

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 701**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.04.2014 PCT/EP2014/058692**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.11.2014 WO14177546**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2014 E 14723388 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2992092**

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

30 Prioridad:

**30.04.2013 EP 13165995**

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

**03.07.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TSUTSUMI, NORIKO;  
AYABE, KEIICHI y  
KISHISHITA, SIIK**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 674 701 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Variantes de glucoamilasa y polinucleótidos que las codifican

Referencia a un listado de secuencias

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

### 5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 [0002] La presente invención se refiere a variantes de glucoamilasa, polinucleótidos que codifican las variantes, métodos de producción de las variantes y métodos de uso de las variantes. También se describe el uso de glucoamilasas de la invención para conversión de almidón para producir productos de fermentación, tal como etanol y jarabes, tal como glucosa. La invención también se refiere a una composición que comprende una glucoamilasa de la invención.

Descripción de las técnicas relacionadas

15 [0003] La glucoamilasa (1,4-alfa-D-glucano 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 oligo y polisacárido relacionadas. Las glucoamilasas se producen por diferentes hongos filamentosos y levadura, con aquellos de *Aspergillus* que son comercialmente más importantes.

20 [0004] Comercialmente, las glucoamilasas se utilizan para convertir material que contiene almidón, que esté ya parcialmente hidrolizado por una alfa-amilasa, a glucosa. La glucosa puede luego ser convertida directa o indirectamente en un producto de fermentación utilizando un organismo fermentador. Los ejemplos de productos de fermentación comercial 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 succínico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico); cetonas (por ejemplo, de acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>) y compuestos más complejos con, por ejemplo, antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B<sub>12</sub>, beta-caroteno); hormonas y otros compuestos que son difíciles de producir sintéticamente. Los procesos de fermentación son también comúnmente usados en el alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), industria láctea (por ejemplo, en la producción de yogur y queso).

30 [0005] El producto final también puede ser jarabe. Por ejemplo, el producto final puede ser glucosa, pero también puede ser convertido, por ejemplo, por glucosa isomerasa a fructosa o una mezcla compuesta casi igualmente de glucosa y fructosa. 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.

35 [0006] Es un objeto de la presente invención proporcionar polipéptidos con actividad de glucoamilasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos y que proporcionan un alto rendimiento en los procesos de producción de producto de fermentación, tales como procesos de producción de etanol, que incluyen procesos de fermentación de etanol en una única fase de almidón crudo no gelatinizado (o sin cocinar).

[0007] La WO2011/068803 divulga glucoamilasas aisladas del hongo *Gloeofillum*. En particular, *Gloeofillum sepiarium* y *Gloeofillum trabeum*.

[0008] La presente invención proporciona variantes de glucoamilasa con propiedades mejoradas en comparación con su progenitora.

### 40 Resumen de la invención

45 [0009] La presente invención se refiere a una variante de glucoamilasa, que comprende una sustitución a una o más posiciones correspondientes a posiciones 95, 59, 119, y 121, del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3, donde la variante tiene actividad de glucoamilasa y donde la variante tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%, pero menos de la 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3, cuya variante comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que

consiste en 59A, 95P, 119W, y 121P, y donde la variante comprende al menos una de las siguientes sustituciones o combinaciones de sustituciones:

- 5 V59A;  
S95P;  
A121P;  
T119W;  
S95P + A121P;  
V59A + S95P;  
S95P + T119W;  
10 V59A + S95P + A121P; o  
S95P + T119W + A121 P; y donde las variantes han aumentado en termo-estabilidad en comparación con la glucoamilasa progenitora de la SEQ ID N.º: 3.

15 [0010] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifica las variantes; constructos de ácidos nucleicos, vectores y células huésped que comprenden los polinucleótidos; y métodos de producción de las variantes.

[0011] La presente invención se refiere además a composiciones que comprenden las glucoamilasas variantes de la invención.

[0012] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un uso de la glucoamilasa variante para producir un jarabe o un producto de fermentación.

20 [0013] En aspectos todavía adicionales, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye las etapas de:

- 25 (a) licuefacción de material que contiene almidón en presencia de una alfa amilasa;  
(b) sacarificación del material licuado; y  
(c) fermentación con un organismo fermentador;  
donde el paso (a) y/o paso (b) se realiza usando al menos una variante glucoamilasa de la invención.

[0014] En otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón, que incluye las etapas de:

- 30 (a) sacarificación de un 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,  
donde el paso (a) se realiza usando al menos una glucoamilasa variante de la invención.

#### Definiciones

35 [0015] La glucoamilasa: el término "glucoamilasa" (1,4-alfa-D-glucano glucohidrolasa, EC 3.2.1.3) se define como una enzima, que cataliza la liberación de D-glucosa de las extremidades no-reducidas de almidón o moléculas oligo y polisacáridas relacionadas. Para fines de la presente invención, la actividad de glucoamilasa se determina según el procedimiento descrito en los ejemplos de la presente. La unidad de glucoamilasa (AGU) se define como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándar 37°C, pH 4.3, sustrato: maltosa 23.2 mM, tampón: acetato 0.1 M, tiempo de reacción de 5 minutos.

40 [0016] Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, preferiblemente al menos 45%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 55%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 65%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, aún más preferiblemente al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95% e incluso de la forma más preferible al menos 100% de la actividad de glucoamilasa del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

45 [0017] En otra forma de realización, los polipéptidos de la presente invención tienen al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, preferiblemente al menos 45%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 55%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 65%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, aún más preferiblemente al menos 90% de la forma más preferible al menos 95%

e incluso de la forma más preferible al menos 100% de la actividad de glucoamilasa del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.

5 [0018] 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. 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.

10 [0019] ADNc: el término "ADNc" significa una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa a partir de una molécula, madura, insertada, de ARNm obtenida a partir de una célula eucariótica o procariótica. El ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. La transcripción de ARN inicial primaria es un precursor para ARNm que se procesa a través de una serie de etapas, con empalme, antes de aparecer como ARNm insertado maduro.

15 [0020] La 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.

20 [0021] Las 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. Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, del mismo gen) o foránea (es decir, a partir de un gen diferente) al polinucleótido que codifica la variante o nativa o foránea entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden estar 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.

[0022] La 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 postraduccional y secreción.

30 [0023] El 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 enlazada para secuencias de control que proporcionan su expresión.

35 [0024] Fragmento: el término "fragmento" significa un polipéptido con uno o más (por ejemplo; diferentes) aminoácidos ausentes del amino y/o carboxilo terminal de un polipéptido maduro; donde el fragmento tiene actividad de glucoamilasa. En un aspecto, un fragmento contiene al menos 454 residuos de aminoácidos (por ejemplo, aminoácidos 18 a 471 de SEQ ID N.º: 2 o 1 a 454 de SEQ ID N.º: 3), que comprenden el dominio catalítico y tienen una o más de las sustituciones según la invención.

40 [0025] 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, después de procedimientos de transferencia 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 65°C.

45 [0026] 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. 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.

50 [0027] Propiedad mejorada: el término "propiedad mejorada" significa una característica asociada a una variante que se mejora en comparación con la progenitora. Tales propiedades mejoradas incluyen, pero de forma no limitativa, actividad específica, tolerancia a la glucosa y termo-estabilidad.

5 [0028] Aislado: el término "aislado" significa una sustancia en una forma o ambiente que no se produce en la naturaleza. Los 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 sea al menos parcialmente retirada de uno o más o todos los constituyentes de origen natural con los que se asocia en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por la mano del hombre con respecto a la 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.

15 [0029] 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, después de procedimientos de transferencia Southern estándar durante 12 a 24 horas. El material portador es finalmente lavado tres veces cada una durante a 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2% SDS a 50°C.

20 [0030] Polipéptido maduro: el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final seguida de traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como tratamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro es aminoácidos 18 a 576 de SEQ ID N.º: 2. Amino ácidos 1 a 17 de la SEQ ID N.º: 2 son un péptido señal. Se conoce en la técnica que una célula huésped puede producir una mezcla de dos o más polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un aminoácido C-terminal y/o N-terminal diferente) expresado por el mismo polinucleótido. El polipéptido maduro está descrito aquí como SEQ ID N.º: 3.

25 [0031] 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 52 a 1728 (o 1731 con el codón de terminación) de SEQ ID N.º: 1. Nucleótidos 1 a 51 de SEQ ID N.º: 1 codifican un péptido señal.

30 [0032] Condiciones de astringencia medias: el término "condiciones de astringencia" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos en la 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, después de procedimientos de transferencia 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.

35 [0033] 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 ADN y 35% de formamida, después de procedimientos de transferencia 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 60°C.

40 [0034] Constructo de ácidos nucleicos: el término "constructo de ácidos nucleicos" significa una molécula de ácido nucleico, bien uni- o bicatenaria, que es aislada de un gen de origen natural o se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos en cierto modo que de otra manera no existirían en la naturaleza o que es sintético, que comprende una o más secuencias de control.

[0035] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en 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.

45 [0036] Progenitor o glucoamilasa progenitora: el término "progenitor" o "glucoamilasa progenitora" significa una glucoamilasa para la que se hace una alteración para producir las variantes enzimáticas de la presente invención. El progenitor puede ser un polipéptido (tipo salvaje) de origen natural o una variante o fragmento del mismo.

[0037] Identidad de secuencia: la relación entre dos secuencias de aminoácido o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad de secuencia".

50 [0038] 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 implementa en el programa de 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). El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como el identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

$$\left( \text{Residuos idénticos} \times 100 \right) / (\text{Longitud de alineamiento} - \text{Número total de espacios en alineamiento})$$

[0039] Para fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias desoxirribonucleótidas se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, supra) como implementado en el programa de 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 de EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido usando la opción -nobrief) se usa como el identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

$$(\text{Deoxirribonucleótidos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de alineamiento} - \text{Número total de espacios en alineamiento})$$

[0040] Subsecuencia: el término "subsecuencia" significa un polinucleótido con uno o más (por ejemplo; diferentes) nucleótidos ausentes del extremo 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 codifica al menos el dominio catalítico de la variante según la invención. Por ejemplo, contiene al menos 1362 nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos 52 a 1413 de SEQ ID N.º: 1).

[0041] Variante: el término "variante" significa un polipéptido con actividad de glucoamilasa que incluye una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o eliminación a una o más posiciones (por ejemplo; varias). Una sustitución significa el reemplazo del aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una eliminación significa la eliminación del aminoácido que ocupa una posición; e 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 45%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 55%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 65%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, aún más preferiblemente al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95% e incluso de la forma más preferible al menos 100% de la actividad de glucoamilasa del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 descrito como SEQ ID N.º: 3.

[0042] 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 de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado y 50% de formamida, después de los procedimientos de transferencia 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.

[0043] 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 ADN y 25% de formamida, después de procedimientos de transferencia 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 45°C.

[0044] 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.

Convenios para designación de variantes

[0045] Para fines de la presente invención, el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID N.º: 3 se usa para determinar el residuo de aminoácido correspondiente a otra glucoamilasa. La secuencia de aminoácidos de otra glucoamilasa se alinea con el polipéptido maduro descrito en la SEQ ID N.º: 3 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: 3 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 de 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 de EMBOSS de BLOSUM62).

5 [0046] 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; Edgar, 2004, Nucleic Acids Research 32: 1792-1797), MAFFT (versión 6.857 o posterior; Katoh y Kuma, 2002, 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 employing ClustalW (1.83 o posterior; Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680), usando sus parámetros por defecto respectivos.

