

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 656 556**

51 Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)
C13K 1/06 (2006.01)
C12N 9/34 (2006.01)
C12P 7/14 (2006.01)
C12C 5/00 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2012 PCT/US2012/053779**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.03.2013 WO13036526**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2012 E 12761850 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2748315**

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

30 Prioridad:

06.09.2011 US 201161531189 P
02.12.2011 US 201161566046 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2018

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (50.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK y
NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

MATSUI, TOMOKO y
CLARK, SUZANNE

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 656 556 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 codifican las mismas

5 Referencia a un listado de secuencias

[0001] Esta aplicación contiene un listado de secuencias de forma legible por ordenador.

Antecedentes de la invención

10

Campo de la invención

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

15

Descripción de las técnicas relacionadas

[0003] La glucoamilasa (1,4-alfa-D-glucan glucohidrolasa, EC 3,2,1,3) es una enzima, que cataliza la liberación de D-glucosa de las extremidades no-reducidas de almidón o moléculas de oligo y polisacáridas relacionadas.

20

Las glucoamilasas se producen por diferentes hongos filamentosos y levadura, con aquellas de *Aspergillus* siendo comercialmente más importantes.

[0004] Comercialmente, las glucoamilasas se utilizan para convertir almidón, que es ya parcialmente hidrolizado por una alfa-amilasa a glucosa.

25

La glucosa puede luego ser convertida directa o indirectamente en un producto de fermentación utilizando un organismo fermentador.

Los ejemplos de productos de fermentación comerciales incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol, 1,3-propanediol), ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, gluconato, ácido láctico, 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 con, 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.

30

Los procesos de fermentación son también comúnmente usados en el alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), industrias lácteas (por ejemplo, en la producción de yogur y queso).

35

[0005] El producto final también puede ser jarabe.

Por ejemplo, el producto final pueden ser de glucosa, pero también puede ser convertido, por ejemplo, por glucosa isomerasa a fructosa o una mezcla compuesta casi igualmente de glucosa y fructosa.

40

Esta mezcla o una mezcla además enriquecida con fructosa es el jarabe de maíz rico en fructosa usado más frecuentemente (HFCS) comercializado en todo el mundo.

[0006] Es un objeto de la presente invención proporcionar polipéptidos con actividad de glucoamilasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos y que proporciona un alto rendimiento en los procesos de producción de producto de fermentación, tales como procesos de producción de etanol, que incluyen una única fase de procesos de fermentación de etanol de almidón crudo no gelatinizado (o sin cocer).

45

La solicitud de patente divisional, WO 2011/127802, divulga una glucoamilasa 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] La presente invención se refiere a una variante de glucoamilasa, que comprende una sustitución al menos en una posición que corresponde con posiciones 79 del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2, donde la variante tiene actividad de glucoamilasa y donde la variante se selecciona del grupo que consiste en:

55

a) un polipéptido con al menos 85% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2;

60

b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 85% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1; y

c) un fragmento del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2, que tiene actividad de glucoamilasa.

[0009] En otro aspecto la presente invención se refiere a un dominio catalítico de glucoamilasa variante que comprende una sustitución al menos en una posición que corresponde con la posición 79 del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 y donde la variante se selecciona del grupo que consiste en:

65

(a) un dominio catalítico con al menos 85% de identidad de secuencia con aminoácidos a aminoácidos 30 a 494 de la SEQ ID N.º: 2;

(b) un dominio catalítico codificado por un polinucleótido con al menos 85% de identidad de secuencia con (i) nucleótidos 88 a 1482 de la SEQ ID N.º: 1; y donde la variante tiene actividad de glucoamilasa.

5

[0010] En otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende los polipéptidos de la invención.

10

[0011] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican las variantes; constructos de ácidos nucleicos, vectores y células huésped que comprenden los polinucleótidos; y métodos de producción de las variantes.

15

[0012] La presente invención también se refiere a métodos del uso de los polipéptidos de la invención en la producción de jarabe y/o un producto de fermentación.

Definiciones

20

[0013] La glucoamilasa: el término glucoamilasa (1,4-alfa-D-glucan glucohidrolasa, EC 3,2,1,3) se define como una enzima, que cataliza la liberación de D-glucosa desde las extremidades no-reducidas de almidón o moléculas de oligo y polisacáridas relacionadas.

Para fines de la presente invención, la actividad de glucoamilasa se determina según el procedimiento descrito en la sección de aquí 'Materiales y métodos'.

25

[0014] 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% y de la forma más preferible al menos 100% de la actividad de glucoamilasa del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

30

[0015] La variante alélica: el término "variante alélica" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico.

La variación alélica surge naturalmente a través de mutación y puede resultar en el polimorfismo dentro de poblaciones.

35

Las mutaciones de gen pueden ser silenciosas (ningún cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas.

Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

40

[0016] El ADNc: el término "ADNc" significa una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm empalmada madura obtenida de una célula eucariótica o procariótica. El ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. La transcripción de ARN inicial primaria es un precursor para ARNm que se procesa a través de una serie de pasos que incluyen empalme, antes de aparecer como ARNm empalmado maduro.

45

[0017] 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.

50

[0018] Secuencias de control: el término "secuencias de control" significa secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención.

55

Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, desde el mismo gen) o foránea (es decir, a partir de un gen diferente) al polinucleótido que codifica la variante o nativa o foránea a cada una.

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 transcripcionales y traslacionales.

60

Las secuencias de control pueden estar previstas con enlaces con motivo de introducir sitios de restricción específicos que faciliten el ligamiento de las secuencias de control con la región de codificación del polinucleótido que codifica una variante.

[0019] Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de una variante que incluye, pero no está limitada a transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraducciona y secreción.

5 [0020] 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 proveen para su expresión.

10 [0021] Fragmento: el término "fragmento" significa un polipéptido que tiene uno o más (por ejemplo; diferentes) aminoácidos ausente 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, aminoácidos 30 a 494 de la SEQ ID N.º: 2).

15 [0022] Condiciones de astringencia altas: el término "condiciones de astringencia altas" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos en longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado y 50% de formamida, seguido de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas.

20 El material portador es finalmente lavado tres veces, cada vez durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 65°C.

[0023] Célula huésped: el término "célula huésped" significa cualquier tipo celular que sea susceptible de transformación, transfección, transducción o similar con un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención.

25 El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no sea idéntico a la célula madre debido a mutaciones que se producen durante la replicación.

[0024] Propiedad mejorada: el término "propiedad mejorada" significa una característica asociada con una variante que está mejorada en comparación con la progenitora.

30 Tales propiedades mejoradas incluyen, pero de forma no limitativa, estabilidad mejorada con respecto a la degradación o corte por proteasas huéspedes.

La estabilidad mejorada es equivalente a sensibilidad reducida.

35 Preferiblemente, la sensibilidad se reduce por al menos 10%, preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 30%, 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%.

40 [0025] Aislado: el término "aislado" significa una sustancia en una forma o ambiente que no se produce en la naturaleza.

Ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no se produzca de forma natural, (2) cualquier sustancia que incluya, pero no esté limitada a, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que esté al menos parcialmente eliminado de uno o más o todos los constituyentes de origen natural con los cuales se asocia en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por la mano del hombre con respecto a aquella 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.

55 [0026] Condiciones de astringencia bajas: el término "condiciones de astringencia bajas" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos en longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado y 25% de formamida, seguida procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas.

El material portador es finalmente lavado tres veces, cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 50°C.

60 [0027] Polipéptido maduro: el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final seguido de traducción y cualquier modificación postraducciona, tal como un tratamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro es aminoácidos 22 a 616 de la SEQ ID N.º: 2 basado 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 N.º: 2 son un péptido señal.

65 Se conoce en la técnica que una célula huésped puede producir una mezcla de dos de más polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un aminoácido C-terminal diferente y/o N-terminal) expresado por el mismo polinucleótido.

[0028] Secuencia codificante del polipéptido maduro: el término "secuencia codificante del polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro con actividad de glucoamilasa.

En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es nucleótidos 64 a 1848 de la SEQ ID N.º: 1 basada en el SignalP (Nielsen et al., 1997, *supra*) que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID N.º: 1 codifican un péptido señal.

[0029] Condiciones de astringencia media: el término "condiciones de astringencia media" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos en longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado y 35% de formamida, seguido de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas.

El material portador es finalmente lavado tres veces, cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 55°C.

[0030] Condiciones de astringencia medio altas: el término "condiciones de astringencia medio altas" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos en longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado y alguno de 35% de formamida, seguido de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas.

El material portador es finalmente lavado tres veces, cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 60°C.

[0031] Mutante: el término "mutante" significa un polinucleótido que codifica una variante.

[0032] Constructo de ácidos nucleicos: el término "constructo de ácidos nucleicos" significa una molécula de ácido nucleico, bien uni- o bicatenaria, que está aislada de un gen de origen natural o se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de manera que de otro modo no existirían en la naturaleza o que sea sintético, el cual que comprende una o más secuencias de control.

[0033] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca a una posición apropiada relativa a la secuencia de codificación de un polinucleótido tal que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante.

[0034] Progenitor o glucoamilasa progenitora: el término "progenitor" o "glucoamilasa parental" significa una glucoamilasa a la que una alteración está hecha 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. En una forma de realización, la glucoamilasa progenitora es el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

[0035] Identidad de secuencia: la relación entre dos secuencias de aminoácido o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad de secuencia".

[0036] 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 se ha 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 espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0.5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62).

El resultado de Needle marcado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

$(\text{residuos idénticos} \times 100) / (\text{longitud de alineamiento} - \text{número total de espacios en el alineamiento})$

[0037] Para fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias desoxirribonucleótidas se determina utilizando el algoritmo Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) como se ha implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, *supra*), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior.

Los parámetros usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0.5 y la matriz de sustitución EADNFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4).

El resultado de Needle marcado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como el identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

$(\text{deoxirribonucleótidos idénticos} \times 100) / (\text{longitud de alineamiento} - \text{número total de espacios en el alineamiento})$

[0038] Subsecuencia: el término "subsecuencia" significa un polinucleótido con uno o más (por ejemplo; diferentes) nucleótidos ausentes del terminal 5' y/o 3' de una secuencia codificante del polipéptido maduro; donde la subsecuencia codifica un fragmento con actividad de glucoamilasa.

En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos 1395 nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos 88 a 1482 de la SEQ ID N.º: 1)

[0039] Variante: el término "variante" significa un polipéptido con actividad de glucoamilasa que incluye una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o delección a una o más posiciones (por ejemplo; diferentes).

Una sustitución significa el remplazo del aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una delección significa la eliminación del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa la adición de un aminoácido adyacente a e inmediatamente después 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 N.º: 2.

[0040] Condiciones de astringencia muy altas: el término "condiciones de astringencia muy altas" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos en longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado y 50% de formamida, seguida de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas.

El material portador es finalmente lavado tres veces, cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 70°C.

[0041] Condiciones de astringencia muy bajas: el término "condiciones de astringencia muy bajas" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos en longitud, prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0.3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 25% de formamida, procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas.

El material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 45°C.

[0042] Glucoamilasa tipo salvaje: el término glucoamilasa "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 designación de variantes

[0043] Para fines de la presente invención, el polipéptido maduro comprendido en la SEQ ID N.º: 2 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 aminoácidos 22 a 616 de SEQ ID N.º: 2 y basado en el alineamiento, el número de posición de aminoácido que corresponde con cualquier residuo de aminoácido en el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID N.º: 2 se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se ha 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 versión 5.0.0 o posterior.

Los parámetros usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0.5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62).

Por consiguiente, si por ejemplo, la variante tiene una sustitución en la posición 79, esta corresponde a la posición 100 en el polipéptido de longitud total descrito como la SEQ ID N.º: 2, ya que los aminoácidos 1-21 es el péptido señal y la posición 22 corresponderá a la posición 1 en el polipéptido maduro.

[0044] La identificación del residuo de aminoácido correspondiente en otra glucoamilasa se puede determinar por un alineamiento de secuencias polipeptídicas múltiples usando diferentes programas informáticos que incluyen, pero no están limitados a MUSCLE (comparación de secuencia múltiple por log-expectativa; versión 3.5 o posterior; 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 and 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.

[0045] Cuando la otra enzima ha divergido desde el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de manera que la comparación basada en la secuencia tradicional falla al detectar su relación (Lindahl y Elofsson, 2000, J. Mol. Biol. 295: 613-615), se pueden usar otros algoritmos de comparación de secuencia de pares.

La sensibilidad superior en la búsqueda basada en secuencia se puede lograr utilizando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de familias de polipéptido (perfiles) para buscar bases de datos.

Por ejemplo, el programa PSI-BLAST genera perfiles a través de un proceso de búsqueda de base de datos reiterativo y es capaz de detectar homólogos remotos (Atschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402).

Incluso se puede conseguir una sensibilidad superior si la familia o superfamilia para el polipéptido tiene uno o más representativos en las bases de datos de estructura de proteína.

Los programas tales como GenTHREADER (Jones, 1999, J. Mol. Biol. 287: 797-815; McGuffin y Jones, 2003, Bioinformatics 19: 874-881) utilizan información de una variedad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de estructura secundaria, 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, se puede utilizar para alinear una secuencia de estructura desconocida con los modelos de superfamilia presentes en la base de datos SCOP.

Estos alineamientos pueden sucesivamente ser usados para generar modelos de homología para el polipéptido y tales modelos se pueden evaluar para exactitud utilizando una variedad de herramientas desarrolladas para tal fin.

[0046] Para proteínas de estructura conocida, diferentes herramientas y recursos están disponibles para recuperación y generación de alineamientos estructurales.

Por ejemplo, las superfamilias SCOP de proteínas han sido estructuralmente alineadas y aquellos alineamientos son accesibles y descargables.

Dos o más estructuras de proteína 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) e implementación de estos algoritmos también se puede utilizar adicionalmente para interrogar bases de datos de estructura con una estructura de interés para descubrir posibles homólogos estructurales (por ejemplo, Holm and Park, 2000, Bioinformatics 16: 566-567).

[0047] Al describir las variantes de la presente invención, la nomenclatura descrita a continuación está adaptada para mayor facilidad de referencia.

