no sometida a estrés se transfirieron a una MTP estándar. Se añadieron 20µL de sustrato pNPG al inicio de la reacción. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h.

30

La reacción se detuvo y el color se desarrolló añadiendo 50µL de Na₂CO₃ de 0,5M. El color amarillo se midió en un lector de placas (Molecular Devices) a 405 nm.

Tampones:

35

[0380]

0,5M NaAc pH 4.8

0,25M NaAc pH 4.8

40 Sustrato, 6mM pNPG:

[0381] 15 mg de 4-nitrofenil D-glucopiranosido en 10mL NaAc 0,25 pH 4.8

Parada/desarrollo de la solución:

45

[0382] 0,5M de Na₂CO₃

Tratamiento de datos:

50

[0383] En Excel, los datos no procesados Abs₄₀₅ de ambas muestras sometida y no sometida a estrés se restaron de sus blancos respectivos. La actividad residual (% act. res. = $(Abs_{noestresada} - (Abs_{noestresada} - Abs_{estresada})) / Abs_{noestresada} * 100\%$) se calculó y se fijó con respecto al valor de referencia, Po-amg0008.

55

Tabla 6

Nombre Po-AMG	Mutaciones	% actividad residual
PE008	P2N P4S P11F T65A Q327F E501V Y504T	100
PE085	P2N P4S P11F T65A S103N Q327F E501V Y504T	127
PE097	K5A P11F T65A Q327F E501V Y504T	106
PE107	P2N P4S P11F T65A Q327F E501V Y504T T516P K524T G526A	109
PE130	P2N P4S P11F T65A V79A Q327F E501V Y504T	111
PE131	P2N P4S P11F T65A V79G Q327F E501V Y504T	112
PE132	P2N P4S P11F T65A V79I Q327F E501V Y504T	101

PE133	P2N P4S P11F T65A V79L Q327F E501V Y504T	102
PE134	P2N P4S P11F T65A V79S Q327F E501V Y504T	104
PE150	P2N P4S P11F T65A L72V Q327F E501V Y504T	101
PE155	S255N Q327F E501V Y504T	105

Tabla 7

	Mutaciones	% residual activity
PE008	P2N P4S P11F T65A Q327F E501V Y504T	100
PE179	P2N P4S P11F T65A E74N V79K Q327F E501V Y504T	108
PE180	P2N P4S P11F T65A G220N Q327F E501V Y504T	108
PE181	P2N P4S P11F T65A Y245N Q327F E501V Y504T	102
PE184	P2N P4S P11F T65A Q253N Q327F E501V Y504T	110
PE185	P2N P4S P11F T65A D279N Q327F E501V Y504T	108
PE186	P2N P4S P11F T65A Q327F S359N E501V Y504T	108
PE187	P2N P4S P11F T65A Q327F D370N E501V Y504T	102
PE192	P2N P4S P11F T65A Q327F V460S E501V Y504T	102
PE193	P2N P4S P11F T65A Q327F V460T P468T E501V Y504T	102
PE195	P2N P4S P11F T65A Q327F T463N E501V Y504T	103
PE196	P2N P4S P11F T65A Q327F S465N E501V Y504T	106
PE198	P2N P4S P11F T65A Q327F T477N E501V Y504T	106

5 **Ejemplo 12: Prueba de actividad de glucoamilasa de variantes termoestables según la invención**

10 [0384] Todas las variantes descritas anteriormente que figuran en las tablas 5, 6, y 7 han sido verificadas para detectar actividad de glucoamilasa en los sobrenadantes de cultivo utilizando el ensayo pNPG descrito en el ejemplo 11.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 [0385]