15 [0047] Cuando la otra enzima ha divergido desde el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 de manera que la comparación basada en secuencia tradicional falla en detectar su relación (Lindahl y Elofsson, 2000, J. Mol. Biol. 295: 613-615), otros algoritmos de comparación de secuencia de pares pueden ser usados. La sensibilidad superior en la búsqueda basada en secuencia se puede lograr utilizando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de familias (perfiles) de polipéptido para buscar bases de datos. Por ejemplo, el programa de PSI-BLAST genera perfiles a través de un proceso de búsqueda de base de datos reiterativa y es capaz de detectar homólogos remotos (Atschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Incluso una  
20 sensibilidad superior se puede conseguir si la familia o superfamilia para el polipéptido tiene uno o más representativos en las bases de datos de estructura de proteína. Los programas tal como GenTHREADER (Jones, 1999, J. Mol. Biol. 287: 797-815; McGuffin and Jones, 2003, Bioinformatics 19: 874-881) utilizan información a partir 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  
25 estructural para una secuencia de consulta. De forma similar, el método de Gough et al., 2000, J. Mol. Biol. 313: 903-919, puede utilizarse para alinear una secuencia estructural desconocida con los modelos de superfamilia presentes en la base de datos de SCOP. Estos alineamientos pueden sucesivamente ser usados para generar modelos de homología para el polipéptido, y tales modelos se pueden evaluar en exactitud utilizando una variedad de herramientas desarrolladas para este fin.

30 [0048] Para proteínas de estructura conocida, varias herramientas y recursos están disponibles para recuperación y generación de alineamientos estructurales. Por ejemplo, las superfamilias de 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 distancia (Holm and Sander, 1998, Proteins 33: 88-96) o extensión combinatoria (Shindyalov y Bourne, 1998, Protein Engineering 11: 739-747) y la implementación de estos algoritmos puede adicionalmente ser utilizada  
35 para bases de datos de estructura de consulta con una estructura de interés para descubrir homólogos estructurales posibles (por ejemplo, Holm and Park, 2000, Bioinformatics 16: 566-567).

[0049] Al describir las variantes de la presente invención, la nomenclatura descrita abajo se adapta para facilidad de referencia. Se emplea la abreviatura de aminoácido de una letra o tres letras IUPAC.

40 [0050] 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", sustituciones representantes a posiciones 205 y 411 de glicina (G) con arginina (R) y serina(S) con fenilalanina (F), respectivamente.

45 [0051] Delecciones. Para una eliminación de aminoácido, se usa la siguiente nomenclatura: aminoácido progenitor, posición, \*. Por consiguiente, la eliminación de glicina en la posición 195 se designa como "Gly195\*" o "G195\*". Las selecciones múltiples se separan por signos de suma ("+"), por ejemplo, "ugly195\* + Ser411\*" o "G195\* + S411\*".

50 [0052] Inserciones. Para una inserción de aminoácido, se usa la siguiente nomenclatura: aminoácido progenitor, posición, 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 progenitor, posición, aminoácido progenitor, 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".

[0053] En tales casos, el (los) residuo(s) de aminoácido insertados se numeran 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

5 [0054] Alteraciones múltiples. Las variantes que comprenden alteraciones múltiples se separan por signos de suma ("+"), por ejemplo, "Arg170Tyr+Gly195Glu" o "R170Y+G195E" que representan una sustitución de arginina y glicina en posiciones 170 y 195 con tirosina y ácido glutámico, respectivamente.

10 [0055] Alteraciones diferentes. Donde las alteraciones diferentes se pueden introducir en una posición, las alteraciones diferentes se separan por una coma, por ejemplo, "Arg170Tir,Glu" representa una sustitución de arginina en la posición 170 con tirosina o ácido glutámico. Así, "Tir167Gli,Ala + Arg170Gly,Ala" designa las variantes siguientes:

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

#### Descripción detallada de la invención

15 [0056] La presente descripción se refiere a variantes de glucoamilasa, que comprenden una sustitución en una o más (por ejemplo; diferentes) posiciones correspondientes a posiciones 59, 95, 119, 121, 18, 426 y 316 del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3, donde la variante tiene actividad de glucoamilasa. En particular, las variantes tienen propiedades mejoradas en comparación con la glucoamilasa descrita como la SEQ ID N.º: 3. Particularmente, las propiedades mejoradas son termo-estabilidad mejorada, tolerancia a la glucosa aumentada y/o actividad específica aumentada. Las variantes según la divulgación tienen al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.

[0057] El polipéptido maduro de SEQ ID N.º: 2 corresponde a la SEQ ID N.º: 3. Así los números de posición referidos aquí corresponden a los números de posición de la SEQ ID N.º: 3.

#### Variantes

25 [0058] La presente descripción proporciona variantes de glucoamilasa, que incluyen una alteración, en particular, una sustitución, en una o más (por ejemplo; varias) posiciones correspondientes a posiciones 59, 95, 119, 121, 18, 426, y 316, y la variantes tienen actividad de glucoamilasa.

[0059] En una forma de realización, la variante es aislada.

30 [0060] En una forma de realización de la divulgación, la 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 aminoácidos de la glucoamilasa progenitora.

35 [0061] En otra forma de realización de la divulgación, la variante tiene al menos 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. El polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 es en una forma de realización la SEQ ID N.º: 3.

40 [0062] Así en una forma de realización, la presente descripción se refiere a una variante de glucoamilasa, que comprende una sustitución en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 95, 59, 119, 121, 18, 426 y 316 del polipéptido de SEQ ID N.º: 3, donde la variante tiene actividad de glucoamilasa y donde la variante tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.

[0063] En otro aspecto de la divulgación, las alteraciones de variantes comprenden o consisten en sustituciones en posiciones correspondientes a posiciones 121, 18, 426 y 316, tales como las descritas arriba.

[0064] En otro aspecto de la divulgación, la variante comprende o consiste en las sustituciones específicas enumeradas debajo o combinaciones de sustituciones específicas del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3:

5 V18F; o  
 V59A; o  
 V59C; o  
 V59G; o  
 V59I; o  
 S95P; o  
 T119W; o  
 10 A121P; o  
 A426G; o  
 S316W; o  
 S95P+A121P; o  
 V59A+S95P; o  
 15 S95P+T119W; o  
 V59A+S95P+A121P; o  
 S95P+T119W+A121P; o  
 V59C+A426G; o  
 V59G+A426G; o  
 20 V18F+V59I; o  
 V59C+S95P+T119W+A426G; o  
 V59C+S95P+T119W+A121P+A426G; o  
 V59C+S95P+A121P+A426G; o  
 V18F+V59I+S95P+A121P; o  
 25 V18F+V59I+S95P+T119W+A121P; o  
 S95P+A121P+S316W; y donde la variante tiene actividad de glucoamilasa y donde la variante tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos de la 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.

30 [0065] En otra forma de realización de la divulgación de la variante comprende o consiste en las sustituciones específicas enumeradas debajo o combinaciones de sustituciones específicas del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3:

35 V59A; o  
 S95P; o  
 T119W; o  
 A121P; o  
 S95P+A121P; o  
 V59A+S95P; o  
 S95P+T119W; o  
 40 V59A+S95P+A121P; o  
 S95P+T119W+A121P; y donde la variante tiene actividad de glucoamilasa y donde la variante tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos de la 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.

45 [0066] Estas sustituciones específicas y combinaciones de sustituciones han sido mostradas aquí para aumentar la termo-estabilidad de la variante glucoamilasa en comparación con la glucoamilasa de la SEQ ID N.º: 3.

[0067] En otra forma de realización de la divulgación, la variante comprende o consiste en las sustituciones específicas enumeradas debajo o combinaciones de sustituciones específicas del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3:

50 V59C+S95P+T119W+A426G; o  
 V59C+S95P+T119W+A121P+A426G; o  
 V59C+S95P+A121P+A426G; o  
 V18F+V59I+S95P+A121P; o  
 55 V18F+V59I+S95P+T119W+A121P; y donde la variante tiene actividad de glucoamilasa y donde la variante tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos de la 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.

[0068] Estas sustituciones específicas y combinaciones de sustituciones han sido mostradas aquí para aumentar la termo-estabilidad al igual que reducir la inhibición de glucosa de la variante glucoamilasa según la invención.

5 [0069] En otra forma de realización de la divulgación, la variante comprende o consiste en las sustituciones específicas enumeradas abajo o combinaciones de sustituciones específicas del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3: S95P+A121P+S316W; y donde la variante tiene actividad de glucoamilasa y donde la variante tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos de la 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.

[0070] Esta combinación específica de sustituciones ha sido mostrada aquí para aumentar la termo-estabilidad al igual que aumentar la actividad específica de la variante glucoamilasa según la invención.

10 [0071] En una orma de realización de termo-estabilidad mejorada de las variantes de glucoamilasa según la invención se proporciona introduciendo una o más de las sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en 59A, 95P, 119W, y 121P, y en particular una variante de glucoamilasa que comprende las sustituciones 95P + 121P, más particularmente S95P + A121P y donde la variante tiene actividad de glucoamilasa, y donde la  
15 variante tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos de la 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.

[0072] En otra forma de realización de la divulgación se proporciona la inhibición de glucosa reducida de las  
20 variantes de glucoamilasa según la invención introduciendo una o más de las combinaciones de sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en 59C + 426G, 59G + 426G, y 18F + 59I, más particularmente V59C + A426G, o V59G + A426G, o V18F + V59I y donde la variante tiene actividad de glucoamilasa y donde la variante tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos de la 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.

25 [0073] En otra forma de realización de la divulgación, se proporciona actividad específica aumentada de las variantes de glucoamilasa según la invención introduciendo la sustitución 316W, particularmente S316W y donde la variante tiene actividad de glucoamilasa y donde la variante tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos de la 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.

30 [0074] En una forma de realización particular de la divulgación, se proporciona actividad específica de la variante glucoamilasa se puede mejorar eliminando el dominio de unión al almidón (SBD) así dando como resultado la G2 forma de la variante. En una forma de realización más particular, los aminoácidos 455-559 de la SEQ ID N.º: 3 se quitan en la forma G2. Esto se observó para la forma G2 de las variantes que comprende S95P+A121P+S316W o S95P+A121P como se muestra en los ejemplos.

35 [0075] Así en una forma de realización particular de la divulgación, se proporciona actividad específica aumentada de de las variantes de glucoamilasa según la invención, eliminando el SBD, en particular 455-559 de la SEQ ID N.º: 3, más particularmente en una variante que comprende S95P+A121P+S316W o S95P+A121P y donde la variante tiene actividad de glucoamilasa y donde la variante tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, pero menos de la 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.

40 [0076] Las variantes pueden comprender además una o más sustituciones adicionales a una o más (por ejemplo; varias) otras posiciones.

[0077] Debe observarse que para todas las variantes específicas descritas tal variación adicional podría ser  
45 introducida sin afectar significativamente a las propiedades de las variantes de glucoamilasa. En un aspecto, el número de sustituciones en las variantes de la presente invención además de las sustituciones específicas discutidas aquí es 1-20, por ejemplo, 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones.

[0078] Por lo tanto, el % de identidad del polipéptido variante en comparación con el polipéptido progenitor de la SEQ ID N.º: 3 puede ser al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.