Se usa la abreviatura de aminoácidos aceptada única IUPAC de una o tres letras.

[0048] Sustituciones. Para una sustitución de aminoácido, se usa la nomenclatura siguiente: aminoácido progenitor, posición, aminoácido sustituido.

Por consiguiente, la sustitución de treonina en la posición 226 con alanina se designa como "Thr226Ala" o "T226A". Mutaciones múltiples se separan por signos de suma ("+"), 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.

[0049] Delecciones. Para una delección de aminoácido, se usa la nomenclatura siguiente: aminoácido original, posición, *. Por consiguiente, la delección de glicina en la posición 195 se designa como "Gly195*" o "G195*". Delecciones múltiples se separan por signos de suma ("+"), por ejemplo, "Gly195* + Ser411*" o "G195* + S411*".

[0050] Inserciones. Para una inserción de aminoácido, se usa la siguiente nomenclatura: aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado.

Por consiguiente, la inserción de lisina después de glicina en la posición 195 se designa "Gly195GlyLys" o "G195GK". Una inserción de aminoácidos múltiples se designa "aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado #1, aminoácido insertado #2"; etc. Por ejemplo, la inserción de lisina y alanina después de glicina en la posición 195 se indica como "Gly195GlyLysAla" o "G195GKA".

[0051] En tales casos, el residuo(s) de aminoácido insertado se numera(n) por la adición de letras minúsculas al número de posición del residuo de aminoácido precedente al residuo(s) de aminoácido insertado.

En el ejemplo anterior, la secuencia así sería:

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

[0052] Alteraciones múltiples. Las variantes que comprenden alteraciones múltiples se separan por signos de adición ("+"), por ejemplo, "Arg170Tyr+Gly195Glu" o "R170Y+G195E" que representan una sustitución de arginina y glicina a posiciones 170 y 195 con tirosina y ácido glutámico, respectivamente.

[0053] Alteraciones diferentes. Donde se pueden introducir alteraciones diferentes a 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, "Tir167Gli, Ala + Arg170Gly, Ala" designa las variantes siguientes:

"Tyr167Gly+Arg170Gly", "Tyr167Gly+Arg170Ala", "Tyr167Ala+Arg170Gly" y "Tyr167Ala+Arg170Ala".

Descripción detallada de la invención

5 [0054] La presente divulgación se refiere a variantes de glucoamilasa aisladas, que comprenden una sustitución al menos en una posición que corresponde con la posición 79, del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2, donde la variante tiene actividad de glucoamilasa.

Variantes

10 [0055] La presente divulgación también proporciona variantes de glucoamilasa, que comprenden una sustitución al menos en una posición que corresponde con posiciones 79 del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2, donde la variante tiene actividad de glucoamilasa.

Las variantes según la divulgación tienen sensibilidad reducida para degradación de proteasa .

15 [0056] En otra forma de realización, la variante es seleccionada del grupo que consiste en:

- a) un polipéptido con al menos 85% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2;);
- b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 85% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1; y
- c) un fragmento del polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2, que tiene actividad de glucoamilasa.

20 [0057] En una forma de realización, la variante tiene una identidad de secuencia de 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%, a la secuencia de aminoácidos de la glucoamilasa progenitora madura.

25 [0058] En otra forma de realización, la variante tiene 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 con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

30 [0059] En un aspecto, el número de alteraciones en las variantes de la presente invención es 1-20, por ejemplo, 1-10 y 1-5, tal como alteraciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9 o 10.

35 [0060] En otro aspecto de la divulgación, la variante se codifica por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de astringencia muy bajas, condiciones de astringencia bajas, condiciones de astringencia medias, condiciones de astringencia medio altas, condiciones de astringencia altas o condiciones de astringencia muy altas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, o (ii) el complemento en toda su longitud de (i) (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York).

40 [0061] En otro aspecto, la variante se codifica 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 N.º: 1.

45 [0062] En otro aspecto, la variante comprende o consta de una sustitución en una posición que corresponde con la posición 79.

En otro aspecto, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 79 se sustituye con Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, gln Glu, Gly, su, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val.

En otro aspecto, el aminoácido en una posición que corresponde con la posición 79 se sustituye con Ala, Gly, Ile, Leu, Ser, Thr, Val, preferiblemente Val.

50 En otro aspecto, la variante comprende o consiste en la sustitución seleccionada de K79V, K79A, K79G, K79I, K79L, K79S, K79T del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, la variante comprende o consiste en la sustitución K79V del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2. En otra forma de realización específica, el polipéptido de variante madura consiste en la SEQ ID N.º: 3.

55 [0063] Las variantes pueden comprender además una o más sustituciones adicionales a una o más otras posiciones (por ejemplo; varias).

60 [0064] Los cambios en los aminoácidos pueden ser de una naturaleza menor, es decir sustituciones de aminoácidos o inserciones conservadoras que significativamente no afecten al plegado y/o actividad de la proteína; deleciones pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; extensiones pequeñas amino o carboxilo terminales, tales como un residuo de metionina aminoterminal; un péptido enlazador pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación por carga de red de cambio u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epitopo antigénico o un dominio de unión.

- [0065] Los ejemplos de sustituciones conservadoras son 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).
- 5 Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en H. Neurath and R.L. Hill, 1979, In, *The Proteins*, Academic Press, New York. Las 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.
- 10 [0066] Alternativamente, los cambios en los aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físico químicas de los polipéptidos se alteran. Por ejemplo, los cambios en los aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, después de alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo y similar.
- 15 [0067] Los aminoácidos esenciales en un polipéptido se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En la técnica anterior, las mutaciones de alanina únicas se introducen en cada residuo en la molécula y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de glucoamilasa para identificar residuos de
- 20 aminoácidos que son críticos a la actividad de la molécula. Ver también, Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica puede también ser determinado por análisis físico de estructura, como se ha determinado por tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con la mutación de aminoácidos de sitio de
- 25 contacto putativo. Ver, por ejemplo, de Vos et al., 1992, *Science* 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 aminoácidos esenciales también puede ser inferida a partir de un alineamiento con un polipéptido relativo.
- 30 [0068] En una forma de realización, las variantes pueden consistir en al menos el dominio catalítico de 465 aminoácidos, por ejemplo aminoácidos 30 a 494 en la glucoamilasa progenitora mostrada como la SEQ ID N.º: 2.
- [0069] Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un dominio catalítico de glucoamilasa variante
- 35 que comprende una sustitución al menos en una posición que corresponde con posiciones 79 del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2, donde la variante tiene actividad de glucoamilasa.
- [0070] El dominio catalítico de glucoamilasa variante puede en una forma de realización ser seleccionado del grupo que consiste en:
- 40 (a) un dominio catalítico con al menos 85% de identidad de secuencia con aminoácidos 30 a 494 de la SEQ ID N.º: 2;
- (b) un dominio catalítico codificado por un polinucleótido con al menos 85% de nucleótidos (i) de identidad de secuencia con 88 a 1482 de la SEQ ID N.º: 1; y donde el dominio catalítico tiene actividad de glucoamilasa.
- 45 [0071] En un aspecto el dominio catalítico se puede considerar que incluye la región enlazadora de aminoácidos 495 a 506 de la SEQ ID N.º: 2. Aminoácidos 507 a 615 de la SEQ ID N.º: 2 corresponden a un dominio de unión al almidón. En un aspecto el dominio catalítico, según la invención, se conecta a un enlazador y a un dominio de unión de
- 50 carbohidrato.
- [0072] En una forma de realización, el dominio catalítico de glucoamilasa variante tiene identidad de secuencia de 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%, a la secuencia de
- 55 aminoácidos del dominio catalítico de glucoamilasa original.
- [0073] En otra forma de realización, la variante tiene 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 con el dominio catalítico comprendido en la SEQ ID N.º: 2, por ejemplo aminoácidos 30 a 494 de la SEQ ID N.º: 2.
- 60 [0074] En otro aspecto de la divulgación, el dominio catalítico de glucoamilasa variante se codifica por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de astringencia muy bajas, condiciones de astringencia bajas, condiciones de astringencia media, condiciones de astringencia medio altas, condiciones de astringencia altas, o condiciones de astringencia muy altas con (i) la secuencia codificante de dominio catalítico de la SEQ ID N.º: 1, o
- 65 (ii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii) (Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York).

[0075] En una forma de realización, la variante ha mejorado estabilidad química en comparación con la enzima original.

En particular, la estabilidad mejorada es estabilidad mejorada con respecto al corte por proteasas huéspedes.

5 Así, en una forma de realización, la invención se refiere a una variante que tiene una propiedad mejorada relativa a la progenitora, donde la propiedad mejorada es sensibilidad reducida para degradación de proteasa.

Glucoamilasas progenitoras

10 [0076] La glucoamilasa progenitora puede ser (a) un polipéptido con al menos 65% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2; (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de astringencia bajas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 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 a la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1; o d) un fragmento del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2, que tiene actividad de glucoamilasa.

15 [0077] En un aspecto, el progenitor tiene una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 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.

20 En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del progenitor difiere en no más de 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9, desde el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

25 [0078] En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en los aminoácidos 30 a 494 de la SEQ ID N.º: 2.

[0079] En otro aspecto, el progenitor es un fragmento del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 que contiene al menos 465 residuos de aminoácidos, por ejemplo, al menos 470 y al menos 475 residuos de aminoácidos.

30 [0080] En otra forma de realización, el progenitor es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

35 [0081] En otro aspecto, el progenitor se codifica por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de astringencia muy bajas, condiciones de astringencia bajas, condiciones de astringencia medias, condiciones de astringencia medio altas, condiciones de astringencia altas o condiciones de astringencia muy altas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, o (ii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii) (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York).

40 [0082] El polinucleótido de la SEQ ID N.º: 1 o una subsecuencia del mismo, al igual que el polipéptido de la SEQ ID N.º: 2 o un fragmento del mismo, se puede utilizar para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar ADN que codifica un progenitor de cepas de diferentes géneros o especies, según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para hibridación con el ADN o ADNc genómico de una célula de interés, seguido de procedimientos de transferencia de Southern estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente en estas.

45 Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que toda la secuencia, pero debería ser 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 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.

50 Se pueden usar tanto sondas de ADN como de ARN.

Las sondas están típicamente marcadas para la detección del gen correspondiente (por ejemplo, con 32P, 3H, 35S, biotina o avidina). Tales sondas se incluyen en la presente invención.

55 [0083] Una genoteca de ADN o ADNc genómico obtenido a partir de tales otras cepas se pueden seleccionar para ADN que hibridiza con las sondas anteriormente descritas y codifica un progenitor.

El genómico u otro ADN de tales otras cepas se puede separar por electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa u otras técnicas de separación.

El ADN de las bibliotecas o el ADN separado se puede transferir e inmovilizar en la nitrocelulosa u otro material de portador adecuado.

60 Para identificar un clon o ADN que hibridiza con la SEQ ID N.º: 1 o una subsecuencia del mismo, el material portador se usa en una transferencia de Southern.

65 [0084] Para fines de la presente divulgación, la hibridación indica que el polinucleótido hibridiza a una sonda de ácidos nucleicos marcada que corresponde con (i) la SEQ ID N.º: 1; (ii) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1; (iii) el complemento en toda su longitud de la misma; o (iv) una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de astringencia muy bajas a muy altas.

Las moléculas a las que la sonda de ácidos nucleicos hibridiza bajo estas condiciones se puede detectar utilizando, por ejemplo, película radiográfica o cualquiera de los otros medios de detección conocidos en la técnica.

5 [0085] En un aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es nucleótidos 64 a 1848 de SEQ ID N.º: 1. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEQ ID N.º: 2; el polipéptido maduro del mismo; o un fragmento del mismo. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es la SEQ ID N.º: 1.

10 [0086] En otra forma de realización, el progenitor se codifica por un polinucleótido con una identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 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%.

15 [0087] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido donde una región de un polipéptido se fusiona en el N-terminal o el C-terminal de una región de otro polipéptido.

20 [0088] El progenitor puede ser un polipéptido de fusión o polipéptido de fusión escindible donde otro polipéptido se fusiona en el N-terminal o el C-terminal del polipéptido de la presente invención.

Un polipéptido de fusión se produce por fundición de un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido de la presente invención.

25 Las técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica e incluyen la ligación de las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos, de modo que estas están en el mismo marco y que la expresión del polipéptido de fusión está bajo control del mismo promotor(es) y terminador.

Los polipéptidos de fusión también se pueden construir utilizando tecnología de inteína, donde los polipéptidos de fusión se crean postraduccionalmente (Cooper et al., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, Science 266: 776-779).

30 [0089] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión entre los dos polipéptidos.

En la secreción de la proteína de fusión, el sitio se divide liberando los dos polipéptidos.

35 Los ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios descritos en Martín et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotecnol. 3: 568-576; Svetina et al., 2000, J. Biotecnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al., 1997, Appl. Circundar. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503; and 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; and Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

40 [0090] En un aspecto particular, el polipéptido híbrido comprende el dominio catalítico de glucoamilasa variante fusionado a un enlazador y un dominio de unión de carbohidrato.

[0091] El progenitor puede ser obtenido de microorganismos de cualquier género.

45 Para fines de la presente invención, el término "obtenido de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente dada debe significar que el progenitor codificado por un polinucleótido se produce por la fuente o por una cepa donde el polinucleótido de la fuente ha sido insertado.

En un aspecto, el progenitor es secretado extracelularmente.

[0092] El progenitor puede ser una glucoamilasa fúngica.

50 Por ejemplo, el progenitor puede ser una glucoamilasa de *Penicillium* tal como, por ejemplo, una glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*.

[0093] En otro aspecto, el progenitor es un *Penicillium oxalicum*, por ejemplo, la glucoamilasa de la SEQ ID N.º: 2 o el polipéptido maduro de la misma.

55 [0094] 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 especies por lo que estos se conocen.

Los expertos en la técnica fácilmente reconocerán la identidad de equivalentes apropiados.