<110> Novozymes A/S

<120> Variantes de glucoamilasa y polinucleótidos que las codifican

20 <130> 12357-WO-PCT

<160> 10

25 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1851

<212> ADN

30 <213> Penicillium oxalicum

<400> 1

atgcgtctca ctctattatc aggtgtagcc ggcgttctct gcgcaggaca gctgacggcg
60

35 gcgcgtcctg atcccaaggg tgggaatctg acgcggttca tccacaaaga gggcgagcgg
120

tcgctccaag gcatcttgga caatctcggg gggcgaggta agaaaacacc cggcactgcc
180

40

ES 2 638 669 T3

gcagggttgt ttattgccag tccaaacaca gagaatccaa actattatta tacatggact
240

5 cgtgactcag ctttgactgc caagtgcttg atcgacctgt tcgaagactc tcgggcagtc
300

tttccaattg accgcaaata cttggaacaa ggaattcggg actacgtgtc gtcccaagca
360

10 atcctccaga gtgtgtctaa tccttctgga accctgaagg atggctctgg tctgggtgaa
420

ccaagtttg agattgacct gaatcccttt tcgggtgcct ggggtcggcc tcagcgggat
480

15 ggcccagcgc tgcgagcgc cgctatgac acctacgcca actacctgat atcccatggt
540

20 cagaaatcgg atgtgtcaca ggtcatgtgg ccgattattg ccaatgatct agcatatggt
600

ggtcaatact ggaataatac cggatttgac ctgtgggaag aggtggatgg gtcaagcttt
660

25 ttcacgattg cgggtccagca ccgagccctt gttgaaggct cgcaactggc gaaaaagctc
720

ggcaagtccct gcgatgcctg tgattctcag cctccccaga tattgtgttt cctgcagagt
780

30 ttctggaacg gaaagtacat cacctccaac atcaacacgc aagcaagccg ctctggatc
840

gacctggact ctgtcctggg aagcattcat acctttgatc ccgaagcagc ctgtgacgat
900

35 gcaactttcc agccttgttc tgcccgcgct ctggcgaacc acaaggtcta tgtggattcc
960

40 ttccgctcta tctacaagat taatgcgggt cttgcagagg gatcggctgc caacgttggc
1020

cgctaccccg aggatgttta ccaaggaggc aatccatggt atctcgccac cctaggcgca
1080

45 tctgaattgc tttacgacgc cttgtaccag tgggacagac ttggcaaact tgaagtctcg
1140

gagacctcgt tgtcattctt caaagacttt gacgcgaccg tgaaaattgg ctcgtactcg
1200

50 aggaacagca agacctacaa gaaattgacc cagtccatca agtcgtacgc ggacgggttc
1260

55 atccagttag tgcagcagta cactccttct aatggatctc tggccgagca atacgatcgc
1320

ES 2 638 669 T3

aatacggctg ctctctctc tgcaaacgat ctgacttggc catttgccctc tttcttgacg
1380

5 gctacgcaac gccgcatgc cgtgggtcct ccctcctggg gcgcaaagtc ggcaaacaaa
1440

gtcccaacca cttgttcagc ctcccctggt gtgggtactt ataaggcgc caccgcaact
1500

10 ttctcatcca agactaagtg cgtccccgct aaagatattg tgcctatcac gttctacctg
1560

attgagaaca cttactatgg agagaacgtc ttcattgagtg gcaacattac tgcgctgggt
1620

15 aactgggacg ccaagaaagg cttcccactc accgcaaacc tctacacgca agatcaaaac
1680

ttgtggttcg ccagtgtcga gttcatcca gcaggcacac cttttgagta caagtactac
20 1740

aaggctcagc ccaatggcga tattacttgg gagaagggtc ccaaccgggt gttcgtcgt
1800

25 cccacgggat gccagttca gcctcactcc aacgacgtgt ggcagttttg a
1851

<210> 2

30 <211> 616
<212> PRT
<213> Penicillium oxalicum

<400> 2

35 Met Arg Leu Thr Leu Leu Ser Gly Val Ala Gly Val Leu Cys Ala Gly
1 5 10 15

40 Gln Leu Thr Ala Ala Arg Pro Asp Pro Lys Gly Gly Asn Leu Thr Pro
20 25 30

45 Phe Ile His Lys Glu Gly Glu Arg Ser Leu Gln Gly Ile Leu Asp Asn
35 40 45

50 Leu Gly Gly Arg Gly Lys Lys Thr Pro Gly Thr Ala Ala Gly Leu Phe
50 55 60

Ile Ala Ser Pro Asn Thr Glu Asn Pro Asn Tyr Tyr Tyr Thr Trp Thr
65 70 75 80

55 Arg Asp Ser Ala Leu Thr Ala Lys Cys Leu Ile Asp Leu Phe Glu Asp
85 90 95

ES 2 638 669 T3

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

ES 2 638 669 T3

Phe Arg Ser Ile Tyr Lys Ile Asn Ala Gly Leu Ala Glu Gly Ser Ala
 325 330 335
 5
 Ala Asn Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Gln Gly Gly Asn Pro
 340 345 350
 10 Trp Tyr Leu Ala Thr Leu Gly Ala Ser Glu Leu Leu Tyr Asp Ala Leu
 355 360 365