- [0079] En una forma de realización particular de la divulgación, las variantes anteriores tienen actividad de glucoamilasa y la variante tiene al menos 90%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.
- 5 [0080] En una forma de realización particular de la divulgación, las variantes anteriores tienen actividad de glucoamilasa y la variante tiene al menos 91%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.
- [0081] En una forma de realización particular de la divulgación, las variantes anteriores tienen actividad de glucoamilasa y la variante tiene al menos 92%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.
- 10 [0082] En una forma de realización particular de la divulgación, las variantes anteriores tienen actividad de glucoamilasa y la variante tiene al menos 93%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.
- [0083] En una forma de realización particular de la divulgación, las variantes anteriores tienen actividad de glucoamilasa y la variante tiene al menos 94%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.
- 15 [0084] En una forma de realización particular de la divulgación, las variantes anteriores tienen actividad de glucoamilasa y la variante tiene al menos 95%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.
- [0085] En una forma de realización particular de la divulgación, las variantes anteriores tienen actividad de glucoamilasa y la variante tiene al menos 96%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.
- 20 [0086] En una forma de realización particular de la divulgación, las variantes anteriores tienen actividad de glucoamilasa y la variante tiene al menos 97%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.
- [0087] En una forma de realización particular de la divulgación, las variantes anteriores tienen actividad de glucoamilasa y la variante tiene al menos 98%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.
- 25 [0088] En una forma de realización particular de la divulgación, las variantes anteriores tienen actividad de glucoamilasa y la variante tiene al menos 99%, pero menos del 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3.
- 30 [0089] Los cambios aminoácidos que pueden estar presentes además de las sustituciones específicas descritas aquí pueden ser de una naturaleza menor, que es sustituciones de aminoácidos conservadoras o inserciones que significativamente no afectan al plegado y/o actividad de la proteína; deleciones pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino o carboxilo terminales, tales como un residuo de metionina aminoterminal; un péptido de enlazador pequeño de sobre a 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 epítipo antigénico o un dominio de unión.
- 35 [0090] Los ejemplos de sustituciones conservadoras están 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). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran actividad específica se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, por 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.
- 40 [0091] Alternativamente, los cambios aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físico químicas de los polipéptidos se alteran. Por ejemplo, los cambios aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo y similar.
- 45

[0092] 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 única se introducen en cada residuo en la molécula y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de glucoamilasa para identificar residuos de 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 determinado por tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con la mutación de aminoácidos de sitio de 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.

[0093] En una forma de realización de la divulgación, la variante ha mejorado la actividad específica en comparación con la enzima progenitora. La actividad específica se determinó utilizando el ensayo AGU.

[0094] En una forma de realización de la divulgación, la variante ha mejorado la tolerancia a la glucosa (o inhibición de glucosa reducida) en comparación con la progenitora. La inhibición de glucosa se determinó como la proporción de actividad de glucoamilasa con y sin 30% de glucosa relativa al peso de la enzima progenitora descrita como la SEQ ID N.º: 3. Para detalles, ver la sección Materias y métodos incluida en la presente.

[0095] En una forma de realización, la variante tiene termo-estabilidad mejorada en comparación con la enzima progenitora. La termo-estabilidad se midió como actividad residual a 32°C utilizando el equipo de ensayo Kikkoman. Para más detalle, ver Materias y métodos de la presente.

#### Glucoamilasas originales

[0096] La glucoamilasa progenitora puede ser (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 que hibridiza bajo condiciones de astringencia medio 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 (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido con un mínimo de 70% de identidad de secuencia a la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1.

[0097] En un aspecto, la progenitora tiene una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2 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%, al menos 99%, o 100%, que tiene actividad de glucoamilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos de la progenitora difiere en hasta 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10, del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

[0098] En otro aspecto, la progenitora comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, la progenitora comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2. En otro aspecto, la progenitora comprende o consiste en la SEQ ID N.º: 3.

[0099] En otra forma de realización, la progenitora es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 2.

[0100] En otro aspecto, el progenitor se codifica por un polinucleótido que hibridiza bajo 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).

[0101] 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 genómico o ADNc de una célula de interés, después de procedimientos de transferencia Southern estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente en este. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que toda la secuencia, pero deberían 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. Tanto

sondas de ADN como ARN se pueden usar. Las sondas son típicamente marcadas para la detección del gen correspondiente (por ejemplo, con 32P, 3H, 35S, biotina o avidina).

5 [0102] Una genoteca de ADN genómico o ADNc obtenido a partir de tales otras cepas se puede seleccionar para ADN que hibridiza con las sondas anteriormente descritas y codifica un progenitor. El ADN genómico u otro de tales otras cepas se puede separar por electroforesis en gel de poli(acrilamida 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 portador adecuado. 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.

10 [0103] Para fines de la presente descripción, 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 altísimas. Las moléculas a la que la sonda de ácidos nucleicos hibridiza bajo estas condiciones se pueden detectar utilizando, por ejemplo, película radiográfica o cualquiera de los otros medios de detección conocidos en la técnica.

15 [0104] En un aspecto de la divulgación, 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 52 a 1728 de la 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 de la misma; o un fragmento de la misma. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es SEQ ID N.º: 1.

20 [0105] En otra forma de realización de la divulgación, 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 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%.

25 [0106] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido donde una región de un polipéptido se fusiona en el N-terminal el C-terminal de una región de otro polipéptido.

30 [0107] 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. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica e incluyen el ligamiento de las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos, de modo que estas están en el 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 la 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).

35 [0108] 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 de forma que se liberan los dos polipéptidos. Los ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios descritos en Martín et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina et al., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

45 [0109] La progenitora puede ser obtenido de microorganismos de cualquier género. 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, la progenitora es secretada extracelularmente.

[0110] La progenitora puede ser una glucoamilasa fúngica. Por ejemplo, la progenitora puede ser una glucoamilasa *Gloeofillum* o una *Trametes*.

50 [0111] En otro aspecto, la progenitora es una glucoamilasa *Gloeofillum trabeum*, *Gloeofillum sepiarium* o *Trametes cingulata*.

[0112] En otro aspecto, el progenitor es un *Gloeofillum trabeum* glucoamilasa, por ejemplo, la glucoamilasa de la SEQ ID N.º: 2 o el polipéptido maduro de la misma.

[0113] 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), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen 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).

[0114] El progenitor se puede identificar y obtener de otras fuentes con microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, suciedad, abonos, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (por ejemplo, suciedad, 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 de forma similar por cribado de una genoteca de ADN o ADNc genómico de otro microorganismo o muestra de ADN mezclada. Una vez un polinucleótido que codifica un progenitor ha sido detectado con la sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar por utilización de técnicas que se conocen por aquellos técnicos en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

#### Preparación de variantes

[0115] 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.

[0116] 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.

[0117] La mutagénesis dirigida al sitio lo que se puede realizar in vitro por PCR implicando el uso de cebadores oligonucleótidos con la mutación deseada. La mutagénesis dirigida al sitio puede también ser realizada in vitro por mutagénesis de "casete" que implica la escisión por una enzima de restricción a un sitio en el plásmido que comprende un polinucleótido que codifica el progenitor y ligamiento posterior de un oligonucleótido que contiene la mutación en el polinucleótido. Normalmente, la enzima de restricción que digiere el plásmido y el oligonucleótido es la misma, lo que permite las extremidades pegajosas del plásmido y el inserto para enlazar uno al otro. Ver, por ejemplo, Scherer y Davis, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 76: 4949-4955; y Barton et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18: 7349-4966.

[0118] 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.

[0119] 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.

[0120] La construcción de gen sintético implica 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 se ensamblan sobre chips microfluídicos fotoprogramables.

[0121] Las sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples, deleciones y/o inserciones pueden hacerse y evaluarse 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. EE.UU 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación 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).

[0122] Los métodos de mutagénesis/redistribución pueden estar combinados con alto rendimiento, métodos de selección 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.

5 [0123] 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 que utiliza fragmentos de polinucleótidos 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 específicos de sitio, 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.

10 Polinucleótidos

[0124] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican una variante de la presente invención.

Constructos de ácidos nucleicos

15 [0125] 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.

20 [0126] El polinucleótido se puede manipular en una variedad de formas para proveer la expresión de una variante. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificación de polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante se conocen en la técnica.

25 [0127] 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. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestra actividad transcripcional en la célula huésped con 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.

30 [0128] 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 *Bacillus amyloliquefaciens* de alfa-amilasa (amyQ), 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 *Bacillus thuringiensis cryIIIA* (Agaisse and Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13: 97-107), *E. coli lac* operón, *E. coli trc* promotor (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. EE.UU 75: 3727-3731), al igual que el promotor *tac* (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 80: 21-25). Otros promotores son descritos en "Useful proteins from recombinant bacteria" in Gilbert et al., 1980, Scientific American 242: 74-94; and in Sambrook et al., 1989, supra. Ejemplos de promotores en serie se describen en la WO 99/43835.

40 [0129] Los ejemplos de promotores adecuados para transcripción dirigente 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*, *Aspergillus niger* o glucoamilasa de *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 I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa 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 *Aspergillus nidulans* o

gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

5 [0130] 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 dehidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato de deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2/GAP), triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1) y quinasa de 3-fosfoglicerato de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura se describen por Romanos et al., 1992, *Yeast* 8: 423-488.

10 [0131] La secuencia de control también puede ser un terminador de transcripción, que se reconoce por una célula huésped para terminar transcripción. La secuencia terminadora está operativamente enlazada al 3'-terminal del polinucleótido que codifica la variante. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped puede ser utilizado.

15 [0132] Los terminadores preferidos para células huésped bacterianas son obtenidos de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus clausii* (*aprH*), alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (*amyL*) y ARN ribosómico de *Escherichia coli* (*rnbB*).

[0133] Los terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos 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*.

20 [0134] Los terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1) y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura se describen por Romanos et al., 1992, *supra*.

[0135] La secuencia de control también puede ser una región de estabilizadora de ARNm aguas abajo de un promotor y aguas arriba de la secuencia codificante de un gen, lo que aumenta expresión del gen.

25 [0136] 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 *Bacillus subtilis* SP82 (Hue et al., 1995, *Journal of Bacteriology* 177: 3465-3471).

30 [0137] La secuencia de control también puede ser un líder, una región no traducida de un ARNm que es importante para traducción por la célula huésped. La secuencia líder está operativamente enlazada al 5'-terminal del polinucleótido que codifica la variante. Cualquier líder que sea funcional en la célula huésped puede ser utilizado.

[0138] Los líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

35 [0139] Los líderes adecuados para células huésped de levadura son obtenidos 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/gliceraldehído-3-fosfato de deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

40 [0140] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al 3'-terminal de la secuencia de codificación de la variante y, cuando se transcribe se reconoce por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina para ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped puede ser utilizada.

[0141] Las secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidas de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

45 [0142] Las secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura se describen por Guo and Sherman, 1995, *Mol. Cellular Biol.* 15: 5983-5990.

[0143] 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 en la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante del polinucleótido puede intrínsecamente contener una secuencia codificante del péptido señal naturalmente enlazada en el marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica la variante. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal que es foránea a la secuencia codificante. Una secuencia codificante del péptido señal foránea se puede requerir donde la secuencia codificante naturalmente no contiene una secuencia codificante del péptido señal. Alternativamente, una secuencia codificante del péptido señal foránea puede sencillamente reemplazar la secuencia codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción de la variante. Sin embargo, cualquier secuencia codificante del péptido señal que dirige la variante expresada en la vía secretora de una célula huésped puede ser utilizada.

[0144] 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 por Simonen y Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.

[0145] 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 *Humicola lanuginosa* y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

[0146] 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 por Romanos et al., 1992, *supra*.

[0147] 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 a 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 de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0148] Donde ambos péptido señal y secuencias de propéptido están presentes, la secuencia de propéptido está situada junto a al N-terminal de la variante y la secuencia de péptido señal está situada junto al N-terminal de la secuencia de propéptido.