60 [0095] Las cepas de estas especies son accesibles fácilmente al público en un número de colecciones de cultivo, tal como la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Colección alemana de Microorganismos y Cultivos de Células GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y colección de Patentes de Cultivos del Servicio de Investigación para la Agricultura, centro de investigación Regional del Norte (NRRL).

[0096] El progenitor se puede identificar y obtener de otras fuentes con 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.

Las técnicas para aislamiento de microorganismos y ADN directamente de hábitats naturales se conocen en la técnica. Un polinucleótido que codifica un progenitor puede luego ser obtenido por cribado de forma similar de una genoteca de ADN o ADNc genómico de otro microorganismo o muestra de ADN mezclado.

Una vez un polinucleótido que codifica un progenitor ha sido detectado con la sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que se conocen por aquellos técnicos en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

Preparación de variantes

[0097] Las variantes se pueden preparar utilizando cualquier procedimiento de mutagénesis conocido en la técnica, tal como mutagénesis dirigida al sitio, construcción de gen sintético, construcción de gen semi-sintético, mutagénesis aleatoria, redistribución, etc.

[0098] La mutagénesis dirigida al sitio 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.

[0099] La mutagénesis dirigida al sitio se puede realizar *in vitro* por PCR que implica el uso de cebadores oligonucleótidos con la mutación deseada.

La mutagénesis dirigida al sitio puede también ser realizada *in vitro* por mutagénesis de "cassette" que implica la escisión por una enzima de restricción a 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, de forma que permite que las extremidades pegajosas del plásmido y el inserto enlacen una a otra.

Ver, por ejemplo, Scherer y Davis, 1979, Proc.Natl.Acad.El Sci.USA 76: 4949-4955; and Barton et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18: 7349-4966.

[0100] La mutagénesis dirigida al sitio puede también ser realizada *in vivo* por métodos conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, publicación de solicitud de patente EEUU nº 2004/0171154; Storici et al., 2001, Nature Biotechnol. 19: 773-776; Kren et al., 1998, Nat.Med. 4: 285-290; and Calissano and Macino, 1996, Fungal Genet.Newslett. 43: 15-16.

[0101] Cualquier procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio se puede usar en la presente invención. Hay muchos equipos comerciales disponibles que pueden utilizarse para preparar variantes.

[0102] La construcción de gen sintético implica la síntesis *in vitro* de una molécula de polinucleótido diseñada para codificar un polipéptido de interés.

La síntesis de gen se puede realizar utilizando un número de técnicas, como la tecnología con base de microchip multiplex descrita por Tian et al. (2004, Nature 432: 1050-1054) y tecnologías similares donde los oligonucleótidos se sintetizan y ensamblan sobre chips microfluídicos fotoprogramables.

[0103] Las sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples, deleciones y/o inserciones se pueden hacer y evaluar usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o redistribución, seguidos de un procedimiento de selección pertinente, tal como los descritos por Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625.

Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832-10837; U.S. Patent No. 5,223,409; WO 92/06204) y mutagénesis dirigida por región (Derbyshire et al., 1986, Gene 46: 145; Ner et al., 1988, ADN 7: 127)

[0104] Los métodos de mutagénesis/redistribución pueden estar combinados con métodos de selección de alto rendimiento, automatizados para detectar la actividad de polipéptidos, clonados, mutagenizados expresados por células huésped (Ness et al., 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

[0105] La construcción de gen semi-sintético se realiza por combinación de aspectos de construcción de gen sintético y/o mutagénesis dirigida al sitio, y/o mutagénesis aleatoria, y/o redistribución.

La construcción semi-sintética se caracteriza por un proceso de utilización de fragmentos de polinucleótido que son sintetizados, en combinación con técnicas PCR.

Las regiones definidas de genes pueden así ser sintetizadas *de novo*, mientras otras regiones se pueden amplificar utilizando cebadores mutagénicos de sitio específico, mientras aún otras regiones se pueden someter a tendencia al error PCR o amplificación de PCR sin tendencia al error.

Las subsecuencias de polinucleótido pueden luego ser redistribuidas.

Polinucleótidos

5 [0106] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican una variante de la presente invención.

Constructos de ácidos nucleicos

10 [0107] 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.

15 [0108] El polinucleótido se puede manipular en una variedad de vías para proveer la expresión de una variante. La manipulación del polinucleótido antes de la inserción en su vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificación de polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinantes se conocen en la técnica.

20 [0109] La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido que se reconoce por una célula huésped para la expresión del polinucleótido.

El promotor contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión de la variante.

25 El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre actividad transcripcional en la célula huésped que incluye promotores mutantes, truncados e híbridos, y se puede obtener de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares bien homólogos o heterólogos a la célula huésped.

[0110] Los 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 *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), de gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL), gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP), gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (sacB), genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (Agaisse and Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13: 97-107), operón lac de E. Coli, promotor trc de E. Coli (Egon et al., 1988, Gene 69: 301-315), gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (dagA) y gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 75: 3727-3731), al igual que el promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 80: 21-25).

35 Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilberto et al., 1980, Scientific American 242: 74-94; and in Sambrook et al., 1989, supra. Los ejemplos de promotores en serie se describen en la WO 99/43835.

40 [0111] Los 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), *Fusarium venenatum Daria* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum Quinn* (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 de *Trichoderma reesei* I, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa de *Trichoderma reesei* IV, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa de *Trichoderma reesei* I, xilanasa de *Trichoderma reesei* II, 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 a partir 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 a partir de un gen *Aspergillus nidulans* o gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

60 [0112] 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*/dehidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato (ADH1, ADH2/GAP) triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae*, (TPI) metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1) y quinasa 3-fosfoglicerato de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura se describen en Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423-488.

65

- [0113] La secuencia de control también puede ser un terminador de transcripción, que se reconoce por una célula huésped para transcripción terminal.
La secuencia terminal está operativamente enlazada al 3'-terminal del polinucleótido que codifica la variante.
Se puede utilizar cualquier terminal que sea funcional en la célula huésped.
- 5 [0114] Los terminadores preferidos para células huésped bacterianas se obtienen de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus clausii* (aprH), alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amyL) y RNA ribosómico de *Escherichia coli* (rrnB).
- 10 [0115] 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*.
- 15 [0116] Los terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo de *Saccharomyces cerevisiae* C (CYC1) y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura se describen por Romanos et al., 1992, *supra*.
- 20 [0117] La secuencia de control también puede ser una región de estabilizador de ARNm aguas abajo de un promotor y aguas arriba de la secuencia codificante de un gen que aumenta la expresión del gen.
- [0118] Los ejemplos de regiones estabilizadoras de ARNm adecuadas se obtienen a partir de un gen *cryIIIA* de *Bacillus thuringiensis* (WO 94/25612) y un gen SP82 de *Bacillus subtilis* (Hue et al., 1995, *Journal of Bacteriology* 177: 3465-3471).
- 25 [0119] 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 5'-terminal del polinucleótido que codifica la variante.
Se puede utilizar cualquier líder que sea funcional en la célula huésped.
- 30 [0120] 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*.
- 35 [0121] Los líderes adecuados para células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), quinasa de 3-fosfoglicerato de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP).
- 40 [0122] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al 3'-terminal de la secuencia de codificación de variante y, cuando se ha transcrito, se reconoce por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina a ARNm transcrito. Se puede utilizar cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped.
- 45 [0123] 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*.
- [0124] Las secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura se describen en Guo and Sherman, 1995, *Mol. Cellular Biol.* 15: 5983-5990.
- 50 [0125] La secuencia de control también puede ser una región codificante del péptido señal que codifica un péptido señal enlazado al N-terminal de una variante y dirige la variante a la vía secretora de la célula.
El 5'-extremo de la secuencia codificante del polinucleótido puede contener intrínsecamente una secuencia codificante del péptido señal naturalmente enlazado en el marco de lectura de traducción con el segmento de la
55 secuencia codificante que codifica la variante.
Alternativamente, el 5'-extremo de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal que sea foránea a la secuencia codificante.
Se puede requerir una secuencia codificante del péptido señal foránea donde la secuencia codificante naturalmente no contiene una secuencia codificante del péptido señal.
- 60 Alternativamente, una secuencia codificante del péptido señal foránea puede sencillamente remplazar la secuencia codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción de la variante.
Sin embargo, se puede utilizar cualquier secuencia codificante del péptido señal que dirija la variante expresada en la vía secretora de una célula huésped.

- 5 [0126] Las secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes del 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 *Bacillus subtilis* prsA. Otros péptidos señal se describen en Simonen and Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.
- 10 [0127] Las secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias codificantes del 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*.
- 15 [0128] Los péptidos señal útiles para células huésped de levadura se obtienen de los genes para alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes del péptido señal útiles se describen en Romanos et al., 1992, supra.
- 20 [0129] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante del propéptido que codifica un propéptido posicionado en el N-terminal de una variante. El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es inactivo generalmente y se puede convertir en un polipéptido activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido desde el 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 *myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 25 [0130] Donde ambos péptido señal y secuencias de propéptido están presentes, la secuencia de propéptido está situada junto al N-terminal de la variante y la secuencia de péptido señal está situada junto al N-terminal de la secuencia de propéptido.
- 30 [0131] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulen la expresión de la variante relativa al crecimiento de la célula huésped. Los ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que causan la expresión del gen para ser activados o desactivados en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, con la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas operadores 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*, promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellos que permiten amplificación génica.
- 40 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 sería operativamente enlazado con la secuencia reguladora.
- 45 **Vectores de expresión**
- [0132] La presente invención 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 transcripcionales y traslacionales. Los varios nucleótidos y secuencias de control se pueden juntar 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 a tales sitios. Alternativamente, el polinucleótido se puede expresar por inserción del polinucleótido o un constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión.
- 50 En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante está operativamente enlazada a las secuencias de control apropiadas para la expresión.
- 55 [0133] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o viral) que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y puede provocar la expresión del polinucleótido. La elección del vector típicamente dependerá 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 cerrado circular.
- 60

- [0134] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de 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.
- 5 Alternativamente, el vector puede ser uno tal que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica con el cromosoma(s) en el que se ha integrado.
Además, se puede utilizar un vector único o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total para ser introducidos en el genoma de la célula huésped o un transposón.
- 10 [0135] El vector contiene preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten la selección fácil de células transformadas, transfectadas, transducidas o similar.
Un marcador seleccionable es un gen el producto del cual proporciona para biocida o resistencia vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia para auxótrofos y similar.
- 15 [0136] Los ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son *Bacillus licheniformis* o genes *dal* de *Bacillus subtilis* o marcadores que confieren resistencia antibiótica tal como ampicilina, cloranfenicol, canamicina, neomicina, espectinomycinina o resistencia a tetraciclina.
Los marcadores adecuados para células huésped de levadura incluyen, pero de forma no limitativa, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3.
- 20 Los marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *barra* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (adeniltransferasa de sulfato) y *trpC* (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos.
Preferido para usar en una célula de *Aspergillus* son *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* *amdS* y genes *pyrG* y un gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.
- 25 [0137] El vector contiene preferiblemente un elemento(s) que permite la integración del vector en el genoma de la célula huésped o replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.
- 30 [0138] Para integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido que codifica la variante o cualquier otro elemento del vector para 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 a una ubicación(es) precisa en el cromosoma(s).
- 35 Para aumentar la probabilidad de integración a una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como 100 a 10,000 pares de bases, 400 a 10,000 pares de bases y 800 a 10,000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencia con la secuencia diana correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga.
Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia diana en el genoma de la célula huésped.
- 40 Además, los elementos integracionales pueden ser polinucleótidos codificantes o no codificantes.
Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no-homóloga.
- [0139] Para replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permite al vector replicar autónomamente en la célula huésped en cuestión.
El origen de replicación puede ser cualquier replicador de plásmido de mediación de replicación autónoma que funciona en una célula.
El término "origen de replicación" o "replicador de plásmido" significa un polinucleótido que permite a un plásmido o vector replicar *in vivo*.
- 50 [0140] Los ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de plásmidos pBR322; pUC19; pACYC177, y pACYC184 que permiten la replicación en el E. Coli y pUB110; pE194; pTA1060, y pAM®1 permiten la replicación en el *Bacillus*.
- 55 [0141] Los 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.
- [0142] Los ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, Gene 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 la WO 00/24883.
- 60 [0143] Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención se puede insertar en una célula huésped para aumentar la producción de un variante.

Un aumento en el número de copias del polinucleótido se puede obtener por 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 las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable y, así, copias adicionales del polinucleótido se pueden seleccionar por cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0144] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención se conocen por un experto en la materia (see, e.g., Sambrook et al., 1989, supra).

Células huésped

[0145] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención operativamente enlazada 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 el constructo o vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosomal que se autoreplica como se describe anteriormente.

El término "célula" abarca cualquier progenie de una célula madre que no sea idéntico a la célula madre debido a mutaciones que se producen durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen que codifica la variante y su fuente.

[0146] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de una variante, por ejemplo, una procariota o una eucariota.

[0147] 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*, *helicobacteria*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Ureaplasma*.

[0148] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus* que incluya, pero no esté limitada a *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 células de *Bacillus thuringiensis*.

[0149] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus* que incluya, pero no esté limitada a *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus equi subesp. células de Zooepidemicus*.

[0150] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces*, que incluya pero no esté limitada a *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y células de *Streptomyces lividans*.

[0151] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* se puede efectuar por transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Chang and Cohen, 1979, Mol.Gen.Genet. 168: 111-115), transformación celular competente (ver, por ejemplo, Young and Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829, or Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol.Biol. 56: 209-221), electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa and Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751) o conjugación (ver, por ejemplo, Koehler and Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278).

La introducción de ADN en una célula de *E. coli* se puede efectuar por transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol.Biol. 166: 557-580) o electroporación (ver, 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 protoplasto, electroporación (ver, por ejemplo, Gong et al., 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), conjugación (ver, por ejemplo, Mazodier et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585) o transducción (ver, por ejemplo, Burke et al., 2001, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* se puede efectuar por electroporación (ver, por ejemplo, Choi et al., 2006, J. Microbiol.Methods 64: 391-397) o conjugación (ver, por ejemplo, Pinedo and 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 and Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Catt and Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207), electroporación (ver, por ejemplo, Buckley et al., 1999, Appl.Environ.Microbiol. 65: 3800-3804) o conjugación (ver, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol.Rev. 45: 409-436). Sin embargo, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para introducción de ADN en una célula huésped.