 15 Tyr Gln Trp Asp Arg Leu Gly Lys Leu Glu Val Ser Glu Thr Ser Leu
 370 375 380
 20 Ser Phe Phe Lys Asp Phe Asp Ala Thr Val Lys Ile Gly Ser Tyr Ser
 385 390 395 400
 Arg Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Lys Leu Thr Gln Ser Ile Lys Ser Tyr
 405 410 415
 25 Ala Asp Gly Phe Ile Gln Leu Val Gln Gln Tyr Thr Pro Ser Asn Gly
 420 425 430
 30 Ser Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Arg Asn Thr Ala Ala Pro Leu Ser Ala
 435 440 445
 35 Asn Asp Leu Thr Trp Ser Phe Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Gln Arg
 450 455 460
 40 Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Ser Trp Gly Ala Lys Ser Ala Asn Lys
 465 470 475 480
 Val Pro Thr Thr Cys Ser Ala Ser Pro Val Val Gly Thr Tyr Lys Ala
 485 490 495
 45 Pro Thr Ala Thr Phe Ser Ser Lys Thr Lys Cys Val Pro Ala Lys Asp
 500 505 510
 50 Ile Val Pro Ile Thr Phe Tyr Leu Ile Glu Asn Thr Tyr Tyr Gly Glu
 515 520 525
 55 Asn Val Phe Met Ser Gly Asn Ile Thr Ala Leu Gly Asn Trp Asp Ala
 530 535 540

ES 2 638 669 T3

Lys Lys Gly Phe Pro Leu Thr Ala Asn Leu Tyr Thr Gln Asp Gln Asn
 545 550 555 560

5 Leu Trp Phe Ala Ser Val Glu Phe Ile Pro Ala Gly Thr Pro Phe Glu
 565 570 575

10 Tyr Lys Tyr Tyr Lys Val Glu Pro Asn Gly Asp Ile Thr Trp Glu Lys
 580 585 590

15 Gly Pro Asn Arg Val Phe Val Ala Pro Thr Gly Cys Pro Val Gln Pro
 595 600 605

His Ser Asn Asp Val Trp Gln Phe
 610 615

20
 <210> 3
 <211> 595
 <212> PRT
 <213> Penicillium oxalicum

25
 <400> 3

30 Arg Pro Asp Pro Lys Gly Gly Asn Leu Thr Pro Phe Ile His Lys Glu
 1 5 10 15

Gly Glu Arg Ser Leu Gln Gly Ile Leu Asp Asn Leu Gly Gly Arg Gly
 20 25 30

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

40 Thr Glu Asn Pro Asn Tyr Tyr Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Ala Leu
 50 55 60

45 Thr Ala Lys Cys Leu Ile Asp Leu Phe Glu Asp Ser Arg Ala Val Phe
 65 70 75 80

50 Pro Ile Asp Arg Lys Tyr Leu Glu Thr Gly Ile Arg Asp Tyr Val Ser
 85 90 95

Ser Gln Ala Ile Leu Gln Ser Val Ser Asn Pro Ser Gly Thr Leu Lys
 100 105 110

55 Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu Ile Asp Leu Asn Pro
 115 120 125

ES 2 638 669 T3

Phe Ser Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg
 130 135 140
 5
 Ala Thr Ala Met Ile Thr Tyr Ala Asn Tyr Leu Ile Ser His Gly Gln
 145 150 155 160
 10
 Lys Ser Asp Val Ser Gln Val Met Trp Pro Ile Ile Ala Asn Asp Leu
 165 170 175
 15
 Ala Tyr Val Gly Gln Tyr Trp Asn Asn Thr Gly Phe Asp Leu Trp Glu
 180 185 190
 20
 Glu Val Asp Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile Ala Val Gln His Arg Ala
 195 200 205
 25
 Leu Val Glu Gly Ser Gln Leu Ala Lys Lys Leu Gly Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 30
 Ala Cys Asp Ser Gln Pro Pro Gln Ile Leu Cys Phe Leu Gln Ser Phe
 225 230 235 240
 35
 Trp Asn Gly Lys Tyr Ile Thr Ser Asn Ile Asn Thr Gln Ala Ser Arg
 245 250 255
 40
 Ser Gly Ile Asp Leu Asp Ser Val Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp
 260 265 270
 45
 Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp Ala Thr Phe Gln Pro Cys Ser Ala Arg
 275 280 285
 50
 Ala Leu Ala Asn His Lys Val Tyr Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr
 290 295 300
 55
 Lys Ile Asn Ala Gly Leu Ala Glu Gly Ser Ala Ala Asn Val Gly Arg
 305 310 315 320
 Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Gln Gly Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Ala Thr
 325 330 335
 Leu Gly Ala Ser Glu Leu Leu Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp Arg
 340 345 350