[0149] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulan 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 activado o desactivado 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, el sistema ADH2 o sistema GAL1 puede ser utilizado. En hongos filamentosos, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, promotor de TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* puede ser utilizado. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellos que permiten la amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido que codifica la variante sería operativamente enlazado con la secuencia reguladora.

#### Vectores de expresión

[0150] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido que codifican una variante de la presente invención, un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Las varias secuencias nucleótidas y 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. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante está operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0151] 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.

5 [0152] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación de la 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 la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integre en el genoma y replique con el cromosoma(s) en el que se ha  
10 integrado. Además, un vector único o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total para ser introducido en el genoma de la célula huésped o un transposón, se puede utilizar.

[0153] El vector contiene preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten la selección fácil de células transformadas, transfectadas, transducidas o similar. Una etiqueta seleccionable es un gen el producto del cual proporciona para biocida o resistencia vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia para  
15 auxótrofos y similar.

[0154] 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, espectinomicina o resistencia de tetraciclina. Los marcadores adecuados para células huésped de levadura incluyen, pero de forma no limitativa, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores  
20 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* (nitrito-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa) y *trpC* (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos. Preferidos para usar en una célula de *Aspergillus* son *nidulans* de *Aspergillus* o genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus oryzae* y un gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.  
25

[0155] 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.

[0156] Para integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia de polinucleótido que codifica la variante o cualquier otro elemento del vector para integración en el genoma por  
30 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). 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  
35 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. Además, los elementos integracionales pueden ser polinucleótidos de codificación o no codificación. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no-homóloga.

[0157] 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 funcione 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.

45 [0158] 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 pAMβ1 que permiten la replicación en el *Bacillus*.

[0159] 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.

50 [0160] 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 construcción de plásmidos o vectores que comprenden se puede realizar según los métodos descritos en la WO 00/24883.

[0161] Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención se puede insertar en una célula huésped para aumentar la producción de una variante. Un aumento en el número de copias del polinucleótido puede ser obtenido 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 copias adicionales así del polinucleótido se pueden seleccionar por cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0162] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención los conoce un experto en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

Células huésped

[0163] 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. Un constructo 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 duplica como se describe anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier progenie de una célula madre que no es idéntica a la célula madre debido a mutaciones que se producen durante replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen que codifica la variante y su fuente.

[0164] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de una variante, por ejemplo, una procariota o una eucariota.

[0165] 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*.

[0166] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus* que incluye, pero de forma no limitativa *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*.

[0167] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus* que incluye, pero de forma no limitativa *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus equi* subesp. células de *Zooepidemicus*.

[0168] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces*, que incluye, pero de forma no limitativa *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y células de *Streptomyces lividans*.

[0169] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* se puede efectuar por transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Chang y 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 y 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. EE.UU 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.

[0170] La célula huésped también puede ser una eucariota, tal como un mamífero, insecto, planta o célula fúngica.

[0171] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Fúngico" como se utiliza en este caso incluyen el *phyla* *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *zygomycota* al igual que la *Oomycota* y todos los hongos mitospóricos (como se ha definido por Hawksworth et al., In, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK).

[0172] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. La "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).

[0173] La célula huésped de levadura puede ser una *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o célula de *Yarrowia* tal como una célula *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* *Saccharomyces oviformis* o *Yarrowia lipolytica*.

[0174] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. "Fúngicos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como se define por Hawksworth 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 estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un talo unicelular y catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0175] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser una *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaportia*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Termonascus*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, *Trametes* o célula de *Trichoderma*.

[0176] 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 subvermisporea*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum* *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucormiehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o célula de *Trichoderma viride*.

[0177] 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 en cierto modo conocido *per se*. Los procedimientos adecuados para transformación de *Aspergillus* y Células huésped de *Trichoderma* se describen en la EP 238023, Yelton et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU 81: 1470-1474 y Christensen et al., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Los métodos adecuados para transformación de especies de *Fusarium* se describen por 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

[0178] La presente descripción también se refiere a métodos de producción de una variante, que comprenden: (a) cultivo de una célula huésped de la presente invención bajo condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y (b) recuperación de la variante.

5 [0179] Las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción de la variante usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación o fermentación a pequeña escala o a gran escala (que incluye lote continuo, lote alimentado o fermentaciones en estado sólido) en el laboratorio o fermentadores industriales realizados en un medio adecuado y bajo condiciones que permiten que la variante se exprese y/o aísle. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono, y sales inorgánicas, que usan procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la colección de cultivo de tipo americano). Si la variante se segrega en el medio nutritivo, la variante se puede recuperar directamente desde el medio. Si la variante no es segregada, esta se puede recuperar de lisados de célula.

10

[0180] 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, uso de anticuerpos específicos, 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.

15

[0181] 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 de forma no limitativa colección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

20

[0182] La variante se puede purificar por una variedad de procedimientos conocida en la técnica que incluye, pero no de forma limitativa cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbico, cromatoenfoco y exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, enfoque isoeléctrico preparatorio), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, Janson and Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) para obtener variantes sustancialmente puras.

25

[0183] En un aspecto alternativo de la divulgación, la variante no se recupera, sino que una célula huésped de la presente invención que expresa la variante se usa como una fuente de la variante.

#### Composiciones

30 [0184] 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 poco color, poco olor y estabilidad de almacenamiento aceptable.

35

[0185] 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, tal como una aminopeptidasa, alfa-amilasa, carbohidrasa de isoamilasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, glicosiltransferasa de ciclodextrina, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, pululanasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasa.

40

[0186] En una forma de realización particular, la composición comprende una alfa-amilasa y la variante glucoamilasa según la invención. En otra forma de realización de la divulgación, la composición comprende una isoamilasa y la glucoamilasa variante según la invención. En otra forma de realización de la divulgación la composición comprende una alfa-amilasa, una isoamilasa y la glucoamilasa variante según la invención.

45

[0187] En otro aspecto de la divulgación, la composición comprende la glucoamilasa variante de la invención combinada con una pululanasa. En otro aspecto de la divulgación, la composición comprende la glucoamilasa variante de la invención combinada con una pululanasa y una isoamilasa. En otro aspecto de la divulgación, la composición comprende la glucoamilasa variante de la invención combinada con una pululanasa y una alfa-amilasa.

50

[0188] En una forma de realización particular de la divulgación, la composición comprende además una proteasa.

5 [0189] Las composiciones de polipéptido se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden ser en forma de un líquido o una composición seca. Por ejemplo, la composición de polipéptido puede ser en forma de un granulado o un micro-granulado. El polipéptido para ser incluido en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

[0190] Los ejemplos se dan debajo de usos preferidos del polipéptido o composiciones de 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.

10 [0191] Las composiciones anteriores se adecuan para usar en la licuefacción, sacarificación y/o procesos de fermentación, preferiblemente en la conversión de almidón, especialmente para producir jarabe y productos de fermentación, tal como etanol.

[0192] Se proporcionan ejemplos debajo de usos preferidos de las composiciones de polipéptido de la presente invención. 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.

15 Usos

20 [0193] La presente invención está también 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. El polipéptido también se puede usar en una combinación de procesos por ejemplo en un proceso de licuefacción y de sacarificación, en un proceso de licuefacción y de fermentación o en una sacarificación y proceso de fermentación, preferiblemente en relación con la conversión de almidón.

[0194] En un aspecto preferido de la presente descripción, la licuefacción, sacarificación y/o proceso de fermentación incluye licuefacción consecutivamente o simultáneamente realizada y procesos de sacarificación.

25 [0195] En el proceso de licuefacción enzimática convencional, se añade alfa-amilasa termoestable y el almidón de cadena larga se degrada en unidades ramificadas y lineales más cortas (maltodextrinas), pero la glucoamilasa no se añade. La glucoamilasa de la presente invención es altamente termoestable, así es ventajoso añadir la glucoamilasa en el proceso de licuefacción. La glucoamilasa de la presente invención tiene un efecto sinérgico cuando se combina con una alfa-amilasa en el proceso de licuefacción. Durante la sacarificación convencional, las dextrinas generadas durante el proceso de licuefacción son adicionalmente hidrolizadas para producir bajos azúcares moleculares DP1-3 que se pueden metabolizar por el organismo fermentador. La hidrólisis se realiza típicamente usando glucoamilasas; alternativamente además de glucoamilasas, alfa-glucosidasas y/o alfa-amilasas ácidas se pueden usar.

30 [0196] Cuando se aplica la glucoamilasa de la presente invención, potencialmente en combinación con una alfa-amilasa en un proceso de licuefacción y/o de sacarificación, especialmente en un proceso de licuefacción simultánea y sacarificación, el proceso se puede conducir a una temperatura más alta. En particular, la variante glucoamilasa de la invención es útil para sacarificación de almidón crudo (almidón granulado) a alta temperatura pero por debajo de la temperatura de gelatinización, tal como a temperaturas en el rango de 40 a 65°C, más particular de 50 a 62°C, más particular de 59 a 62°C.

40 [0197] Por conducción de la licuefacción y/o procesos de 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 baja dosificación enzimática. Además, el riesgo de contaminación microbiana se reduce cuando se lleva el proceso de licuefacción y/o de sacarificación a temperatura más alta.

Conversión de material que contiene almidón

45 [0198] La presente invención proporciona un uso de la glucoamilasa de la invención para producir glucosas y similares de almidón. Generalmente, el método incluye las etapas de hidrolizar parcialmente el almidón precursor utilizando la glucoamilasa variante de la presente invención bien sola o en presencia de una alfa-amilasa.

[0199] La glucoamilasa variante 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 glucosilos.

[0200] 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 continuo.

Producción de jarabe, bebida y/o producto de fermentación

5 [0201] Uso de la glucoamilasa de la invención incluye la conversión de almidón a por ejemplo, bebida de jarabe y/o un producto de fermentación, incluyendo etanol.

10 [0202] 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 "Materias que contienen almidón". Generalmente, el proceso comprende las etapas de parcialmente o totalmente hidrolizar material que contiene almidón (licuefacción y/o sacarificación) en presencia de la glucoamilasa de la presente invención sola o en combinación con alfa-amilasa para liberar glucosa de las extremidades no-reducidas del almidón o de moléculas oligo y polisacáridas relacionadas.

15 [0203] La glucoamilasa de la invención también se puede usar en forma inmovilizada. Esto se adecua y frecuentemente se usa para producir jarabes de especialidad, tales como jarabes de maltosa al igual que en el flujo refinado de oligosacáridos en relación con la producción de jarabes de fructosa, por ejemplo, jarabe rico en fructosa (HFS).

Productos de fermentación

20 [0204] El término "producto fermentador" significa un producto producido por un proceso que incluye un proceso de fermentación utilizando un organismo fermentador. Los productos de fermentación contemplados según la invención incluyen alcoholes (por ejemplo, arabinitol, butanol, etanol, glicerol, metanol, etilenglicol, 1,3-propanodiol [propilenglicol], butanodiol, glicerina, sorbitol, y xilitol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido acetónico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucárico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutárico, ácido 3-hidroxiopropiónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido oxaloacético, ácido propiónico, ácido succínico y ácido xilónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina y treonina); un alcano (por ejemplo, pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano, undecano y dodecano); un cicloalcano (por ejemplo, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano y ciclooctano); un alqueno (por ejemplo penteno, hexeno, hepteno y octeno); gases (por ejemplo, metano, hidrógeno (H<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y monóxido de carbono (CO)); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B<sub>12</sub>, beta-caroteno); y hormonas. En un aspecto preferido, el producto de fermentación es etanol, por ejemplo, etanol combustible; etanol potable, es decir, bebidas espirituosas neutras 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. Los tipos de cerveza preferida comprenden cerveza inglesa de malta, cerveza negra, porter, cerveza rubia, cerveza amarga, soluciones de malta, cerveza happoushu, cerveza de alto contenido en alcohol, cerveza de bajo contenido en alcohol, cerveza baja en calorías o cerveza ligera. 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.