[0152] La célula huésped también puede ser una eucariota, tal como un mamífero, insecto, planta o célula fúngica.

[0153] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Hongos" como se utiliza en este caso incluye el phyla Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota al igual que la Oomycota y todos los hongos mitospóricos (como se ha definido por Hawkswort et al., En, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK).

[0154] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este caso incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporogénea y levadura de los Fungi Imperfecti (Blastomycetes). Ya que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe ser definida como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, Passmore, and Davenport, editors, Soc. App.Bacteriol.Symposium Series No. 9, 1980).

[0155] La célula huésped de levadura puede ser una *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o célula *Yarrowia* tal como un *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis* o célula de *Yarrowia lipolytica*.

[0156] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. "Fúngica filamentosa" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como se ha definido por Hawkswort et al., 1995, supra).

Los hongos filamentosos son generalmente caracterizados por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos.

El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y catabolismo de carbono es aeróbico estrictamente.

En cambio, crecimiento vegetativo por levaduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un talo unicelular y catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0157] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser un *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomices*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromices*, *Pleurotus*, *Schizofilum*, *Talaromyces*, *Teramoascus*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, *Trametes* o célula *Trichoderma*.

[0158] Por ejemplo, la célula huésped fúngica filamentosa puede ser una *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*, *hirsutus Coriolus*, *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 célula de *Trichoderma viride*.

[0159] Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplasto, transformación de los protoplastos y regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*.

Los procedimientos adecuados para la transformación de *Aspergillus* y células huésped de *Trichoderma* se describen en EP 238023, Yelton et al., 1984, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81: 1470-1474 y Christensen et al., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Los métodos adecuados para la transformación de especies de *Fusarium* se describen en Malardier et al., 1989, Gene 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., New York; Ito et al., 1983, J. Bacteriol. 153: 163; and Hinnen et al., 1978, Proc. Natl.Acad.Sci.USA 75: 1920.

Métodos de producción

[0160] La presente invención también se refiere a métodos de producción de una variante, que comprende: (a) cultivo de una célula huésped de la presente invención bajo condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y (b) recuperar la variante.

[0161] 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 de escala pequeña o a gran escala (incluyendo lote continuo, lote alimentado o fermentaciones en

estado sólido) en el laboratorio o fermentadores industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan la expresión y/o el 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 en la técnica. Hay medios adecuados proporcionados por proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la colección americana de cultivos tipo).

Si la variante se segrega en el medio nutritivo, la variante se puede recuperar directamente del medio.

Si la variante no se segrega, se puede recuperar de lisatos de célula.

[0162] 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 desaparición de un sustrato enzimático.

Por ejemplo, un ensayo enzimático se puede utilizar para determinar la actividad de la variante.

[0163] La variante se puede recuperar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la variante se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales que incluyen, pero no están limitados a recolección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0164] La variante se puede purificar por una variedad de procedimientos conocida en la técnica que incluye, pero no esté limitada a cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica cromatografía y de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (ver, por ejemplo, *pProtein Purification*, Janson and Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) para obtener variantes sustancialmente puras.

[0165] 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.

30 Composiciones

[0166] 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 se enriquecen con 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 bajo, olor bajo y estabilidad de almacenamiento aceptable.

[0167] La composición puede comprender un polipéptido de la presente invención como el mayor componente enzimático, por ejemplo, una composición monocomponente.

Alternativamente, la composición puede comprender actividades enzimáticas múltiples, tales como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, 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 xilanasa.

[0168] En una forma de realización particular, la composición comprende una alfa amilasa y el polipéptido según la invención.

[0169] La enzima(s) adicional puede ser producida, 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*, *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*.

[0170] Las composiciones de polipéptido 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 polipéptido se puede en forma de un granulado o un microgranulado.

El polipéptido para ser incluido en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

5 [0171] Los ejemplos proporcionados abajo de usos preferidos de las composiciones de polipéptido o polipéptido de la invención.

La dosificación de la composición de polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las que se usa la composición se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

Combinación de glucoamilasa y alfa-amilasa

10 [0172] 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 para glucoamilasa es entre 0.05 y 5.0 AFAU/AGU. Más preferiblemente, la proporción entre la 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 actividad de alfa-amilasa ácida y 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.

25 [0173] La composición de arriba es adecuada para uso en la licuefacción, sacarificación y/o proceso de fermentación, preferiblemente, en la conversión de almidón, especialmente, para producir jarabe y productos de fermentación, tales como etanol.

[0174] Abajo se proporcionan ejemplos de usos preferidos de las composiciones de polipéptido de la presente invención.

30 La dosificación de la composición de polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las que la composición se usa se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

Usos

35 [0175] La presente invención también está dirigida a usar un polipéptido de la presente invención en una licuefacción, una sacarificación y/o un proceso de fermentación.

El polipéptido se puede utilizar en un proceso único, por ejemplo, en un proceso de licuefacción, un proceso de sacarificación o un proceso de fermentación.

40 El polipéptido también se puede usar en una combinación de procesos por ejemplo en una licuefacción y proceso de sacarificación, en una licuefacción y proceso de fermentación o en una sacarificación y proceso de fermentación, preferiblemente en relación con la conversión de almidón.

[0176] En un aspecto preferido de la presente invención, la licuefacción, sacarificación y/o proceso de fermentación incluye licuefacción realizada consecutivamente o simultáneamente y procesos de sacarificación.

45 [0177] En el proceso de licuefacción enzimática convencional, se añade alfa-amilasa termoestable y el almidón encadenado largo se degrada en unidades ramificadas y lineales más cortas (maltodextrinas), pero la glucoamilasa no se añade.

50 [0178] Cuando se aplica la glucoamilasa de la presente invención, potencialmente en combinación con una alfa-amilasa en una licuefacción y/o proceso de sacarificación, especialmente en una licuefacción simultánea y proceso de sacarificación, el proceso se puede conducir a una temperatura más alta.

Realizando los procesos de licuefacción y/o sacarificación a temperaturas más altas, el proceso puede llevarse a cabo en un periodo de tiempo más corto o alternativamente el proceso puede llevarse a cabo usando una dosificación enzimática más baja.

55 Además, el riesgo de contaminación microbiana se reduce cuando se realiza la licuefacción y/o el proceso de sacarificación a temperatura más alta.

Conversión de material que contiene almidón

60 [0179] La presente invención proporciona un uso de la glucoamilasa de la invención para producir glucosas y similares de almidón.

Generalmente, el método incluye los pasos de hidrolizar parcialmente el precursor de almidón usando glucoamilasa de la presente invención bien solo o en presencia de una alfa-amilasa.

[0180] 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 glucosiles.

5 [0181] 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 con un proceso de sacarificación continua.

Producción de jarabe, bebida y/o producto de fermentación

10 [0182] Los usos de la glucoamilasa de la invención incluyen conversión de almidón en por ejemplo, bebida jarabe y/o un producto de fermentación, incluido etanol.

15 [0183] La presente invención también proporciona un proceso del uso de una glucoamilasa de la invención para producir jarabe, tal como glucosa y similar, a partir de material que contiene almidón.

Las materias primas adecuadas se ejemplifican en la sección "Materiales que contienen almidón".

20 Generalmente, el proceso comprende los pasos de hidrolizar parcialmente o totalmente material que contiene almidón (licuefacción y/o sacarificación) en presencia de la glucoamilasa de la presente invención solo o en combinación con alfa-amilasa para liberar glucosa de las extremidades no-reducidas del almidón o moléculas oligo y polisacáridas relacionadas.

[0184] La glucoamilasa de la invención también se puede usar en forma inmovilizada.

25 Esta es adecuada y frecuentemente usada para producir jarabes de especialidad, tales como jarabes de maltosa al igual que el flujo refinado de oligosacáridos en relación con la producción de jarabes de fructosa, por ejemplo, jarabe rico en fructosa (HFS).

[0185] La glucoamilasa de la presente invención también puede usarse para producir varias bebidas, tales como, pero no limitadas a la bebida de tomate, patata, patata china, batata, y/o calabaza.

30 Productos de fermentación

[0186] El término "producto de fermentación" significa un producto producido por un proceso incluyendo un proceso de fermentación utilizando un organismo fermentador.

35 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, de 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.

45 En un aspecto preferido el producto de fermentación es etanol, por ejemplo, etanol combustible; etanol potable, es decir, bebidas alcohólicas neutrales potables; o etanol industrial o productos usados en la industria de alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), industria láctea (por ejemplo, productos lácteos fermentados), industria de cuero e industria de tabaco.

50 Los tipos de cerveza preferidas comprenden cerveza inglesa de malta, cerveza negra, cerveza rubia, amarga, soluciones de malta, cerveza happoushu, cerveza de alto grado de alcohol, cerveza baja en alcohol, cerveza baja en calorías o cerveza light.

55 Los procesos de fermentación preferidos usados incluyen procesos de fermentación alcohólicos, que son bien conocidos en la técnica. Los procesos de fermentación preferidos son procesos de fermentación anaeróbica, que son bien conocidos en la técnica.

Elaboración de cerveza

[0187] Las glucoamilasas de la invención se pueden usar en una industria cervecera.

60 Las glucoamilasas de la invención se añaden en cantidades eficaces que se pueden determinar fácilmente por la persona experta en la técnica.

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

5 [0188] En este aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para producir una licuefacción, sacarificación y/o producto de fermentación de material que contiene almidón, que comprende la etapa de: tratamiento de material que contiene almidón con un polipéptido de la presente invención.

[0189] Las materias primas que contienen almidón adecuado se enumeran en la sección "Materiales que contienen almidón" de abajo.

10 Las enzimas contempladas se enumeran en las "enzimas" - en la sección de abajo.
Preferiblemente, el proceso de la presente invención comprende el tratamiento de material que contiene almidón con un polipéptido de la presente invención solo o junto con una alfa-amilasa.

[0190] La licuefacción y/o producto de sacarificación de la presente invención son dextrina o azúcares moleculares bajos, por ejemplo DP1-3.

15 En el proceso de licuefacción, la conversión de almidón en la glucosa, dextrina y/o azúcares de bajo peso molecular se mejora por la adición de una glucoamilasa de la presente invención.

El producto de fermentación, tal como etanol, puede opcionalmente ser recuperado después de la fermentación, por ejemplo, por destilación.

20 La fermentación preferiblemente se realiza en presencia de levadura, preferiblemente una cepa de *Saccharomyces*.

Los organismos de fermentación adecuados se enumeran en la sección "Organismos de fermentación" de abajo.

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

25 [0191] En este aspecto la presente invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación, especialmente etanol, a partir de material que contiene almidón, cuyo proceso incluye un paso de licuefacción y sacarificación consecutivamente o simultáneamente realizado y pasos de fermentación.

30 [0192] La invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye las etapas de:

- (a) material que contiene almidón de licuefacción; utilizando una alfa amilasa;
- (b) sacarificación del material licuado obtenida en la etapa (a) utilizando una glucoamilasa; y
- (c) fermentación del material sacarificado utilizando un organismo fermentador.

35 [0193] Preferiblemente, la etapa (a) incluye también la utilización la glucoamilasa de la invención.
En una forma de realización, la glucoamilasa de la invención está también presente/añadida en la etapa (b).

40 [0194] Preferiblemente, la etapa de tratamiento de material que contiene almidón con un polipéptido de la presente invención en un proceso de licuefacción se realiza en la presencia de una amilasa alfa y se realiza a temperaturas entre 40°C y 100°C, más preferiblemente entre 80°C y 90°C, por ejemplo, 85°C, y a un pH entre 2.0 y 7.0, más preferiblemente entre pH 4.0 y 6.0, aún más preferiblemente entre pH 4.5 y pH 5.0, tal como por ejemplo, pH 4.8.

45 [0195] El producto de fermentación, tal como especialmente etanol, puede opcionalmente ser recuperado después de la fermentación, por ejemplo, por destilación.

Las materias primas que contienen almidón adecuado se enumeran en la sección "Materiales que contienen almidón" de la sección de abajo.

Las enzimas contempladas se enumeran en la sección de "enzimas" de abajo.

La licuefacción es preferiblemente realizada en presencia de una alfa-amilasa.

50 La fermentación es preferiblemente realizada en presencia de levadura, preferiblemente una cepa de *Saccharomyces*.

Los organismos de fermentaciónn adecuados se enumeran en la sección "Organismos de fermentación" de abajo.

55 En ejemplos de realización preferidos se realizanla la etapa (b) y (c) consecutivamente o simultáneamente (es decir, como proceso de SSF).

[0196] En una forma de realización particular, el proceso de la invención además comprende, antes de la etapa (a), las etapas de:

- x) reducción del tamaño de partícula del material que contiene almidón, preferiblemente por fresado; y
- y) formar un lodo que comprende el material que contiene almidón y agua.

[0197] El lodo acuoso puede contener de 10-40 peso.%, preferiblemente 25-35 peso. % material que contiene almidón.

65 El lodo se calienta por encima de la temperatura de gelatinización y alfa-amilasa, preferiblemente alfa-amilasa bacteriana y/o ácido fúngica se puede adicionar para iniciar la licuefacción (diluyendo). En una forma de

realización, el lodo puede ser cocido a chorro para gelatinizar adicionalmente el lodo antes de ser sometido a una alfa-amilasa en la etapa (a) de la invención.

[0198] Más específicamente la licuefacción se puede realizar como un proceso de lodo caliente de tres pasos.

5 El lodo se calienta entre 60-95°C, preferiblemente 80-85°C y la alfa-amilasa se añade para iniciar la licuefacción (diluyendo). Luego el lodo se puede cocer por chorro 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.

El lodo se enfría durante 60-95°C y se añade más alfa-amilasa para finalizar la hidrólisis (licuefacción secundaria).

10 El proceso de licuefacción normalmente se realiza a pH 4.5-6.5, en particular a un pH entre 5 y 6. Granos enteros molidos y licuados se conocen como triturado.