ES 2 638 669 T3

Leu Gly Lys Leu Glu Val Ser Glu Thr Ser Leu Ser Phe Phe Lys Asp
 355 360 365
 5
 Phe Asp Ala Thr Val Lys Ile Gly Ser Tyr Ser Arg Asn Ser Lys Thr
 370 375 380
 10
 Tyr Lys Lys Leu Thr Gln Ser Ile Lys Ser Tyr Ala Asp Gly Phe Ile
 385 390 395 400
 15
 Gln Leu Val Gln Gln Tyr Thr Pro Ser Asn Gly Ser Leu Ala Glu Gln
 405 410 415
 20
 Tyr Asp Arg Asn Thr Ala Ala Pro Leu Ser Ala Asn Asp Leu Thr Trp
 420 425 430
 25
 Ser Phe Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Gln Arg Arg Asp Ala Val Val
 435 440 445
 30
 Pro Pro Ser Trp Gly Ala Lys Ser Ala Asn Lys Val Pro Thr Thr Cys
 450 455 460
 35
 Ser Ala Ser Pro Val Val Gly Thr Tyr Lys Ala Pro Thr Ala Thr Phe
 465 470 475 480
 40
 Ser Ser Lys Thr Lys Cys Val Pro Ala Lys Asp Ile Val Pro Ile Thr
 485 490 495
 45
 Phe Tyr Leu Ile Glu Asn Thr Tyr Tyr Gly Glu Asn Val Phe Met Ser
 500 505 510
 50
 Gly Asn Ile Thr Ala Leu Gly Asn Trp Asp Ala Lys Lys Gly Phe Pro
 515 520 525
 55
 Leu Thr Ala Asn Leu Tyr Thr Gln Asp Gln Asn Leu Trp Phe Ala Ser
 530 535 540
 Val Glu Phe Ile Pro Ala Gly Thr Pro Phe Glu Tyr Lys Tyr Tyr Lys
 545 550 555 560
 Val Glu Pro Asn Gly Asp Ile Thr Trp Glu Lys Gly Pro Asn Arg Val
 565 570 575

ES 2 638 669 T3

Phe Val Ala Pro Thr Gly Cys Pro Val Gln Pro His Ser Asn Asp Val
580 585 590

5 Trp Gln Phe
595

10 <210> 4
<211> 25
<212> ADN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Cebador PCR

<400> 4
atgCGTctca ctctattatc aggtg
25

20

<210> 5
<211> 39
<212> ADN
25 <213> Artificial

<220>
<223> Cebador PCR

30 <400> 5
acacaactgg ggatccacca tgcgtctcac tctattatc
39

35 <210> 6
<211> 37
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Cebador PCR

<400> 6
agatctcgag aagcttaaaa ctgccacacg tcggttg
45 37

<210> 7
<211> 18
50 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador PCR

55 <400> 7

ES 2 638 669 T3

gcagtctttc caattgac
18

5 <210> 8
<211> 18
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Cebador PCR

<400> 8
aattggaaag actgcccg
15 18

<210> 9
<211> 39
20 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Cebador PCR

25 <400> 9
acacaactgg g gatccacca tgcgtctcac tctattatc
39

30 <210> 10
<211> 37
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> Cebador PCR