25  
30  
35  
40

Elaboración de cerveza

45 [0205] Las glucoamilasas de la presente invención son altamente termoestables y por lo tanto se pueden usar en una industria que necesita hidrólisis de almidón a alta temperatura. Por ejemplo, las glucoamilasas de la invención se pueden usar en una industria cervecera. 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

50 [0206] En este aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir una licuefacción, sacarificación y/o producto de fermentación a partir de material que contiene almidón, que comprende el paso de: tratamiento de material que contiene almidón con un polipéptido de la presente invención. Las materias primas que contienen almidón adecuado se enumeran en la sección "Materias que contienen almidón" de abajo. Las enzimas contempladas se enumeran en la sección "Enzimas"- de abajo. Preferiblemente, el proceso de la presente invención comprende el tratamiento de materia que contiene almidón con un polipéptido de la presente

5 invención solo o junto con una alfa-amilasa. El producto de licuefacción y/o de sacarificación de la presente invención son dextrina o azúcares moleculares bajos, por ejemplo DP1-3. En el proceso de licuefacción, la conversión de almidón en la glucosa, dextrina y/o azúcares de bajo peso molecular 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. La fermentación es preferiblemente realizada en presencia de levadura, preferiblemente una cepa de *Saccharomyces*. Los organismos fermentadores adecuados se enumeran en la sección "Organismos fermentadores" de abajo.

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

10 [0207] En este aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación, especialmente etanol, a partir de material que contiene almidón, cuyo proceso incluye un paso de licuefacción y pasos de fermentación y sacarificación realizados consecutivamente o simultáneamente. La invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye las etapas de:

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

[0208] Preferiblemente, el paso (a) incluye también el uso de las variantes de glucoamilasa de la invención. En una forma de realización, las variantes de glucoamilasa de la invención también están presentes/ se añaden en el paso (b).

20 [0209] 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 "Materias que contienen almidón" de abajo. Las enzimas contempladas se enumeran en la sección "Enzimas" de abajo. La licuefacción es preferiblemente realizada en presencia de una alfa-amilasa. La fermentación es preferiblemente realizada en presencia de levadura, preferiblemente una cepa de *Saccharomyces*. Los organismos fermentadores adecuados se enumeran en la sección "Organismos fermentadores" de abajo. En formas de realización preferidas, los pasos (b) y (c) se realizan consecutivamente o simultáneamente (es decir, como proceso SSF).

25

[0210] En una forma de realización particular, el proceso de la invención comprende además, antes de la etapa (a), las etapas de:

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

El lodo acuoso puede contener de 10-40 % en peso, preferiblemente 25-35 % en peso de material que contiene almidón. El lodo se calienta por encima de la temperatura de gelatinización y alfa-amilasa, preferiblemente, la alfa-amilasa fúngica bacteriana y/o ácida se puede adicionar para iniciar licuefacción (dilución). 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 el paso (a) de la invención.

35

[0211] Más específicamente, la licuefacción se puede realizar como un proceso de lodo caliente de tres pasos. El lodo se calienta durante entre 60-95°C, preferiblemente 80-85°C y la alfa-amilasa se añade para iniciar la licuefacción (dilución). Luego el lodo se puede cocer a 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 más alfa-amilasa se añade para finalizar hidrólisis (licuefacción secundaria). El proceso de licuefacción normalmente se realiza a pH 4.5-6.5, en particular a un pH entre 5 y 6. Granos enteros molidos y licuados se conocen como triturado.

40

[0212] La sacarificación en la etapa (b) se puede realizar usando condiciones bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, un proceso de sacarificación completo 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 fermentación en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (proceso de 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 en alrededor de pH 4.5.

45

50

[0213] El proceso más ampliamente usado en el producto de 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 pueden adicionar juntos. 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 a la alza o la baja durante la fermentación. Conforme a la presente invención, la etapa de fermentación (c) incluye, sin limitación, procesos de fermentación usados para producir alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B<sub>12</sub>, beta-caroteno); y hormonas. Los procesos de fermentación preferidos incluyen procesos de fermentación alcohólica, como se conocen en la técnica. Procesos de fermentación preferidos son procesos de fermentación anaeróbica, como se conocen en la técnica.

Procesos para producir productos de fermentación que contiene almidón no gelatinizado

[0214] En este aspecto, la invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación a partir de la materia que contiene almidón sin gelatinización de la materia que contiene almidón (es decir, materia 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. 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 sacarificación y fermentación. En un aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que comprende:

- (a) sacarificación de material que contiene almidón con una variante de glucoamilasa madura según la invención, a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho material que contiene almidón,
- (b) fermentación utilizando un organismo fermentador.

[0215] 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 del paso (a).

[0216] En una forma de realización preferida, el paso (a) incluye la adición de una alfa amilasa.

[0217] El proceso de fermentación se puede realizar durante un periodo de 1 a 250 horas, es preferiblemente de 25 a 190 horas, más preferiblemente de 30 a 180 horas, más preferiblemente de 40 a 170 horas, aún más preferiblemente de 50 a 160 horas, aún más preferiblemente de 60 a 150 horas, incluso aún más preferiblemente de 70 a 140 horas y de la forma más preferible de 80 a 130 horas.

[0218] El término "temperatura de gelatinización inicial" significa la temperatura mínima a la que la gelatinización del almidón comienza. 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 puede ser determinada de inmediate por el experto en la materia. Así, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según las especies de planta, a la variedad particular de las especies de planta al igual que con las condiciones de crecimiento. En el contexto de esta invención, la temperatura de gelatinización inicial de una materia que contiene almidón dada es la temperatura a la que la birrefringencia se pierde en 5% de los gránulos de almidón utilizando el método descrito por Gorinstein y Li, 1992, Starch/Stärke 44(12): 461-466.

[0219] Antes del paso (a) se puede preparar un lodo de material que contiene almidón, tal como almidón granulado, que tiene 10-55 % en peso de sólidos secos, preferiblemente 25-40 % en peso de sólidos secos, más preferiblemente 30-35 % en peso de sólidos secos de material que contiene almidón. El lodo puede incluir agua y/o aguas de proceso, tales como agua destilada (vinaza), agua de lavado, condensado de evaporador o destilado, agua decapante lateral de destilación u otro agua de proceso de planta de producto de fermentación. Debido a que el proceso de la invención se realiza por debajo de la temperatura de gelatinización y así no se produce ningún aumento de viscosidad significativa, se pueden usar niveles altos de vinaza si se desea. En una forma de realización, el lodo acuoso contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 70 % del vol. de vinaza, preferiblemente 15-60% de vol. de vinaza, especialmente de aproximadamente 30 a 50 % de vol. de vinaza.

5 [0220] El material que contiene almidón se puede preparar reduciendo el tamaño de partícula, preferiblemente por molienda en húmedo o en seco, para 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.

[0221] El proceso de la invención se conduce a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial. Preferiblemente, la temperatura en la que el paso (a) se realiza es entre 30-75°C, preferiblemente entre 45-60°C.

10 [0222] En una forma de realización preferida, el paso (a) y paso (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 a la alza o a la baja durante la fermentación.

15 [0223] 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 por debajo de 6 % en peso, preferiblemente, por debajo de aproximadamente 3 % en peso, preferiblemente, por debajo de aproximadamente 2 % en peso, más preferiblemente por debajo de aproximadamente 1 % en peso, aún más preferiblemente, por debajo de aproximadamente 0.5 % en peso o aún más preferiblemente 0.25 % en peso, tal como por debajo de  
20 aproximadamente 0.1 % en peso. Tales niveles bajos de azúcar se pueden realizar 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. Las cantidades empleadas de enzima y organismo fermentador también se pueden seleccionar para mantener bajas concentraciones de maltosa en el caldo de fermentación. Por ejemplo, el nivel de maltosa se puede mantener por debajo de aproximadamente 0.5  
25 % en peso o por debajo de aproximadamente 0.2 % en peso.

[0224] El proceso se puede llevar a cabo a un pH en el rango de entre 3 y 7, preferiblemente pH 3.5 a 6, o más preferiblemente de pH 4 a 5.

30 [0225] Las variantes de glucoamilasa de la presente invención son termoestables, así la pre-sacarificación y/o sacarificación se puede llevar a cabo a una temperatura más alta que la pre-sacarificación convencional y/o sacarificación. En una forma de realización, un proceso de la invención incluye material que contiene almidón pre-sacarificado antes del proceso de sacarificación y fermentación simultáneos (SSF). La pre-sacarificación puede llevarse a cabo a una alta temperatura (por ejemplo, 50- 85°C, preferiblemente 60-75°C) antes de moverse en la SSF.

#### Materias que contienen almidón

35 [0226] Cualquier materia prima que contiene almidón adecuado, incluido almidón granulado se puede utilizar según la presente invención. La materia prima se selecciona generalmente en base al 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, varillas, granos enteros, granos, mazorcas, trigo, cebada,  
40 centeno, milo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, guisantes de arroz, alubias o batata, o mezclas derivadas, o cereales, materias primas que contienen azúcar, tal como melaza, materias de fruta, azúcar de caña o remolacha azucarera, patatas y materias con celulosa, tal como madera o residuos de planta o mezclas derivadas. Se contemplan ambos tipos cerosos y no cerosos de maíz y cebada.

#### Organismos fermentadores

45 [0227] "Organismos fermentadores" se refiere cualquier organismo, con organismos bacterianos y fúngicos, adecuados para usar en un proceso de fermentación y capaces de producir un producto de fermentación deseado. Los organismos fermentadores adecuados especialmente son capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares, tal como glucosa o maltosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado. Los ejemplos de organismos fermentadores incluyen organismos fúngicos, tal como levadura. La levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces* spp., en particular, *Saccharomyces cerevisiae*. La levadura  
50 disponible comercialmente incluye, por ejemplo, Red Star™/Lesaffre Ethanol Red (disponible de Red Star/Lesaffre, USA) 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 D DSM Specialties).

## Enzimas

## Glucoamilasa

[0228] La glucoamilasa es preferiblemente una glucoamilasa de la invención. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente una glucoamilasa de la invención también se puede combinar con otras glucoamilasas. La glucoamilasa se puede añadir en una cantidad de 0.001 a 10 AGU/g DS, 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.

## Alfa-amilasa

[0229] La alfa-amilasa puede según la invención ser de cualquier origen. Se prefieren las alfa-amilasas de origen fúngico o bacteriano.

[0230] 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 añadida 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.

## 15 Alfa-amilasas bacterianas

[0231] Según la invención, una alfa-amilasa bacteriana puede preferiblemente derivar del género *Bacillus*.

[0232] 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 la especie *Bacillus*. Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (BLA) mostrada 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 WO 99/19467 y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (BSG) mostrada en la SEQ ID N.º: 3 en la WO 99/19467. En una forma de realización de la invención, la alfa-amilasa es una enzima con un grado de identidad de al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferido al menos 80%, aún más preferido al menos 90%, tal como al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con cualquiera de las secuencias mostradas como SEC ID NOS: 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente, en la WO 99/19467.