[0199] La sacarificación en la etapa (b) se puede realizar usando condiciones bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, un proceso de sacarificación completa puede durar hasta aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas, sin embargo, es común solo hacer una pre-sacarificación de típicamente 40-90 minutos a una temperatura entre 30-65°C, típicamente aproximadamente 60°C, seguida de sacarificación completa durante la fermentación en un proceso de sacarificación y fermentación simultánea (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.

20 [0200] El proceso más usado en el producto de la fermentación, especialmente etanol, producción es el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF), donde no hay fase de retención para la sacarificación, lo que significa que el organismo fermentador, tal como levadura y enzima(s) se puede adicionar.

25 SSF puede típicamente efectuarse a una temperatura 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 ajustar arriba o abajo durante la fermentación.

[0201] Conforme a la presente invención, la etapa de la 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.

30 Los procesos de fermentación preferidos incluyen procesos de fermentación de alcohol, como se conocen en la técnica. Los procesos de fermentación preferidos son procesos de fermentación anaeróbica, como se conocen en la técnica.

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

[0202] 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 crudo).

Según la invención, el producto de fermentación deseado, tal como etanol, se puede producir sin licuefacción del lodo acuoso con el material que contiene almidón.

45 En una forma de realización, un proceso de la invención incluye material que contiene almidón (molido) de sacarificación, por ejemplo, almidón granulado, por debajo de la temperatura de gelatinización en presencia de una alfa amilasa para producir azúcares que se pueden fermentar en el producto de fermentación deseado por un organismo fermentador adecuado.

En otra forma de realización, una glucoamilasa de la invención y una alfa amilasa se usan durante la sacarificación y fermentación.

50 En un aspecto, la invención se refiere a un proceso para producir un producto de la fermentación a partir de material que contiene almidón que comprende:

- (a) material que contiene almidón de sacarificación con una glucoamilasa madura según la invención, preferiblemente con la secuencia mostrada como aminoácidos 22 a 616 en la SEQ ID N.º 2, a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho material que contiene almidón,
- 55 (b) fermentación utilizando un organismo fermentador.

[0203] Los pasos (a) y (b) del proceso de la invención se pueden realizar consecutivamente o simultáneamente.

En una forma de realización, un lodo que comprende agua y material que contiene almidón se prepara antes de la etapa (a).

60 [0204] En una forma de realización preferida, la etapa (a) incluye la adición de una alfa amilasa.

[0205] El proceso de la fermentación se puede realizar durante un periodo de 1 a 250 horas, 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.

5 [0206] El término "temperatura de gelatinización inicial" significa la temperatura mínima en la que comienza la gelatinización del almidón.

El almidón calentado en el agua empieza a gelatinizar entre 50°C y 75°C; la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón específico y la puede determinar fácilmente el experto en la materia.

Así, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según la especie de planta, la variedad particular de las especies de planta, al igual que con las condiciones de crecimiento.

10 En el contexto de esta invención, la temperatura de gelatinización inicial de un material que contiene almidón dado 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.

15 [0207] Antes de la etapa (a) un lodo de material que contiene almidón, tal como almidón granulado con 10-55 peso. % sólidos secos, preferiblemente 25-40 peso. % sólidos secos, más preferiblemente 30-35 peso. % sólidos secos de material que contiene almidón se pueden preparar.

El lodo puede incluir agua y/o aguas de proceso, tal como vinaza (vinaza reciclada), agua de lavado, condensado o destilado de vaporizador, agua de sección de agotamiento de destilación u otro agua de proceso de planta de producto de fermentación.

20 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, niveles altos de vinaza se pueden utilizar si se desea.

En una forma de realización, el lodo acuoso contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 70 vol. % vinaza, preferiblemente 15-60% vol. % vinaza, especialmente de aproximadamente 30 a 50 vol. % vinaza.

25 [0208] El material que contiene almidón se puede preparar reduciendo el tamaño de partícula, preferiblemente por molienda en húmedo o en seco a 0.05 a 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 convierte en un hidrolizado de almidón soluble.

30 [0209] El proceso de la invención se conduce a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial. Preferiblemente la temperatura a la que la etapa (a) se realiza es entre 30-75°C, preferiblemente entre 45-60°C.

35 [0210] En una forma de realización preferida la etapa (a) y etapa (b) se realizan como un proceso de sacarificación y fermentación simultánea o secuencial.

En tal forma de realización preferida, el proceso se lleva típicamente a una temperatura 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 ajustar arriba o abajo durante la fermentación.

40 [0211] En una forma de realización la sacarificación y fermentación simultánea se realiza de modo que el nivel de azúcar, tal como nivel de glucosa se mantiene a un nivel bajo tal como debajo de 6 peso.%, preferiblemente debajo aproximadamente 3 peso.%, preferiblemente debajo aproximadamente 2 peso.%, más preferido debajo aproximadamente 1 peso. %, aún más preferido debajo aproximadamente 0.5 peso.% o aún más preferido 0.25 peso.%, tal como debajo aproximadamente 0.1 peso. %. Tales bajos niveles de azúcar se pueden conseguir sencillamente utilizando cantidades ajustadas de enzima y organismo fermentador.

Una persona experta en la técnica puede fácilmente determinar qué cantidades de enzima y organismo fermentador usar.

50 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 aproximadamente por debajo de 0.5 peso. % o debajo de aproximadamente 0.2 peso. %.

55 [0212] El proceso se puede realizar a un pH en el rango entre 3 y 7, preferiblemente de pH 3.5 a 6, o más preferiblemente de pH 4 a 5.

Materiales que contienen almidón

60 [0213] Cualquier materia prima que contenga almidón adecuado, que incluya almidón granulado, se puede utilizar según la presente invención.

La materia prima se selecciona generalmente basada en el producto de fermentación deseado.

Los ejemplos de materias primas que contienen almidón, adecuados para usar en un proceso de la presente invención, incluyen tubérculos, raíces, tallos, granos enteros, granos, mazorcas, trigo, cebada, centeno, sorgo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, guisantes de arroz, alubias, o patatas dulces, o mezclas derivadas, o cereales,

65

materias primas que contienen azúcar, tal como melaza, materiales de fruta, azúcar de caña o remolacha azucarera, patatas, y materiales con celulosa, tal como madera o residuos de planta o mezclas derivadas. Se contemplan ambos tipos cerosos y no cerosos de maíz y cebada.

5 Organismos de fermentación

[0214] "Organismo de fermentación" se refiere a cualquier organismo, con organismos bacterianos y fúngicos, adecuados para usar en un proceso de fermentación y capaces de producir un producto de fermentación deseado.

10 Los organismos de fermentación adecuados especialmente son capaces de fermentar, es decir, convertidos, azúcares, tal como glucosa o maltosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado.

Los ejemplos de organismos de fermentación incluyen organismos fúngicos, tal como levadura.

La levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces spp.*, en particular, *Saccharomyces cerevisiae*.

15 La levadura disponible comercialmente incluye, 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., USA), SUPERSTART (disponible de Alltech), GERT STRAND (disponible de Gert Strand AB, Sweden) y FERMIOL (disponible de especialidades DSM).

20 Enzimas

Glucoamilasa

[0215] La glucoamilasa es preferiblemente una glucoamilasa de la invención.

25 Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente una glucoamilasa de la invención también se puede combinar con otras glucoamilasas.

[0216] La glucoamilasa puede ser adicionada en una cantidad de 0.001 a 10 AGU/g DS (sólidos secos), preferiblemente de 0.01 a 5 AGU/g DS, tal como alrededor de 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1 o 2 AGU/g DS, especialmente 0.05 a 0.5 AGU/g DS; o 0.02-20 AGU/g DS, preferiblemente 0.1-10 AGU/g DS.

30 Alfa-amilasa

[0217] La alfa-amilasa según la invención puede ser de cualquier origen.

Preferidas son las alfa-amilasas de origen fúngico o bacteriano.

35 [0218] En un aspecto preferido, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, por ejemplo, alfa-amilasa ácida fúngica o alfa-amilasa ácida bacteriana.

El término "alfa amilasa ácida" significa una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que adicionada en una cantidad eficaz tiene actividad óptima a un rango de pH de 3 a 7, preferiblemente de 3.5 a 6, o más preferiblemente de 4-5.

40 Alfa-amilasas bacterianas

[0219] Según la invención una alfa-amilasa bacteriana puede preferiblemente derivarse del género **Bacillus**.

45 [0220] En un aspecto preferido, la alfa-amilasa de *Bacillus* se deriva de una cepa de *B. licheniformis*, *B. Amyloliquefaciens*, *B. Stearothermophilus* o *B.subtilis*, pero también se puede derivar de otros ejemplos específicos de especie *Bacillus* de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (BLA) mostradas en la SEQ ID N.º: 4 en la WO 99/19467, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (BAN) mostrada en la SEQ ID N.º: 5 en la WO 99/19467 y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (BSG) mostrada en la SEQ ID N.º: 3 en WO 99/19467.

50 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% de identidad con cualquiera de las secuencias mostradas como la SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente, en la WO 99/19467.

55 [0221] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrido, 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 (todos los documentos por la presente incorporados por referencia).

60 Variantes de alfa-amilasa contempladas en concreto se describen en la US patente n.º. 6,093,562, 6,297,038 o Patente EE.UU. N.º 6,187,576 (por la presente incorporada por referencia) e incluyen variantes de alfa-amilasa *Bacillus stearothermophilus* con una deleción de uno o dos aminoácidos en la posición 179 a 182, preferiblemente una deleción doble descrita en la WO 96/23873, ver por ejemplo, página 20, líneas 1-10 (en la presente incorporada por referencia), preferiblemente correspondientes a delta(181-182) en comparación con el alfa-amilasa de secuencia aminoácida tipo salvaje BSG expuesto en SEQ ID N.º: 3 descrito en la WO 99/19467 o

deleción de aminoácidos 179 y 180 que usa SEQ ID N.º: 3 en WO 99/19467 para numeración (que en la presente se incorpora por referencia).

Aún más preferidas son alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente alfa-amilasa de *Bacillus stearothersophilus*, que tiene una deleción doble que corresponde con delta(181-182) y además comprende una N193F sustitución (denominada también 1181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia aminoácida alfa-amilasa tipo salvaje BSG expuesta en la SEQ ID N.º: 3 descrita en la WO 99/19467.

[0222] 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 para maltosa en la configuración alfa.

Una alfa-amilasa maltogénica de cepa de *Bacillus stearothersophilus* NCIB 11837 está comercialmente disponible de Novozymes A/S, Dinamarca.

La alfa-amilasa maltogénica se describe en la Patente USA. n.º. 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628, que está incorporada en la presente por referencia.

Alfa-amilasas híbridas bacterianas

[0223] Una alfa-amilasa híbrida en concreto contemplada comprende 445 residuos de aminoácidos C-terminal de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada como la SEQ ID N.º: 4 en WO 99/19467) y los 37 residuos de aminoácidos N-terminal de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada como la SEQ ID N.º: 3 en WO 99/19467), con uno o más, especialmente todas las siguientes sustituciones:

G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S (utilizando la numeración de *Bacillus licheniformis*).

Preferidas también son las variantes que tienen una o varias de las siguientes mutaciones (o mutaciones correspondientes en otras estructuras de *Bacillus* alfa-amilasa): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o deleción de dos residuos entre posiciones 176 y 179, preferiblemente deleción de E178 y G179 (utilizando la SEQ ID N.º: 5 numeración de la WO 99/19467).

Alfa-amilasas fúngicas

[0224] Las alfa-amilasas de ácido fúngico incluyen alfa-amilasas ácidas derivadas a partir de una cepa del género *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* o alfa-amilasas de *Aspergillus kawachii*.

[0225] Una alfa-amilasa fúngica de ácido preferido es una alfa-amilasa de tipo *Fungamyl* que está preferiblemente derivada a partir de una cepa de *Aspergillus oryzae*.

En la presente divulgación, el término "alfa-amiyasa 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 N.º: 10 en la WO 96/23874.

[0226] Otra alfa-amilasa ácida preferida se deriva de una cepa *Aspergillus niger*.

En un aspecto preferido, la alfa-amilasa fúngica ácida es el una 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 la WO 89/01969 (ejemplo 3).

La alfa-amilasa ácida de *Aspergillus niger* ácido se muestra también como la SEQ ID N.º: 1 en la WO 2004/080923 (Novozymes) que se incorpora en la presente por referencia.

También se contemplan variantes de dicha amilasa fúngica ácida que tienen al menos 70% de identidad, tal como al menos 80% o incluso al menos 90% de identidad, tal como al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con la SEQ ID N.º: 1 en la WO 2004/080923.

[0227] En un aspecto preferido la alfa-amilasa se deriva de *Aspergillus kawachii* y se describe en Kaneko et al., 1996, J. Fermento.Bioeng. 81: 292-298, "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.

[0228] La alfa-amilasa ácida fúngica también puede ser una enzima tipo salvaje que comprende un módulo de unión a carbohidratos (CBM) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir, un ningún híbrido) o una variante del mismo.

En una forma de realización, la alfa-amilasa ácida tipo salvaje se deriva de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

[0229] Unas alfa-amilasas ácidas pueden según la invención ser adicionadas en una cantidad de 0.01 a 10 AFAU/g DS, preferiblemente 0.01 a 5 AFAU/g DS, especialmente 0.02 a 2 AFAU/g DS.

Alfa-amilasas de híbrido fúngico

[0230] En un aspecto preferido, la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida.

Los ejemplos preferidos de alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen las descritas en la WO 2005/003311 o

[0231] La publicación de patente de EE.UU n° 2005/0054071 (Novozymes) o la solicitud de patente de EEUU n° 2006/0148054 (Novozymes) que se incorpora en la presente por referencia.

5 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.

10 [0232] Los ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen, pero no están limitadas a aquellas descritas en la solicitud de patente EEUU n° 2006/0148054 incluyendo la variante de *Fungamyl* con dominio catalítico JA118 y SBD *Athelia rolfsii* (SEQ ID N.º: 100 en la solicitud de EEUU n° 2006/0148054), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de *Athelia rolfsii* AMG y SBD (SEQ ID N.º: 101 en la solicitud EEUU n° 2006/0148054) y alfa-amilasa de *Meripilus giganteus* con enlazador de glucoamilasa y SBD de *Athelia rolfsii* (SEQ ID N.º: 102 en la solicitud EEUU n° 2006/0148054); y alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa y CBM de *Aspergillus niger* (SEQ ID N.º 2 en la publicación internacional n° WO 2007/144424).