<400> 10
40 agatctcgag aagcttaaaa ctgccacacg tcgttgg
37

REIVINDICACIONES

- 5 1. Variante de glucoamilasa con termoestabilidad mejorada en comparación con la proteína con la SEQ.ID.3, que comprende una sustitución en dos posiciones correspondientes a la sustitución de Thr en la posición 65 y la sustitución de Gin en la posición 327 del polipéptido de la SEQ ID NO: 3, donde la variante tiene actividad de glucoamilasa y donde la variante tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID NO: 3.
- 10 2. Variante de la reivindicación 1, seleccionada del grupo consistente en:
- 15 a) un polipéptido con al menos 85% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID NO: 3;
b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 85% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1; y
c) un fragmento del polipéptido de la SEQ ID NO: 3, que tiene actividad de glucoamilasa.
- 20 3. Variante de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la variante tiene al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID NO: 3.
- 25 4. Variante de cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la variante es codificada por un polinucleótido con al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1.
- 30 5. Variante de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el número de sustituciones es de 1-20, por ejemplo, 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones.
- 35 6. Variante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende una sustitución o delección en al menos una posición seleccionada de la posición 501, 504 de la SEQ ID NO: 3.
- 40 7. Variante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la variante comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo consistente en T65A, Q327F, E501V, Y504T, Y504*.
- 45 8. Variante de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la variante comprende al menos una de las siguientes sustituciones o combinaciones de sustituciones:
- 50 T65A + Q327F; o
T65A + Q327F + E501V; o
T65A + Q327F + Y504T; o
T65A + Q327F + Y504*; o
T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
T65A + Q327F + E501V + Y504*.
- 55 9. Variante de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la variante comprende al menos una de las siguientes combinaciones de sustituciones:
- 60 T65A + Q327W;
T65A + Q327F;
T65A + Q327Y;
P11F + T65A + Q327F;
R1 K + D3W + K5Q + G7V + N8S + T10K + P11 S + T65A + Q327F;
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F;
P11 F + D26C + K33C + T65A + Q327F;
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327W + E501V + Y504T;
R1 E + D3N + P4G + G6R + G7A + N8A + T10D+ P11 D + T65A + Q327F;
P11 F + T65A + Q327W;
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
P11 F + T65A + Q327W + E501V + Y504T;
T65A + Q327F + E501V + Y504T;
T65A + S105P + Q327W;
T65A + S105P + Q327F;
T65A + Q327W + S364P;
T65A + Q327F + S364P;
T65A + S103N + Q327F;
P2N + P4S + P11 F + K34Y + T65A + Q327F;
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + D445N + V447S;
P2N + P4S + P11 F + T65A + 1172V + Q327F;
- 65

- 5
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + N502*;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + N502T + P563S + K571 E;
 P2N + P4S + P11F + R31S + K33V + T65A + Q327F + N564D + K571S;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + S377T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + V325T+ Q327W;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + D445N + V447S + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11F + T65A + I172V + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + S377T + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + D26N + K34Y + T65A + Q327F;
 10
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + I375A + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + K218A + K221 D + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + S103N + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + T10D + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + F12Y + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 15
 K5A + P11F + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + T10E + E18N + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + T10E + E18N + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + T568N;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + K524T + G526A;
 20
 P2N + P4S + P11 F + K34Y + T65A + Q327F + D445N + V447S + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + R31S + K33V + T65A + Q327F + D445N + V447S + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + D26N + K34Y + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + F80* + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + K112S + Q327F + E501V + Y504T;
 25
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + T516P + K524T + G526A;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + N502T + Y504*;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + S103N + Q327F + E501V + Y504T;
 K5A + P 11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T;
 30
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + T516P + K524T + G526A;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + V79A + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + V79G + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + V79I + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + V79L + Q327F + E501V + Y504T;
 35
 P2N + P4S + P11 F + T65A + V79S + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + L72V + Q327F + E501V + Y504T;
 S255N + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + E74N + V79K + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + G220N + Q327F + E501V + Y504T;
 40
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Y245N + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q253N + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + D279N + Q327F + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + S359N + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + D370N + E501V + Y504T;
 45
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + V460S + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + V460T + P468T + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + T463N + E501V + Y504T;
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + S465N + E501V + Y504T; o
 P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + T477N + E501V + Y504T.

- 50
 10. Composición que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
- 55
 11. Composición según la reivindicación 10, que incluye una alfa-amilasa y un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-9.
- 60
 12. Uso de un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para la producción de jarabe y/o de un producto de fermentación.
- 65
 13. Proceso de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón, que incluye los pasos de:
- (a) licuefacción de material que contiene almidón en presencia de una alfa amilasa;
 - (b) sacarificación del material licuado; y
 - (c) fermentación con un organismo fermentador;

donde el paso (a) y/o el paso (b) se realiza(n) usando al menos una glucoamilasa de cualquiera de las

reivindicaciones 1-9.

14. Proceso de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón, que incluye los pasos de:

5

- (a) sacarificación de material que contiene almidón a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho material que contiene almidón; y
- (b) fermentación con un organismo fermentador,

10

donde el paso (a) se realiza usando al menos una glucoamilasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

15. Polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-9.

15

16. Célula huésped recombinante que comprende el polinucleótido de la reivindicación 15 operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido.

17. Método de producción de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende:

20

- (a) cultivar la célula huésped de la reivindicación 16 bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
- (b) recuperar el polipéptido.