[0233] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrido, especialmente una descrito en cualquiera de la WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059 y WO 02/10355. Las variantes de alfa-amilasa en concreto contempladas se describen en la patente US n.º. 6,093,562, 6,297,038 o Patente US. N.º 6,187,576 e incluyen variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (BSG alfa-amilasa) con una eliminación de uno o dos aminoácidos en la posición 179 a 182, preferiblemente una eliminación doble descrita en la WO 1996/023873 - ver por ejemplo, página 20, líneas 1-10, preferiblemente correspondientes a delta(181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos alfa-amilasa de tipo salvaje BSG expuesta en la SEQ ID N.º: 3 descrita en la WO 99/19467 o eliminación de aminoácidos 179 y 180 usando la SEQ ID N.º: 3 en la WO 99/19467 para numeración. Aún más preferidas son alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, que tiene una eliminación doble que corresponde con delta (181-182) y además comprende una sustitución N193F (denominada también I181\* + 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.

[0234] 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 a maltosa en la configuración alfa. Una alfa-amilasa maltogénica de cepa de *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está comercialmente disponible de Novozymes A/S, Dinamarca. La alfa-amilasa maltogénica se describe en la Patente EE.UU. nos. 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628.

## 45 Alfa-amilasas de híbrido bacteriano

[0235] Una alfa-amilasa híbrida específicamente contemplada comprende 445 residuos de aminoácidos C-terminal de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada como 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 SEQ ID N.º: 3 en WO 99/19467), con una o más, especialmente todas de las siguientes sustituciones:

G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S (utilizando la numeración de *Bacillus licheniformis*). Preferidas también son variantes que tienen una o varias de las siguientes mutaciones (o mutaciones correspondientes en otras estructuras de alfa-amilasa de *Bacillus*): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o eliminación de dos residuos entre posiciones 176 y 179, preferiblemente eliminación de E178 y G179 (utilizando el SEQ ID N.º: 5 numeración de WO 99/19467).

#### Alfa-amilasas fúngicas

[0236] 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*.

10 [0237] Una alfa-amilasa fúngica ácida preferida es una alfa-amilasa de tipo *Fungamyl* que es preferiblemente derivada a partir de una cepa de *Aspergillus oryzae*. En la presente descripción, el término "alfa amilasa 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 WO96/23874.

15 [0238] Otra alfa-amilasa ácida preferida se deriva de una cepa *Aspergillus niger*. En un aspecto preferido, la alfa-amilasa fúngica ácida es la *A. niger* descrita como "AMYA ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TrEMBL bajo el número de acceso primario n° 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). También se contemplan variantes de dicha amilasa fúngica ácida que tiene al menos 70% de  
20 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 SEQ ID N.º: 1 en WO 2004/080923.

[0239] En un aspecto preferido, la alfa-amilasa se deriva de *Aspergillus kawachii* y se describe por Kaneko et al. J. Ferment. Bioeng. 81:292-298(1996) "Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachii*" y además como EMBL:#AB008370.

25 [0240] 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*.

#### Alfa-amilasas híbridas fúngicas

30 [0241] En un aspecto preferido, la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida. Los ejemplos preferidos de alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen aquellos descritos en la WO 2005/003311 o publicación de patente EEUU n° 2005/0054071 (Novozymes) o solicitud de patente de EEUU n° 2006/0148054 (Novozymes). Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico de alfa-amilasa (CD) y un dominio/módulo de enlace de carbohidratos (CBM) y opcionalmente un enlazador.

35 [0242] Los ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen, pero no están limitados a aquellos descritos en la solicitud de patente EEUU n° 2006/0148054 con variante de fungamil con dominio catalítico JA118 y *Athelia rolfsii* SBD (SEQ ID N.º: 100 en la solicitud EEUU n° 2006/0148054), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador *Athelia rolfsii* AMG y SBD (SEQ ID N.º: 101 en la solicitud EEUU n° 2006/0148054) y alfa-amilasa *Meripilus giganteus* con enlazador de glucoamilasa *Athelia rolfsii* y SBD (SEQ ID  
40 N.º: 102 en la solicitud EEUU n° 2006/0148054); y alfa-amilasa *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa *Aspergillus niger* y CBM (SEQ ID N.º 2 en la publicación internacional n° WO2007/144424).

[0243] Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen, pero no están limitados a aquellos descritos en la publicación de patente EEUU n° 2005/0054071, incluyendo aquellos descritos en la tabla 3 en la página 15, tal como alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con enlazador de *Aspergillus kawachii* y dominio de  
45 unión al almidón.

#### Productos de alfa-amilasa comercial

[0244] Las composiciones comerciales preferidas que comprenden alfa-amilasa incluyen micolasa de DSM (Gist Brocades), BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ SC, LIQUOZYMET™ 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.)

[0245] La presente invención es posteriormente descrita por los ejemplos siguientes.

**Ejemplos**

Materias y métodos

Actividad de glucoamilasa

5 [0246] La actividad de glucoamilasa se puede medir en unidades AGU.

Actividad de glucoamilasa (AGU)

10 [0247] La unidad de glucoamilasa (AGU) se define como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándar (37°C, pH 4.3, sustrato: maltosa 100 mM, tampón: acetato 0.1 M, tiempo de reacción 6 minutos como se presenta en la incubación de glucoamilasa de abajo), generando así 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 trabajo de enzima:	0.5-4.0 AGU/mL

[0248] El principio de análisis se describe por 3 pasos de reacción:

El paso 1 es una reacción enzimática:

15 [0249] La 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. Los pasos 2 y 3 suponen una reacción de punto final:

[0250] La glucosa se fosforila por ATP, en una reacción catalizada por hexoquinasa. La glucosa-6-fosfato formada se oxida a 6-fosfogluconato por deshidrogenasa de glucosa-6-fosfato. En esta misma reacción, una cantidad equimolar de NAD<sup>+</sup> se reduce para NADH con un aumento resultante en la absorbancia a 340 nm. Un sistema de autoanalizador tal como analizador Konelab 30 (Thermo Fisher Scientific) puede ser utilizado.

Reacción de Color	
Tris	Aprox. 35 mM
ATP	0.7 MM
NAD <sup>+</sup>	0.7 MM
Mg <sup>2+</sup>	1.8 MM
Hexoquinasa	> 850 U/L
Glucosa-6-P-DH	> 850 U/L
pH	aprox. 7.8
Temperatura	37. 0 °C ± 1.0 °C
Tiempo de reacción	420 Seg
Longitud de onda	340 Nm

20 Actividad específica (SA) de glucoamilasa

[0251] La actividad específica se determinó por ensayo AGU de arriba utilizando un instrumento Konelab.

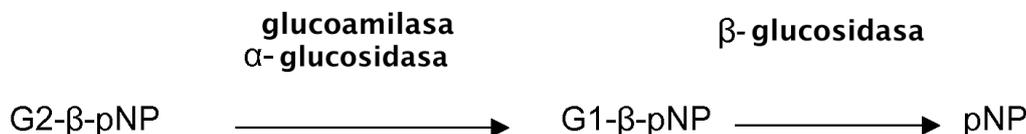
Actividad de glucoamilasa usando el equipo Kikkoman

Ensayo de actividad de glucoamilasa (Kikkoman)

[0252] El código de producto: 60211

Principio de ensayo:

[0253]



[0254] El sustrato, 4-nitrofenil- β-maltosido (G2-β-pNP) se degrada por glucoamilasa o α-glucosidasa en 4-nitrofenil-β-glucósido (G1-β-pNP). G1-β-pNP es posteriormente degradado en el 4-nitrofenol (PNP) por α-glucosidasa en este equipo. La reacción se realiza a temperatura ambiente a pH aproximadamente 4. La reacción se detiene por adición de carbonato de sodio y al mismo tiempo la solución se vuelve pH alcalino para maximizar la absorbancia de pNP. La actividad de formación de glucosa se mide por cuantificación del pNP a 400nm.

- 1) la respuesta medida muestra la G2-β-pNP actividad de degradación de glucoamilasa y α-glucosidasa en la muestra. Se cree que esta es la actividad formadora de glucosa en la muestra.
- 2) la prueba se puede usar para extracto de arroz koji sin diálisis.
- 3) este ensayo no está afectado por α-amilasa en la muestra.

Componentes de equipo

Reactivo	Componente principal	Cantidad
Solución de sustrato	G2-β-pNP	60ml
Solución enzimática	α-glucosidasa	60ml
Solución de parada	Carbonato de sodio	120ml

- 1) Mezcla "solución de sustrato" y "solución enzimática" del equipo a 1:1.
- 2) Pipeta 10μl de la muestra de variante de glucoamilasa purificada que tiene aproximadamente 0.1 AGU/ml de actividad (o agua como un blanco) y transferencia a un pocillo de placa de microtitulación. (duplicado)
- 3) Añadir 60μl de la mezcla de enzima sustrato al pocillo.
- 4) Incubar a 32°C de temperatura durante 20 min.
- 5) Añadir 120μl de la solución de parada al pocillo.
- 6)

Leído OD400nm. # Neto OD<sub>400</sub>= OD<sub>400</sub>(muestra) – OD<sub>400</sub>(blanco)

1. Blanco: normalmente, la absorbancia de blanco es inferior a 0.200.
2. Especificidad: la respuesta no está afectada por glucosa (sobre a 100g/l) o α-amilasa (725U/ml).
3. Reproducibilidad: el CV de la absorbancia es menor que 1% cuando la misma muestra se analiza 10 veces.
4. Gama lineal: el OD<sub>400</sub> neto hasta 1.6 debería ser proporcional a la concentración enzimática.
5. Estabilidad de color: la absorbancia no cambia durante 2h a 25°C.

Ensayo de termo-estabilidad

[0255] La termo-estabilidad se determinó para las variantes seleccionadas como la actividad residual después del tratamiento térmico a 63°C o 67°C durante 1 hora utilizando el equipo de glucoamilasa Kikkoman.

Ensayo de inhibición de glucosa

[0256] La inhibición de glucosa se determinó como la proporción de actividad de glucoamilasa (AMG) con y sin glucosa. El equipo de ensayo Kikkoman se usó para el ensayo AMG. Diez micro litros de las muestras 3 veces diluidas se añadió a 190 micro litros de sustrato (solución de sustrato en el equipo: solución enzimática en el equipo: 40% de glucosa o DW = 1:1:6) y la mezcla reactiva fue incubada a 37° C. El tiempo de reacción dependió de los sustratos, 30min para el sustrato sin glucosa y 2hr con glucosa. Luego 80 micro litros de mezcla reactiva fueron mezclados con 160 micro litros de 3% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> parar la reacción y A400 fue medido.

[0257] El valor de inhibición de glucosa fue calculado como la ecuación siguiente;

$$\text{Inhibición de glucosa} = (\text{Vg} / \text{Vdw}) / (\text{WTg} / \text{WTdw}) \times 2 \times 0.5 \times 100$$

Vg; delta A400 de la variante de sustrato con glucosa  
 Vdw; delta A400 de la variante de sustrato sin glucosa  
 WTg; delta A400 del Gt-AMG de sustrato con glucosa  
 5 Vdw; delta A400 del Gt-AMG de sustrato sin glucosa

Manipulaciones de ADN

[0258] Todos los plásmidos fueron construidos y propagados en las células E.coli DH5α. Las endonucleasas de restricción para manipulaciones de ADN son obtenibles de New England Biolabs, Inc. y se usan según la instrucción. La In-fusion (Clontech) se usa para el ligamiento de ADN. Los plásmidos amplificados se recuperan con equipo de plásmido Qiage. La reacción en cadena de polimerasa (PCR) se realiza con la Prime star Max ADN polimerasa (TaKaRa). El Equipo de Extracción de Gel QIAquickge (Qiagen) se usa para la purificación de fragmentos de ADN extirpados de geles de agarosa. Toda la manipulación de ADN fue básicamente seguida por the manufacturer's instruction and Molecular cloning: a laboratory manual (2nd edn.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York described in Sambrook, Fritsch EF, Maniatis T (1989).