15 [0233] Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen, pero no de forma limitativa aquellas descritas en la publicación de patente EEUU n° 2005/0054071, incluyendo aquellas descritas en la tabla 3 en la página 15, tales como alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con enlazador de *Aspergillus kawachii* y dominio de unión al almidón.

Productos de alfa-amilasa comerciales

25 [0234] 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.)

30 [0235] La presente invención es posteriormente descrita por los ejemplos siguientes que no deberían ser interpretados como limitación del ámbito de la invención.

Ejemplos

35 Materiales y métodos

Actividad de glucoamilasa

[0236] La actividad de glucoamilasa se puede medir en unidades AGU.

40 Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0237] La unidad de glucoamilasa (AGU) se define como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol 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 de abajo), de forma que se genera glucosa.

Incubación de glucoamilasa:	
Sustrato:	Maltosa 100 mM
Tampón:	Acetato 0.1 M
pH:	4.30 ± 0.05
Temperatura de incubación:	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	6 minutos
Rango de operación de enzima:	0.5-4.0 AGU/mL

[0238] El principio de análisis se describe por 3 pasos de reacción:

La etapa 1 es una reacción enzimática:

50 Glucoamilasa (AMG), EC 3,2,1,3 (exo-alfa-1,4-glucoamiloglucanohidrolasa), hidroliza maltosa para formar alfa-D-glucosa.

Tras la incubación, la reacción se detiene con NaOH.

Las etapas 2 y 3 suponen una reacción de punto final:

La glucosa se fosforila por ATP, en una reacción catalizada por hexoquinasa.

55 El glucosa-6-fosfato formado se oxida para convertirse en 6-fosfogluconato por deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato.

En esta misma reacción, una cantidad equimolar de NAD⁺ se reduce a NADH con un aumento resultante en la absorbancia a 340 nm.

ES 2 656 556 T3

Se puede utilizar un sistema de autoanizador 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 ± 1°C
Tiempo de reacción	420 seg
Longitud de onda	340 Nm

Actividad de alfa-amilasa ácida

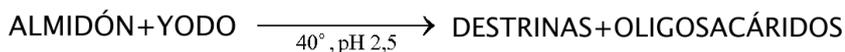
5 [0239] Cuando se usa según la presente invención la actividad de cualquier alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa ácida fúngica). Alternativamente, la actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en KNU (Kilo unidades de Novozymes (Termamyl SC)).

10 Actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)

[0240] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades alfa-amilasa 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 abajo.

15 [0241] La 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.
20 La intensidad de color formada con yodo es directamente proporcional a la concentración de almidón. La actividad amilasa se determina utilizando colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón bajo las condiciones analíticas específicas.

ALFA - AMILASA



$$\lambda = 590 \text{ nm}$$

azul/violeta

t = 23 seg.

menos color

25

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
Rango de operación de enzima:	0.01-0.04 AFAU/mL

[0242] Una carpeta EB-SM-0259.02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible bajo petición para Novozymes A/S, Dinamarca, cuya carpeta está incluida en la presente por referencia.

30 Manipulaciones de ADN

[0243] A menos que se declare de otro modo, manipulaciones y transformaciones de ADN se realizaron utilizando métodos estándar de biología molecular como se describen 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. and Cutting, S. M. (eds.).

Secuenciación del ADN

- 5 [0244] La transformación de *E. Coli* para secuenciación del ADN se efectuó por electroporación (gen BIO-RAD pulsador) o químicamente.
 Los plásmidos de ADN fueron preparados por el método alcalino Molecular Cloning, Cold Spring Harbor) o con el Qiagen® Plasmid Kit.
 10 Los fragmentos de ADN fueron recuperados de gel de agarosa por el equipo de extracción de gel Qiagen.
 PCR fue realizado utilizando un motor de ADN PTC-200.
 Se usó el analizador genético ABI PRISMTM 310 para determinar todas las secuencias de ADN.

Medios

- 15 [0245] YP-2% maltosa se compuso por 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona y 20 g/L de maltosa.
 [0246] El medio MLC se compuso por 40 g/L de glucosa, 50 g/L polvo de soja, 4 g/L ácido cítrico, pH 5.0.
 20 [0247] El medio M410 estaba compuesto por 50 g/L maltosa-1H₂O, 8 g/L extracto de levadura, 2 g/L MgSO₄.7H₂O, 4 g/L ácido cítrico-1H₂O, 50 g/L glucosa, 2 g/L K₂HPO₄, 0.5 ml/L solución de metal traza de AMG, y 2 g/L urea, pH 4.5.
 La solución de metales traza AMG estaba compuesta por 13.9 g/L FeSO₄.7H₂O, 13.5 g/L MnSO₄.1H₂O, 6.8 g/L ZnCl₂.2.5 g/L CuSO₄.5H₂O, 0.24 g/L NiCl₂.6H₂O y 3 g/L ácido cítrico.
 25 [0248] A menos que se declare 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 al menos calidad reactiva.

30 Enzimas

Glucoamilasas:

- 35 [0249] Glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* como se ha descrito en la SEQ ID N.º: 2 de la presente invención
 [0250] La glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* (que se ha descrito en la publicación internacional WO 99/28448 como la SEQ ID N.º: 7)
 40 [0251] La glucoamilasa de *Aspergillus niger* (uniprot:P69328) (que se describe en Svensson et al., 1986, "Characterization of a glucoamylase G2 from *Aspergillus niger*"; Eur.J. Biochem. 154:497-502)
 [0252] La glucoamilasa de *Trametes cingulata* como se ha descrito en la SEQ ID N.º: 2 en la WO 2006/069289 y disponible de Novozymes A/S.

45 Alfa-amilasas:

- [0253] La alfa-amilasa ácida descrita como variante JA001 en la publicación internacional WO 2005/003311
 50 [0254] La alfa-amilasa producida de *Bacillus licheniformis*, p. Ej Termamyl™ SC (alfa-amilasa disponible comercialmente de Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca).
 [0255] La alfa-amilasa híbrida que consiste en alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa y SBD de *Aspergillus niger* descrito como V039 en la tabla 5 en la WO 2006/069290 (Novozymes A/S)
 55 [0256] La alfa-amilasa A: alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (SEQ ID N.º: 3 en EP 1023439 B1) con las mutaciones I181*+G182*+N193F truncadas en 491 aminoácidos mostrados como la SEQ ID N.º: 6 en la WO2011/082425.
 60 [0257] La amilasa alfa 1407: alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (SEQ ID N.º: 3 en EP1023439B1) con las mutaciones I181*+G182*+N193F+V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+ H208Y+K220P+N224L+Q254S truncadas en 491 aminoácidos (ver también WO2011/082425).

[0258] La proteasa 196: metalo proteasa derivada de *Thermoascus aurantiacus* CGMCC n° 0670 descrita como aminoácidos 1-177 en la SEQ ID N.º: 2 en la WO 2003/048353 con las mutaciones siguientes: A27K+D79L+Y82F+S87G+D104P+A112P+A126V+D142L (ver también WO 2011/072191).

5 **Ejemplo 1:** clonación de gen de glucoamilasa de cepa de *Penicillium oxalicum*

Preparación de ADNc de cepa de *Penicillium oxalicum*

10 [0259] El ADNc fue sintetizado siguiendo la instrucción del sistema de amplificación rápida de extremo 3' de ADNc (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA).

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

15 [0260] El gen de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* fue clonado utilizando el cebador oligonucleótido mostrado a continuación diseñado para amplificar el gen de glucoamilasa del extremo 5'.

[0261] Cebador sentido: 5'-ATGCGTCTCACTCTATTATCAGGTG-3' (SEQ ID N.º: 4)

20 [0262] El gen de longitud total fue amplificado por PCR con cebador sentido y AUAP (suministrado por Amplificación rápido de sistema de extremo 3' de ADNc) usando Platinum HIFI Taq ADN polimerasa (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA).

La reacción de amplificación estaba compuesta por 5 µl de tampón 10x de PCR, 2 µl MgCl₂ de 25mM, 1 µl de 10 mM dNTP, 1 µl de cebador de sentido de 10µM, 1 µl de AUAP de 10 uM, 2 µl de ADNc de primera cadena, 0.5 µl de Taq de HIFI y 37.5 µl de agua desionizada.

25 El programa de PCR fue: 94°C, 3mins; 10 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 60°C 40 segundos con una reducción de 1°C por ciclo, 68°C durante 2min; 25 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 50°C durante 40 segundos, 68°C durante 2 min; extensión final a 68°C durante 10 min.

30 [0263] El fragmento de PCR obtenido fue clonado 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 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 plásmido AMG 1 (designado NN059173) fue depositado en la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos de Células GmbH (DSMZ) e 23 de noviembre de 2009 y se le asignó un número de depósito como DSM 23123.

35

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

40 [0264] El gen de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* fue reclonado desde el plásmido AMG 1 en un vector de expresión *Aspergillus* por PCR usando dos cebadores de clonación F y cebador R mostrados a continuación, que fueron diseñados basados en la secuencia conocida y etiquetas adicionales para clonación directa mediante la estrategia de IN-FUSION™.

Cebador F: 5' ACACAAGTGGGATCCACCATGCGTCTCACTCTATTATC (SEQ ID N.º: 5)

Cebador R: 5' AGATCTCGAGAAGCTTAAACTGCCACACGTCGTTGG (SEQ ID N.º: 6)

45 [0265] Una reacción por PCR fue realizada con plásmido AMG 1 para amplificar el gen en toda su longitud.

La reacción por PCR estaba compuesta por 40 µg del plásmido AMG 1 ADN, 1 µl de cada cebador (100 µM); 12,5 µl de mezcla maestra de 2X extensor de alta fidelidad (Extensor Hi-Fidelity MAster Mix, ABgene, Reino Unido), y 9,5 µl de agua de grado PCR.

50 La reacción por PCR fue realizada utilizando una máquina de PCR DYAD (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU) programada para 2 minutos a 94°C seguidos de un 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.

55 [0266] Los productos reactivos fueron aislados por 1.0% electroforesis en gel de agarosa utilizando tampón TAE 1 x donde se extrajo una banda de producto de PCR de aproximadamente 1.9 kb de gel y se purificó utilizando el equipo de purificación de banda de gel y ADN para PCR (Healthcare GE, Reino Unido) según las instrucciones del fabricante. El ADN que corresponde con el gen de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* fue clonado en un vector de expresión *Aspergillus* linealizado con *BamHI* e *HindIII*, utilizando un equipo de clonación IN-FUSION™ Dry-Down PCR Cloning kit (BD Biociences, Palo Alto, CA, USA) según las instrucciones del fabricante. La construcción de vector linealizado es como se describe en la WO 2005/042735 A1.

60

[0267] Un 2 µl de volumen de la mezcla de ligamiento se usó para transformar 25 µl de células Fusion Blue E. Coli (incluido en el IN-FUSION™ Dry-Down PCR Clonign Kit).

65 Después de un choque térmico a 42°C durante 45 seg. y enfriamiento en el hielo, 250 µl de medio de SOC fue añadido y las células fueron incubadas a 37°C a 225 r.p.m. Durante 90 min antes de ser colocadas en placas en las placas de agar LB que contienen 50 µg de ampicilina por ml y cultivadas durante toda la noche a 37°C. Las

colonias seleccionadas fueron inoculadas en 3 ml de medio LB suplementado con 50 µg de ampicilina por ml e incubadas a 37°C a 225 r.p.m. durante toda la noche.

El ADN plásmido de las colonias seleccionadas fue purificado utilizando Mini JETSTAR (Genomed; Alemania) según las instrucciones del fabricante.

5 La secuencia de genes de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se verificó mediante la secuenciación de Sanger antes de la expresión heteróloga.

Uno de los plásmidos se seleccionó para expresión posterior y se denominó XYZ XYZ1471-4.

[0268] Los protoplastos de *Aspergillus niger* MBin118 fueron preparados como se describe en la WO 95/02043.

10 El cien µl de suspensión de protoplasto fueron mezclados con 2,5 µg del XYZ1471-4 plásmido y 250 microlitros de 60% PEG 4000 (Applichem) (polietilenglicol, peso molecular 4,000), 10 mM CaCl₂ y 10 mM pH Tris-HCl 7,5 fueron adicionados y suavemente mezclados.

15 La mezcla fue incubada a 37°C durante 30 minutos y los protoplastos fueron mezclados con 6% de agarosa de fusión baja (Biowhittaker Molecular Applications) en la sacarosa de COVE (Cove, 1996, Biochim.Biophys.Acta 133:51-56) (1 M) placas suplementadas con 10 mM de acetamida y 15 mM de CsCl y adicionadas como una capa superior en la sacarosa de COVE (1 M) placas suplementadas con 10 mM de acetamida y 15 mM de CsCl para la selección de transformantes (4 ml agar superior por placa).

20 Tras la incubación durante 5 días a 37°C, las esporas de dieciséis transformantes fueron recogidas y sembradas en 750 µl YP-2% de medio de maltosa en placas MT de 96 pocillos.

Después de 5 días de cultivo fijo a 30°C, 10 µl del caldo de cultivo de cada pocillo fueron analizados en un SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio) gel, Griton XT Precast (BioRad, CA, EE.UU) para identificar los mejores transformantes basados en la capacidad para producir gran cantidad de glucoamilasa.

25 Un transformante seleccionado fue identificado en la placa de transformación original y fue conservado como esporas en una 20% de materia prima de glicerol y se almacenó congelado (-80°C).

[0269] Cultivo. El transformante seleccionado fue inoculado en 100 ml de medios MLC y cultivado a 30°C durante 2 días en frascos de agitación de 500 ml en un agitador rotatorio. 3 ml del caldo de cultivo fue inoculado a 100 ml de medio M410 y cultivado a 30°C durante 3 días.