**Ejemplo 1:** clonación de gen de glucoamilasa Gt-AMG

Preparación de ADNc de cepa *Gloeophyllum trabeum*.

[0259] El ADNc fue sintetizado siguiendo la instrucción de equipo de síntesis de ADNc de fidelidad alta Transcriptor (Roche).

Clonación de gen de glucoamilasa Gt-AMG.

[0260] El gen de glucoamilasa fue reclonado desde el ADNc a un vector de expresión *Aspergillus* por PCR usando dos cebadores de clonación pra102 y cebador pra103 mostrados a continuación, que fueron diseñados basados en la secuencia conocida y etiquetas adicionales para clonación directa por estrategia de IN-FUSION™.

Cebador pra102: 5' AGTCTTGATCGGATCCATGTACCGCTTCCTTGCTGTGCT 3'  
 Cebador pra103: 5' CGCACACGTGGTTAAACTTAACGCCAAGTGTCATTCTC 3'

[0261] El PCR fue realizado utilizando un motor de ADN PTC-200 bajo las condiciones descritas abajo.

Sistema de reacción por PCR:				Condiciones:		
8 Micro L	H2O			1	94°C	2 Min
10 Micro L	2X Estrella principal (TaKaRa)			2	94°C	10 Seg
0.5micro L X 2100 pmol/micro L cebadores				3	55°C	10 Seg
(pra102 Y pra103)				4	72°C	10 Seg
1 Micro L	Modelo ADN			2-4	25 Ciclos	
				5	72°C	10 Min

[0262] Los productos reactivos fueron aislados por 1.0% de electroforesis en gel de agarosa utilizando 1 x tampón TAE donde aproximadamente 1.7 kb de banda de producto PCR fue extirpada del gel y purificada utilizando un equipo de extracción de gel Qiagen según la instrucción del fabricante. El ADN que corresponde con el gen *Gloeophyllum trabeum* de glucoamilasa fue clonado en un vector de expresión *Aspergillus* linealizado con BamHI y PmeI, utilizando un equipo de 5X HD IN-FUSION™ (Clontech) según las instrucciones del fabricante.

[0263] 2 µl de volumen de la mezcla de ligamiento se usó para transformar células E. Coli DH5α (TOYOBO). Después de un choque térmico a 42°C durante 45 seg y el enfriamiento en el hielo, 250 µl de medio SOC se añadió y las células fueron incubadas a 37°C a 225 r.p.m. durante 90 min antes de ser colocadas en las placas LB agar que contienen 250 µg de ampicilina por ml y se cultivan 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 y se incubaron a 37°C a 225 r.p.m. durante toda la noche. El ADN de plásmido de las colonias seleccionadas fue purificado utilizando el kit de plásmido Qiagen mini (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. La secuencia

de genes de glucoamilasa *Gloeofillum trabeum* fue verificada por secuenciación de Sanger antes de la expresión heteróloga. Uno de los plásmidos fue seleccionado para expresión adicional y fue denominado pNori140.

[0264] Los protoplastos de una huésped de *Aspergillus niger* fueron preparados como se describe en la WO 95/02043. Preferiblemente la huésped *A. niger* ha sido eliminada para actividad de glucoamilasa endógena. El gen de glucoamilasa *Gloeofillum trabeum* fue integrado en el genoma de la huésped *A. niger* que utiliza el sistema de integración dirigida al sitio basado FLP como se describe en la WO2012/160093. Cien µl de suspensión de protoplasto fueron mezclados con 2,5 µg del plásmido pNori140, que contiene el gen de glucoamilasa *Gloeofillum trabeum* con el promotor, terminador, gen FLP y sitios de integración descritos en la WO2012/160093 y 250 microlitros de 60% PEG 4000 (Applichem) (polietilenglicol, peso molecular 4,000), 10 mM CaCl<sub>2</sub> y 10 mM pH Tris-HCl 7,5 se añadieron y mezclaron suavemente. 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 COVE (Cove, 1996, Biochim. Biophys. Acta 133:51-56) (1M) placas suplementadas con 10 mM de acetamida y 15 mM CsCl y se añadieron como una capa superior en las placas de sacarosa COVE (1M) suplementadas con 10 mM de acetamida y 15 mM CsCl para selección de transformantes (4 ml de agar superior por placa). Tras la incubación durante 6 días a 32°C, esporas de cinco transformantes fueron aisladas sobre la placa COVE II y transformantes aislados fueron sometidos a cultivo de matraz.

[0265] Cultivo. El transformante aislado fue inoculado para placa COVE Ngly a 30°C durante 7 días y el cultivo de placa fue inoculado en medios MSS de 100ml y se cultivaron a 30 °C durante 3 días en frascos de agitación de 500 ml en una coctelera giratoria. 10 MI del caldo de cultivo fue inoculado a un medio MU-1 de 100ml y cultivado a 30°C durante 6 días. El caldo de cultivo fue centrifugado y el sobrenadante fue filtrado utilizando filtros de membrana de 0.2 µm.

[0266] El gel de afinidad de alfa-ciclodextrina. Diez gramos de polvo de sefarosa 6B epoxi-activada (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, U.K) fue suspendido en y lavado con agua destilada en un filtro de vidrio sinterizado. El gel fue suspendido en solución de acoplamiento (100 ml de 12.5 mg/ml de alfa-ciclodextrina, 0.5 M NaOH) e incubado a temperatura ambiente durante un día con agitación suave. El gel fue lavado 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 bloqueo. El gel fue lavado luego varias veces utilizando 50 mM Tris-HCl, pH 8 y 50 mM NaOAc, pH 4.0 alternativamente. El gel fue finalmente envasado en una columna 35-40 ml usando un tampón de equilibrado (50 mM NaOAc, 150 mM NaCl, pH 4.5).

[0267] La purificación de glucoamilasa de caldo de cultivo. El caldo de cultivo de fermentación de Transformantes *A. niger* que contienen el gen de glucoamilasa fue filtrado 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 un tampón 50 mM NaOAc, 150 mM NaCl, de pH 4.5. El material no unido fue lavado fuera de la columna con tampón de equilibrado y la glucoamilasa fue eluida usando el mismo tampón que contiene 10 mM beta-ciclodextrina sobre 3 volúmenes de columna.

[0268] La actividad de glucoamilasa del eluyente fue controlada para ver si la glucoamilasa se ha ligado al gel de afinidad de alfa-ciclodextrina. La muestra de glucoamilasa purificada fue luego dializada contra 20 mM NaOAc, pH 5.0. La pureza fue controlada finalmente por SDS-PAGE y solo una única banda fue descubierta.

**Ejemplo 2:** construcción y expresión de una variante dirigida al sitio de glucoamilasa *Gloeofillum trabeum*

[0269] Dos reacciones PCR fueron realizadas con plásmido pNori140, descritas en el ejemplo 1, usando cebadores V59A-F y V59A-R mostrados a continuación, que fueron diseñados para alanina sustituta, A, en la posición 59 desde la secuencia madura a valina, V, y cebadores pra102 y pra103 mostrados a continuación, que fueron diseñados basados en la secuencia conocida y etiquetas adicionales para clonación directa por estrategia de IN-FUSION™.

Cebador pra102: 5' agtctgtatcggtatccatgtaccgcttcctgtctgtgct 3'  
 Cebador pra103: 5' cgcaccacgtggttaaacttaacccaagtgtcattctc 3'

[0270] El PCR fue realizado utilizando un motor de ADN PTC-200 bajo las condiciones descritas abajo.

Sistema de reacción PCR:		Condiciones:		
8 Micro L	H2O	1	94°C	2 Min
10 Micro L	2X Estrella principal (TaKaRa)	2	94°C	10 Seg
cebadores 0.5micro L X 2100 pmol/micro L		3	55°C	10 Seg
(V59A-F + pra344, V59A-R + pra343)		4	72°C	10 Seg
1 Micro L	Modelo ADN	2-4	25 Ciclos	

	5	72°C	10 Min
--	---	------	--------

[0271] Los fragmentos de ADN fueron recuperados de gel de agarosa por el equipo de extracción de gel Qiagen según la instrucción del fabricante. Los dos fragmentos purificados resultantes fueron clonados en un vector de expresión *Aspergillus*, pNori140, linealizados con *BamHI* y *PmeI* utilizando un IN-FUSION™ (BD Biosciences, Palo Alto, CA, USA) según las instrucciones del fabricante.

5 [0272] La mezcla de ligamiento fue usada para transformar células E. Coli DH5α (TOYOBO). Las colonias seleccionadas fueron inoculadas en un medio LB de 3 ml suplementado con 50 µg de ampicilina por ml e incubadas a 37°C a 225 r.p.m. durante toda la noche. El plásmido de ADN de las colonias seleccionadas fue purificado utilizando el kit de plásmido Qiagen mini (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. La secuencia de secuencia genética de la variante dirigida al sitio de glucoamilasa *Gloeofillum trabeum* fue verificada antes de la expresión heteróloga y uno de los plásmidos fue seleccionado para expresión adicional.

15 [0273] Los protoplastos de células huésped de *Aspergillus niger* eliminados para actividad de glucoamilasa endógena fueron preparados como se describe en la WO 95/02043. Cien µl de suspensión de protoplasto fueron mezclados con 2,5 µg del plásmido pNori140 que comprende el gen de variante G. *Trabeum* AMG con la sustitución específica de sitio y 250 microlitros de 60% PEG 4000 (Applichem) (polietilenglicol, peso molecular 4,000), 10 mM CaCl<sub>2</sub> y 10 mM pH Tris-HCl 7,5 fueron adicionados y suavemente mezclados. 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 COVE (Cove, 1996, Biochim. Biophys. Acta 133:51-56) (1 M) placas suplementadas con 10 mM de acetamida y 15 mM CsCl y adicionadas como una capa superior en las placas de sacarosa COVE (1 M) suplementadas con 10 mM de acetamida y 15 mM CsCl para selección de transformantes (4 ml agar superior por placa). Tras la incubación durante 6 días a 32°C, esporas de cinco transformantes fueron aisladas sobre placa II COVE y los transformantes aislados fueron sometidos para cultivo de matraz.

[0274] Otras variantes fueron construidas utilizando los cebadores directos e indirectos mostrados en la tabla de abajo.

5'-	acgcgtgactcgtcactcgcttcaagtct	-3	V59A-F
5'-	gagtgacgagtcacgcgt	-3	V59A-R
5'-	agcaggccctaatcccagc	-3	S95P-F
5'-	gattagggacctgctgaatg	-3	S95P-R
5'-	accggtccgtggggtcgacc	-3	A121P-F
5'-	acccacggaccggtgaatg	-3	A121P-R
5'-	tcactcgggttcaag	-3	V59G-F
5'-	cttgaacccgagtgga	-3	V59G-R
5'-	acgcgtgactcgtcactctgttcaagtct	-3	V59C-F
5'-	agacttgaacagagtgacgagtcacgcgt	-3	V59C-R
5'-	acatggagctatggttctgattgaccgcg	-3	A426G-F
5'-	cgcggtcaatgcagaacctatgctccatgt	-3	A426G-R
5'-	actggacgcgtgactcgtcactcttcaagtctctcatt	-3	V59I-F
5'-	tgacgagtcacgcgtccaag	-3	V59I-R
5'-	cgaaggcccatagcaaaaggccgcttcttccaacatt	-3	V18F-F
5'-	ggccttgctatgggacctcg	-3	V18F-R
5'-	taccagggcgggaacccatg	-3	S316W-F
5'-	gttcccgcctgtaccagctctccgggta	-3	S316W-R
5'-	gatgaaactgcattctggggtgcatgg	-3	T119W-F
5'-	gaatgcagttcatcgacat	-3	T119W-R

25 [0275] Cultivo. Los transformantes aislados fueron inoculados para placa COVE Ngly a 30°C durante 7 días y el cultivo de placa fue inoculado en 100ml de medios MSS y cultivada a 30 °C durante 3 días en frascos de agitación de 500 ml en una coctelera giratoria. 10 ml del caldo de cultivo fue inoculado a medio MU-1 de 100ml y cultivado a 30°C durante 6 días. El caldo de cultivo fue centrifugado y el sobrenadante fue filtrado utilizando 0.2 µm filtros de membrana.