30 El caldo de cultivo fue centrifugado y el sobrenadante fue filtrado utilizando filtros de membrana 0.2 µm.

[0270] Gel de afinidad de alfa-ciclodextrina. Diez gramos de polvo de sefarsosa 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.

35 El gel se suspendió en solución de acoplamiento (100 ml de 12.5 mg/ml de alfa-ciclodextrina, 0.5 M NaOH) 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, suspendido en 100 ml de 1 M etanolamina, pH 10 e incubado a 50°C durante 4 horas para el bloqueo.

El gel se lavó luego varias veces utilizando 50 mM Tris-HCl, pH 8 y 50 mM NaOAc, pH 4.0 alternativamente.

40 El gel finalmente se envasó en una columna de 35-40 ml usando un tampón de equilibrado (50 mM NaOAc, 150 mM NaCl, pH 4.5).

[0271] La purificación de glucoamilasa de caldo de cultivo. El caldo de cultivo de fermentación de *A. niger* MBin118 que contiene el gen de glucoamilasa se filtró a través de un 0.22 µm filtro PES, y aplicado en una columna de gel de afinidad de alfa-ciclodextrina previamente equilibrada en 50 mM NaOAc, 150 mM NaCl, tampón de pH 4.5.

El material no unido se lavó fuera de la columna con tampón de equilibrado y la glucoamilasa se eluyó usando el mismo tampón que contenía 10 mM de beta-ciclodextrina sobre 3 volúmenes de columna.

50 [0272] La actividad de glucoamilasa del eluyente fue controlada para ver si la glucoamilasa se había unido al gel de afinidad de alfa-ciclodextrina.

La muestra de glucoamilasa purificada fue luego dializada contra 20 mM de NaOAc, pH 5.0.

La pureza fue controlada finalmente por SDS-PAGE y solo se descubrió una única banda.

55 **Ejemplo 3:** construcción y expresión de una variante dirigida al sitio de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*

[0273] Se realizaron dos reacciones PCR con plásmido XYZ1471-4, descritas en el ejemplo 2, usando cebadores K79V F y K79V R mostrados a continuación, que se diseñaron para sustituir la lisina (K) en la posición 79 de la secuencia madura a 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 clonación directa mediante la estrategia IN-FUSION™.

Cebador K79V F 18mer GCAGTCTTTCCAATTGAC (SEQ ID N.º: 7)

Cebador K79V R 18mer AATTGGAAAGACTGCCCG (SEQ ID N.º: 8)

Cebador F-NP003940: 5' ACACAACCTGGGGATCCACCATGCGTCTCACTCTATTATC (SEQ ID N.º: 9)

65 Cebador R-NP003940: 5' AGATCTCGAGAAGCTTAAACTGCCACACGTCGTTGG (SEQ ID N.º: 10)

[0274] El PCR fue realizado utilizando un PTC-200 motor de ADN bajo las condiciones descritas abajo.

Sistema de reacción PCR:		Condiciones:		
48. 5 micro L	H2O	1	94°C	2 Min
2 Perlas	El Taq puro Ready-To-Go PCR	2	94°C	30 Seg
Perlas (Amersham bioscience)		3	55°C	30 Seg
0.5 Micro L X 2 Cebadores	100 Pmol/micro L	4	72°C	90 Seg
		2-4	25 Ciclos	
(K79V F + cebador R- NP003940; 0.5 Micro L	K79V R + cebador F-NP003940) Modelo ADN	5	72°C	10 Min

5 [0275] Los fragmentos de ADN se recuperaron de gel de agarosa mediante el equipo de extracción de gel Qiagen según la instrucción del fabricante.

Los dos fragmentos purificados resultantes se clonaron en un vector de expresión *Aspergillus* linealizado con *BamHI* e *HindIII*, utilizando un equipo de clonación IN-FUSION™ Dry-Down PCR Cloning Kit (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE.UU) según las instrucciones del fabricante.

10 La construcción de vector linealizado es como se describe en la WO 2005/042735 A1.

[0276] La mezcla de ligamiento se usó para transformar células *E. Coli* DH5α (TOYOBO). Las colonias seleccionadas se inocularon en un medio de 3 ml LB suplementado con 50 µg de ampicilina por ml y se incubaron a 37°C a 225 r.p.m. durante toda la noche.

15 El ADN plasmídico de las colonias seleccionadas se purificó utilizando el equipo Qiagen plasmid mini Kit (Qiagen) según las instrucciones del fabricante.

La secuencia de secuencia de genes variante dirigida al sitio de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se verificó antes de la expresión heteróloga y uno de los plásmidos se seleccionó para expresión posterior y se denominó pPoPE001.

20 [0277] Los protoplastos de *Aspergillus niger* MBin118 se prepararon como se describe en la WO 95/02043.

Cien µl de suspensión de protoplasto fueron mezclados con 2,5 µg del pPoPE001 plásmido y 250 microlitros de 60% PEG 4000 (Applichem) (polietilenglicol, peso molecular 4,000), 10 mM CaCl₂ y 10 mM pH Tris-HCl 7,5 fueron adicionados y suavemente mezclados.

25 La mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos y los protoplastos se mezclaron con 1% de agarosa L (Nippon Gen) en la sacarosa COVE (Cove, 1996, Biochim.Biophys.Acta 133:51-56) suplementado con 10 mM de acetamida y 15 mM de CsCl y añadido como una capa superior en las placas de sacarosa de COVE suplementadas con 10 mM de acetamida y 15 mM de CsCl para selección de transformantes (4 ml agar superior por placa).

30 Tras la incubación durante 5 días a 37°C, las esporas de dieciséis transformantes se recogieron y sembraron en 750 µl de medio YP-2% con maltosa en placas MT de 96 pocillos.

Después de 5 días de cultivo fijo a 30°C, se analizaron 10 µl del caldo de cultivo de cada pocillo en un gel SDS-PAGE para identificar los mejores transformantes basados en la capacidad para producir gran cantidad de la glucoamilasa.

35 **Ejemplo 4:** purificación de la variante de Po AMG PE001 dirigida al sitio

[0278] El transformante seleccionado de la variante y la cepa que expresa la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* tipo salvaje descrita en el ejemplo 1 fue cultivado en un medio de 100 ml de YP- 2% de maltosa y el cultivo se filtró a través de un filtro PES de 0.22 µm y se aplicó en una columna de gel de afinidad de alfa-ciclodextrina previamente equilibrada en 50 mM NaOAc, 150 mM NaCl, tampón de pH 4.5.

El material no unido se lavó fuera de la columna con tampón de equilibrado y la glucoamilasa fue eluida usando el mismo tampón que contiene 10 mM de beta-ciclodextrina sobre 3 volúmenes de columna.

45 [0279] La actividad de glucoamilasa del eluyente fue controlada para ver si la glucoamilasa se había unido al gel de afinidad de alfa-ciclodextrina.

Las muestras de glucoamilasa purificada luego se dializaron contra 20 mM NaOAc, pH 5.0.

50 **Ejemplo 5:** caracterización de PE001

Estabilidad de proteasa

[0280] 40 µl soluciones enzimáticas (1 mg/ml) en tampón de acetato sódico de 50 mM, pH 4.5 fue mezclado con 1/10 volumen de soluciones de proteasa de 1 mg/ml tal como aspergillopepsinI descrito en Biochem J. 147(1):45-

53 (1975) o el producto comercialmente disponible de Sigma y aorsin descrito en Ichishima, 2003, Biochemical Journal 371 (2): 541 e incubado a 4 o 32°C durante toda la noche.

Como un Experimento de control, H₂O se añadió a la muestra en vez de proteasas.

Las muestras fueron cargadas en SDS-PAGE para ver si las glucoamilasas se dividen por proteasas.

5 [0281] En SDS-PAGE, PE001 solo mostró una banda que corresponde con la molécula intacta, mientras la glucoamilasa tipo salvaje fue degradada por proteasas y mostró una banda a tamaño molecular inferior a 60 kDa.

10 Tabla 1 el resultado de SDS-PAGE después del tratamiento de proteasa

Proteasa	Glucoamilasa tipo salvaje				PE001				Control
	aspergillopepsina I		aorsin		aspergillopepsina I		aorsin		
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 dividida (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 escisión durante el cultivo

15 [0282] El transformante de *Aspergillus* de la variante y la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* tipo salvaje fueron cultivados en placas MT de 6 pocillos que contienen medio YP con maltosa al 2 % diluida 4x suplementado con 10 mM tampón de acetato sódico, pH 4.5, a 32°C durante 1 semana.

[0283] Los sobrenadantes de cultivo fueron cargados en SDS-PAGE.

20 Tabla 2 El resultado de SDS-PAGE de los sobrenadantes de cultivo

	Glucoamilasa tipo salvaje	PE001
Glucoamilasa intacta (ca. 70 KDa)	90%	100%
Glucoamilasa dividida (ca. 60 KDa)	10%	N.D.

N.D.: no detectado.

25 [0284] La glucoamilasa tipo salvaje fue dividida por proteasas huéspedes durante la fermentación, mientras la variante produjo solo moléculas intactas.

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

30 [0285] La actividad de glucoamilasa medida como AGU como se ha descrito anteriormente fue controlada para las enzimas purificadas del *Penicillium oxalicum* tipo salvaje y la glucoamilasa variante.

[0286] 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).

35 Tabla 3

Actividad específica relativa	AGU/mg
Peso de <i>Penicillium oxalicum</i>	100%
<i>Penicillium oxalicum</i> PE001	102%

Ejemplo 8: proceso de SSF y licuefacción de maíz entero utilizando la variante PE001 de *P.oxalicum* AMG

40 [0287] La variante de *Penicillium oxalicum* AMG (PoAMG), PE001, que muestra sensibilidad reducida para degradación de proteasa se evaluó en ambos licuefacción de maíz entero y sacarificación de almidón (mostrados en la sección siguiente).

Para las licuefacciones de maíz entero, la enzima PE001 se añadió en dosis diferentes con una variante de amilasa de pH bajo, amilasa alfa 1407.

45 En algunas licuefacciones, la variante PE001 fue evaluada con ambos la alfa amilasa de pH bajo 1407 y la proteasa termoestable Proteasa 196.

En todos los experimentos, las licuefacciones se hicieron utilizando el sistema automatizado llamado el "Lab-O-Mat". Este instrumento controla la temperatura y proporciona una mezcla constante.

Las otras condiciones experimentales fueron: pH fue 4.8 (para los licuefactos que contienen la amilasa de pH bajo AA1407) o 5.8 (para el control de alfa amilasa), 32% de sólidos secos, 85°C, tiempo total de 2 horas.

Los esquemas de dosificación de enzima se muestran en la tabla 4. Las trituras licuadas fueron sacarificadas y fermentadas utilizando una composición que comprende *Talaromyces emersonii* AMG como la actividad principal y *Trametes cingulata* AMG e híbrido AA como actividades laterales (80%/19%/1%) a una dosis de 0.5 AGU/gramo de sólidos secos durante 54 horas a 32°C.

Tabla 4. El esquema de dosificación de enzima para los tres experimentos de licuefacción de maíz entero realizados utilizando la variante estable de corte de proteasa PoAMG, PE001.

Amilasa (dosis)	Proteasa (dosis)	PoAMG (dosis)
Alfa-amilasa A (0.02% p/p maíz)	Ninguna	Ninguna
AA 1407 (1.4 µg EP/g DS)	Ninguna	Ninguna
AA 1407 (1.4 µg EP/g DS)	Ninguna	PoAMG peso (P3HK) (10 µg EP/g DS)
AA 1407 (1.4 µg EP/g DS)	Ninguna	PoAMG PE001 (10 µg EP/g DS)
AA 1407 (1.4 µg EP/g DS)	Proteasa 196 (1 µg EP/g DS)	PoAMG peso (P3HK) (10 µg EP/g DS)
AA 1407 (1.4 µg EP/g DS)	Protease196 (1 µg EP/g DS)	PoAMG PE001 (10 µg EP/g DS)

[0288] Los títulos de etanol cuantificado de HPLC (en gramos por litro) se muestran en la tabla 4.

Tabla 5. Promedio de títulos de etanol y desviaciones estándar asociadas, en gramos por litro. La Proteasa196 es una proteasa estable de temperatura descrita en la WO 2011/072191 y AA 1407 es una amilasa de pH bajo descrita en la WO 2011/082425.

Tratamiento	Etanol (media ± desviación típica; gramos/litro)
Alfa-amilasa A control	126.4 ± 0.3
AA 1407 control de variante de amilasa de pH bajo	126.7 ± 0.3
PoAMG tipo salvaje (P3HK; 10 µg EP/g DS)	127.2 ± 0.4
PE001 Variante (10 µg EP/g DS)	127.1 ± 0.5
PoAMG tipo salvaje P3HK (10 µg EP/g DS) + Protease196 proteasa (1 µg EP/g DS)	127.6 ± 0.4
PE001 Variante (10 µg EP/g DS) + Proteasa196 proteasa (1 µg EP/g DS)	127.7 ± 0.2

Ejemplo 9: caracterización de estabilidad de proteasa de variantes con sustituciones alternativas en la posición 79

[0289] Las variantes que comprenden sustituciones en la posición 79 de la SEQ ID N.º: 2; K79A, K79G, K79I, K79L, K79S, K79T fueron construidas como se describe en el ejemplo 3 utilizando los cebadores apropiados.

[0290] Cada una de las variantes se cultivó y purificó como se describe en el ejemplo 4 y la estabilidad de proteasa se evaluó como se describe abajo.

Estabilidad de proteasa

[0291] 20 µl de solución enzimática (1 mg/ml) en un tampón de acetato sódico de 50 mM, pH 4.5 se mezcló con 1/10 volumen de soluciones de proteasa de 1 mg/ml, tal como aorsin descrito en Ichishima, 2003, Biochemical Journal 371: 541) e incubado a -20 o 37°C durante toda la noche.

Como un experimento de control, se añadió H₂O a la muestra en vez de proteasas.

Las muestras fueron cargadas en SDS-PAGE para ver si las variantes de glucoamilasa se dividen por proteasas.

[0292] En SDS-PAGE, todas las variantes solo mostraron una banda que corresponde con la molécula intacta (70 kDa), mientras la glucoamilasa tipo salvaje fue degradada y mostró una banda a un tamaño molecular inferior a 60 kDa.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S
Matsui, Tomoko
Clark, Suzanne

<120> Variantes de glucoamilasa y polinucleótidos que codifican la misma

ES 2 656 556 T3

<130> 12191-WO-PCT

<160> 10

5 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1851

10 <212> ADN

<213> Penicillium oxalicum

<400> 1

15 atgctgtctca ctctattatc aggtgtagcc ggcgttctct gcgcaggaca gctgacggcg 60

gcgcgtcctg atcccaaggg tgggaatctg acgccgttca tccacaaaga gggcgagcgg 120

tcgctccaag gcattcttga caatctcggg gggcgaggta agaaaacacc cggcactgcc 180

20 gcagggttgt ttattgccag tccaaacaca gagaatccaa actattatta tacatggact 240

cgtgactcag ctttgactgc caagtgcttg atcgacctgt tcgaagactc tcgggcaaag 300

tttccaattg accgcaaata cttggaaaca ggaattcggg actacgtgtc gtcccaagca 360

25 atcctccaga gtgtgtctaa tccttctgga accctgaagg atggctctgg tctgggtgaa 420

cccaagtttg agattgacct gaatcccttt tcgggtgctt ggggtcggcc tcagcgggat 480

30 ggcccagcgc tgcgagcgac cgctatgata acctacgcca actacctgat atcccatggt 540

cagaaatcgg atgtgtcaca ggtcatgtgg ccgattattg ccaatgatct agcatatggt 600

ggtcaatact ggaataatac cggatttgac ctgtgggaag aggtggatgg gtcaagcttt 660

35 ttcacgattg cggcaccaga ccgagccctt gttgaaggct cgcaactggc gaaaagctc 720

ggcaagtctt gcgatgcctg tgattctcag cctccccaga tatttggttt cctgcagagt 780

40 ttctggaacg gaaagtacat cacctccaac atcaacacgc aagcaagccg ctctggatc 840

gacctggact ctgtcctggg aagcattcat acctttgatc ccgaagcagc ctgtgacgat 900

gcaactttcc agccttgttc tgcccgcgct ctggcgaacc acaaggtcta tgtggattcc 960

45 ttccgctcta tctacaagat taatgcgggt cttgcagagg gatcggctgc caacgttggc 1020

cgctaccccg aggatgttta ccaaggaggc aatccatggt atctcgccac cctaggcgca 1080

50 tctgaattgc tttacgacgc cttgtaccag tgggacagac ttggcaaact tgaagtctcg 1140

gagacctcgt tgtcattctt caaagacttt gacgcgaccg tgaatttgg ctctactcgc 1200

aggaacagca agacctaaa gaaattgacc cagtccatca agtcgtacgc ggacgggttc 1260

55 atccagttag tgcagcagta cactccttct aatggatctc tggccgagca atacgatcgc 1320

aatacggctg ctctctctc tgcaaacgat ctgacttggg catttgctc tttcttgacg 1380

60 gctacgcaac gccgcgatgc cgtggttctt cctcctggg gcgcaaagtc ggcaaacaaa 1440

gtcccaacca cttgttcagc ctcccctggt gtgggtactt ataaggcgcc cacggcaact 1500

ttctcatcca agactaagtg cgtccccgct aaagatattg tgcctatcac gttctacctg 1560

65 attgagaaca cttactatgg agagaacgct tcatgagtg gcaacattac tgcgctgggt 1620

ES 2 656 556 T3

```

aactgggacg ccaagaaagg cttcccactc accgcaaacc tctacacgca agatcaaaac      1680
ttgtggttcg ccagtgtcga gttcatccca gcaggcacac cctttgagta caagtactac      1740
5 aaggtcgcgc ccaatggcga tattacttgg gagaagggtc ccaaccgggt gttcgtcgct      1800
cccacgggat gcccagttca gcctcactcc aacgacgtgt ggcagttttg a                1851

10 <210> 2
    <211> 616
    <212> PRT
    <213> Penicillium oxalicum

15 <400> 2

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

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

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

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

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

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

45 Ser Arg Ala Lys Phe Pro Ile Asp Arg Lys Tyr Leu Glu Thr Gly Ile
          100          105          110

50 Arg Asp Tyr Val Ser Ser Gln Ala Ile Leu Gln Ser Val Ser Asn Pro
          115          120          125

55 Ser Gly Thr Leu Lys Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu
          130          135          140

60 Ile Asp Leu Asn Pro Phe Ser Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp
145          150          155          160

65 Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile Thr Tyr Ala Asn Tyr Leu
          165          170          175

70 Ile Ser His Gly Gln Lys Ser Asp Val Ser Gln Val Met Trp Pro Ile
          180          185          190

75 Ile Ala Asn Asp Leu Ala Tyr Val Gly Gln Tyr Trp Asn Asn Thr Gly
          195          200          205

```

ES 2 656 556 T3

Phe Asp Leu Trp Glu Glu Val Asp Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile Ala
 210 215 220

5

Val Gln His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser Gln Leu Ala Lys Lys Leu
 225 230 235 240

10

Gly Lys Ser Cys Asp Ala Cys Asp Ser Gln Pro Pro Gln Ile Leu Cys
 245 250 255

15

Phe Leu Gln Ser Phe Trp Asn Gly Lys Tyr Ile Thr Ser Asn Ile Asn
 260 265 270

20

Thr Gln Ala Ser Arg Ser Gly Ile Asp Leu Asp Ser Val Leu Gly Ser
 275 280 285

25

Ile His Thr Phe Asp Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp Ala Thr Phe Gln
 290 295 300

30

Pro Cys Ser Ala Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Val Tyr Val Asp Ser
 305 310 315 320

35

Phe Arg Ser Ile Tyr Lys Ile Asn Ala Gly Leu Ala Glu Gly Ser Ala
 325 330 335

40

Ala Asn Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Gln Gly Gly Asn Pro
 340 345 350

45

Trp Tyr Leu Ala Thr Leu Gly Ala Ser Glu Leu Leu Tyr Asp Ala Leu
 355 360 365

50

Tyr Gln Trp Asp Arg Leu Gly Lys Leu Glu Val Ser Glu Thr Ser Leu
 370 375 380

55

Ser Phe Phe Lys Asp Phe Asp Ala Thr Val Lys Ile Gly Ser Tyr Ser
 385 390 395 400

60

Arg Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Lys Leu Thr Gln Ser Ile Lys Ser Tyr
 405 410 415

65

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

70

Ser Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Arg Asn Thr Ala Ala Pro Leu Ser Ala
 435 440 445

75

Asn Asp Leu Thr Trp Ser Phe Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Gln Arg
 450 455 460

80

Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Ser Trp Gly Ala Lys Ser Ala Asn Lys
 465 470 475 480

ES 2 656 556 T3

Val Pro Thr Thr Cys Ser Ala Ser Pro Val Val Gly Thr Tyr Lys Ala
 485 490 495
 5
 Pro Thr Ala Thr Phe Ser Ser Lys Thr Lys Cys Val Pro Ala Lys Asp
 500 505 510
 10
 Ile Val Pro Ile Thr Phe Tyr Leu Ile Glu Asn Thr Tyr Tyr Gly Glu
 515 520 525
 15
 Asn Val Phe Met Ser Gly Asn Ile Thr Ala Leu Gly Asn Trp Asp Ala
 530 535 540
 20
 Lys Lys Gly Phe Pro Leu Thr Ala Asn Leu Tyr Thr Gln Asp Gln Asn
 545 550 555 560
 25
 Leu Trp Phe Ala Ser Val Glu Phe Ile Pro Ala Gly Thr Pro Phe Glu
 565 570 575
 30
 Tyr Lys Tyr Tyr Lys Val Glu Pro Asn Gly Asp Ile Thr Trp Glu Lys
 580 585 590
 35
 Gly Pro Asn Arg Val Phe Val Ala Pro Thr Gly Cys Pro Val Gln Pro
 595 600 605
 40
 His Ser Asn Asp Val Trp Gln Phe
 610 615
 <210> 3
 <211> 595
 <212> PRT
 <213> Penicillium oxalicum
 <400> 3
 45
 Arg Pro Asp Pro Lys Gly Gly Asn Leu Thr Pro Phe Ile His Lys Glu
 1 5 10 15
 50
 Gly Glu Arg Ser Leu Gln Gly Ile Leu Asp Asn Leu Gly Gly Arg Gly
 20 25 30
 55
 Lys Lys Thr Pro Gly Thr Ala Ala Gly Leu Phe Ile Ala Ser Pro Asn
 35 40 45
 60
 Thr Glu Asn Pro Asn Tyr Tyr Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Ala Leu
 50 55 60
 65
 Thr Ala Lys Cys Leu Ile Asp Leu Phe Glu Asp Ser Arg Ala Val Phe
 65 70 75 80
 70
 65
 Pro Ile Asp Arg Lys Tyr Leu Glu Thr Gly Ile Arg Asp Tyr Val Ser
 85 90 95

ES 2 656 556 T3

Ser Gln Ala Ile Leu Gln Ser Val Ser Asn Pro Ser Gly Thr Leu Lys
 100 105 110
 5

Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu Ile Asp Leu Asn Pro
 115 120 125
 10

Phe Ser Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg
 130 135 140
 15

Ala Thr Ala Met Ile Thr Tyr Ala Asn Tyr Leu Ile Ser His Gly Gln
 145 150 155 160
 20

Lys Ser Asp Val Ser Gln Val Met Trp Pro Ile Ile Ala Asn Asp Leu
 165 170 175
 25

Ala Tyr Val Gly Gln Tyr Trp Asn Asn Thr Gly Phe Asp Leu Trp Glu
 180 185 190
 30

Glu Val Asp Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile Ala Val Gln His Arg Ala
 195 200 205
 35

Leu Val Glu Gly Ser Gln Leu Ala Lys Lys Leu Gly Lys Ser Cys Asp
 210 215 220
 40

Ala Cys Asp Ser Gln Pro Pro Gln Ile Leu Cys Phe Leu Gln Ser Phe
 225 230 235 240
 45

Trp Asn Gly Lys Tyr Ile Thr Ser Asn Ile Asn Thr Gln Ala Ser Arg
 245 250 255
 50

Ser Gly Ile Asp Leu Asp Ser Val Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp
 260 265 270
 55

Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp Ala Thr Phe Gln Pro Cys Ser Ala Arg
 275 280 285
 60

Ala Leu Ala Asn His Lys Val Tyr Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr
 290 295 300
 65

Lys Ile Asn Ala Gly Leu Ala Glu Gly Ser Ala Ala Asn Val Gly Arg
 305 310 315 320
 70

Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Gln Gly Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Ala Thr
 325 330 335
 75

Leu Gly Ala Ser Glu Leu Leu Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp Arg
 340 345 350
 80

Leu Gly Lys Leu Glu Val Ser Glu Thr Ser Leu Ser Phe Phe Lys Asp

ES 2 656 556 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR	
5	<400> 4	
	atgcgtctca ctctattatc aggtg	25
10	<210> 5	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Cebador PCR	
	<400> 5	
20	acacaactgg ggatccacca tgcgtctcac tctattatc	39
	<210> 6	
	<211> 37	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR	
30	<400> 6	
	agatctcgag aagcttaaaa ctgccacacg tcggttg	37
35	<210> 7	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador PCR	
	<400> 7	
45	gcagtctttc caattgac	18
	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador PCR	
55	<400> 8	
	aattgaaag actgcccg	18
	<210> 9	
60	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
65	<223> Cebador PCR	
	<400> 9	

ES 2 656 556 T3

acacaactgg ggatccacca tgcgtctcac tctattatc

39

5 <210> 10
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cebador PCR

<400> 10
agatctcgag aagcttaaaa ctgccacacg tcggtgg

37

REIVINDICACIONES

- 5 1. Variante de glucoamilasa, que comprende una sustitución al menos en una posición que corresponde con posiciones 79 del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2, donde la variante tiene actividad de glucoamilasa y donde la variante se selecciona del grupo que consiste en:
- a) un polipéptido con al menos un 85% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2;
 - b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 85% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1; y
 - 10 c) un fragmento del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2, que tiene actividad de glucoamilasa.
2. Variante, según la reivindicación 1, donde el número de sustituciones es 1-20, por ejemplo, 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones.
- 15 3. Variante según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la variante comprende una sustitución seleccionada de K79V, K79A, K79G, K79I, K79L, K79S, K79T.
4. Variante, según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la variante comprende la sustitución K79V.
- 20 5. Variante, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que tiene una propiedad mejorada relativa a la progenitora, donde la propiedad mejorada es sensibilidad reducida frente a degradación de proteasa.
6. Dominio catalítico de glucoamilasa variante que comprende una sustitución al menos en una posición que corresponde con posiciones 79 del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 y donde la variante es seleccionada del grupo que consiste en:
- (a) un dominio catalítico que tiene al menos un 85% de identidad de secuencia con aminoácidos 30 a 494 de la SEQ ID N.º: 2;
 - (b) un dominio catalítico codificado por un polinucleótido con al menos 85% de identidad de secuencia con (i)
 - 30 nucleótidos 88 a 1482 de la SEQ ID N.º: 1; y
- donde el dominio catalítico tiene actividad de glucoamilasa.
7. Composición que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 35 8. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la producción de jarabe y/o un producto de fermentación.
9. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la elaboración de cerveza.
- 40 10. Proceso de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye las etapas 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;
- 45 donde la etapa (a) y/o la etapa (b) se realiza usando al menos una glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
11. Proceso de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón, que incluye las etapas de:
- (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,
- 50 donde la etapa (a) se realiza usando al menos una glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 55 12. Polinucleótido aislado que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
13. Constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 12 operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.
- 60 14. Célula huésped recombinante que comprende el polinucleótido según la reivindicación 12 operativamente enlazada a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido.
15. Método para producir un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende:

- (a) cultivo de la célula huésped según la reivindicación 14 bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
- (b) recuperación del polipéptido.

- 5 16. Constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido según la reivindicación 12.
- 17. Vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 12.
- 18. Célula huésped que comprende el polinucleótido según la reivindicación 12.