30 **Ejemplo 3:** purificación de variantes Gt AMG dirigidas al sitio

[0276] Los transformantes seleccionados de la variante fueron cultivados en MU-1 descritos en el ejemplo 1 y el cultivo fue filtrado a través de un filtro PES de 0.22 µm 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

fue lavado 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.

5 [0277] La actividad de glucoamilasa del eluyente fue controlada para ver, si la glucoamilasa se ha ligado al gel de afinidad de alfa-ciclodextrina. Las muestras de glucoamilasa purificada fueron luego dializadas contra 20 mM NaOAc, pH 5.0.

**Ejemplo 4:** caracterización de la variante de glucoamilasa que tienen termo-estabilidad mejorada

10 [0278] La termo-estabilidad de variantes de glucoamilasa tiene sustituciones específicas o combinaciones de sustituciones fueron determinadas por medición de la actividad residual después del tratamiento térmico a 63° C y 67° C durante 1 hora utilizando el equipo de ensayo de glucoamilasa de Kikkoman. Los valores en la tabla son relativos a la actividad medida para la muestra de control que no ha sido sometida a un tratamiento térmico.

[0279] Los resultados se resumen en la tabla 1 de abajo.

Tabla 1.

AMG	Sustitución	Temperatura		GI
		63° C	67° C	
Peso		31	1	100
JGA064	V59A	57	9	158
JGA078	S95P	64	14	110
JGA083	A121P	49	8	-
JGA122	T119W	50	8	107
JGA098	S95P, A121P	81	48	107
JGA099	V59A, S95P	77	44	142
JGA123	S95P, T119W	69	38	100
JGA100	V59A, S95P, A121P	91	65	133
JGA125	S95P, T119W, A121P	81	63	100

15 [0280] La termo-estabilidad fue mejorada para todas las combinaciones evaluadas, desde las sustituciones únicas (JGA064, 078, 083 y 122), las sustituciones dobles, JGA098,099 y 123, a las mutaciones triples (JGA100 y 125) y JGA100 fue el más termoestable. Por otro lado, JGA064, 099 y 100 que tienen V59A mostraron menos inhibición de glucosa, de forma que sugirieron que la posición V59 fue importante también para inhibición de glucosa.

[0281] La inhibición de glucosa (GI) fue determinada como la proporción de actividades AMG con y sin 30% de glucosa. Los valores son relativos al tipo salvaje. Valores más altos corresponden a menor inhibición.

20 [0282] Para ajustar el espacio alrededor de V59,4 aminoácidos vecinos, V18; V37; T422 y A426, fueron seleccionados basados en el análisis de estructura. Cuatro bibliotecas de saturación dobles con V59 y aminoácidos seleccionados fueron construidas y seleccionadas.

**Ejemplo 5:** caracterización de variantes de glucoamilasa con tolerancia a la glucosa mejorada y termo-estabilidad mejorada

25 [0283] De bibliotecas de saturación doble (V59X-V18X, V59X-V37X, V59X-T422X, y V-59X- A426X), JGA127, 128 y 129 fueron seleccionados como los mejores candidatos para mejorar la inhibición de glucosa. Para mejorar la termo-estabilidad de JGA127 y 129, las sustituciones termo estabilizantes S95P, T119W y A121P, fueron introducidas. Sus resultados de caracterización se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Caracterización de variantes con menor inhibición de glucosa

AMG	Mutación	T		GI	SA
		63° C	67° C		
Peso		31	1	100	6.6
JGA127	V59C, A426G	40	3	184	4.7
JGA128	V59G, A426G	34	2	167	4.3
JGA129	V18F, V59I	1	1	164	5.0

## ES 2 674 701 T3

JGA132	V59C, S95P, T119W, A426G	JGA127 + JGA123	90	82	173	4.4
JGA133	V59C, S95P, T119W, A121P, A426G	JGA127 + JGA125	91	87	171	4.8
JGA142	V59C, S95P, A121P, A426G	JGA127 + JGA098	83	70	190	5.4
JGA145	V18F, V59I, S95P, A121P	JGA129 + JGA098	29	1	185	5.1
JGA146	V18F, V59I, S95P, T119W, A121P	JGA127 + JGA125	50	6	185	5.0

[0284] Todas las variantes han mantenido una actividad específica inferior.

**Ejemplo 6:** caracterización de variantes de glucoamilasa con tolerancia a la glucosa mejorada y termo-estabilidad mejorada combinada con buena actividad específica

5 [0285] JGA149 se obtuvo de la biblioteca de saturación de un sitio de sustitución S316X como una variante inhibida de menos glucosa mientras se mantiene la actividad específica de la glucoamilasa progenitora. Para mejorar su termo-estabilidad, las sustituciones S95P y A121P fueron introducidas en JGA149 y la variante resultante JGA151 fue caracterizada. La termo-estabilidad y actividad específica aumentó (tabla 4).

10 [0286] La forma G2 (ningún dominio de unión al almidón) de JGA098 y JGA151 se construyó y nombró JGA148 y 203, respectivamente. JGA148 y JGA203 mostraron actividad específica aumentada sin cambio de otras características (tabla 3).

Tabla 3.

AMG	Sustitución		T		GI	SA
			63° C	67° C		
Peso			31	1	100	6.6
JGA149	S316W		11	1	120	6.6
JGA151	S95P, A121P, S316W	JGA149 + JGA098	75	46	112	7.5
JGA203	S95P, A121P, S316W	G2 de JGA151				8.6
JGA148	S95P, A121P	G2 de JGA098	76	46	102	7.8
JGA098	S95P, A121P		81	48	107	6.3

### LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Novozymes A/S

<120> VARIANTES DE GLUCOAMILASA Y POLINUCLEÓTIDOS QUE LAS CODIFICAN

<130> 12396-WO-PCT

20 <160> 25

<170> PatentIn version 3.5

25 <210> 1  
<211> 1731  
<212> ADN  
<213> Gloeophyllum trabeum

30 <400> 1  
atgtaccgct tccttgtctg tgctctcggg cttctgggga cagtcctcgc tcagtcagtc 60  
gacagttatg tcggcagcga aggccccata gcaaaggccg gcgtccttgc caacattggg 120

35 ccgaacggct caaaggcctc tgggtgcagcc gccggcgtgg tgggtggctag cccagcaag 180

# ES 2 674 701 T3

tcggatcccg actattggta cacttggacg cgtgactcgt cactcgtttt caagtctctc 240  
 attgatcagt acaccactgg tatcgacagc acgagttcgt tgaggtctct gatagacagt 300  
 5 ttcgttattg ccgaggccaa cattcagcag gtctctaata ccagcggcac tcttactacc 360  
 ggcggcttgg gagagccaaa attcaatgtc gatgaaactg cattcaccgg tgcattgggt 420  
 10 cgaccccgagc gcgacggacc tgcgctccgt gcgactgctt tgatcaccta cgtaactgg 480  
 ctcttgtaaa acgggaacac gacctggggtt accagtaagc tgtggccgat catccagaac 540  
 15 gatctcaact acgtcgttca gtactggaac cagaccacct tcgacctctg ggaagaagtg 600  
 aactcttctc cgttcttcac cactgcagtg cagcaccgtg ccttgcgga aggcgagca 660  
 ttcgctacca agatcggta gacctcctcg gtcagcagct acacaacca agcggcgaat 720  
 20 ctactttgct ttttgagtc ttactggaac cccacttccg gatatatcac cgtaaacact 780  
 ggcggtggtc ggtccggcaa ggacgcaaac accctcttgg catccatcca cacttacgac 840  
 25 cccagcggg gctgcgatgc cagcacttc cagccctgct ccgacaaagc cctctcgaat 900  
 ctgaaggttt acgtcgactc cttccgttct gtctactcca tcaacagcgg tattgcctct 960  
 aacgccgctg tcgccactgg tcgctaccgg gaagacagct accagggcgg gaacccatgg 1020  
 30 tacctcacta cgttcgcgt cgccgagcag ctctatgacg ccctcaatgt ctgggctgct 1080  
 cagggtccc tcaatgtcac ctccatctcc ctccccttct tccagcagtt ctctctagt 1140  
 35 gtcactgccg gcaactacgc ttcgagctcc accacttaca cgactctgac ctccgccatt 1200  
 aagagcttcg cggatggatt cgtcgtatc aacgccagc acagccgctc caacggtggc 1260  
 ctcgctgagc agttcagcag gagcaacggc gctcccgtca gcgctgttga tttgacatgg 1320  
 40 agctatgcat ctgcattgac cgcgtttgaa gcgaggaata atactcagtt cgccggctgg 1380  
 ggcgcgtag gtttgactgt gccgacctcg tgctccagca acagtgggtg aggcggagga 1440  
 45 tcgactgtcg ccgtgacgtt caactgaaac gccaaaacgg tttggggcga aaacatctac 1500  
 atcactggct cggttgacgc tctgagtaac tggctcccg acaacgcct cttgctctcg 1560  
 tctgccaact acccgacctg gagcattacc gtgaatttac ccgagagcac tgccattcag 1620  
 50 tataagtata tccgcaagaa caacggagct gtcacctggg aatccgatcc caacaacagc 1680  
 ataactactc cagccagcgg ctccgtgacc gagaatgaca cttggcgta a 1731

55 <210> 2  
 <211> 576  
 <212> PRT  
 <213> Gloeophyllum trabeum

60 <400> 2

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

65 Ala Gln Ser Val Asp Ser Tyr Val Gly Ser Glu Gly Pro Ile Ala Lys  
 20 25 30

# ES 2 674 701 T3

Ala Gly Val Leu Ala Asn Ile Gly Pro Asn Gly Ser Lys Ala Ser Gly  
 35 40 45  
 5

Ala Ala Ala Gly Val Val Val Ala Ser Pro Ser Lys Ser Asp Pro Asp  
 50 55 60  
 10

Tyr Trp Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Ser Leu Val Phe Lys Ser Leu  
 65 70 75 80  
 15

Ile Asp Gln Tyr Thr Thr Gly Ile Asp Ser Thr Ser Ser Leu Arg Ser  
 85 90 95  
 20

Leu Ile Asp Ser Phe Val Ile Ala Glu Ala Asn Ile Gln Gln Val Ser  
 100 105 110  
 25

Asn Pro Ser Gly Thr Leu Thr Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe  
 115 120 125  
 30

Asn Val Asp Glu Thr Ala Phe Thr Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg  
 130 135 140  
 35

Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Leu Ile Thr Tyr Gly Asn Trp  
 145 150 155 160  
 40

Leu Leu Ser Asn Gly Asn Thr Thr Trp Val Thr Ser Thr Leu Trp Pro  
 165 170 175  
 45

Ile Ile Gln Asn Asp Leu Asn Tyr Val Val Gln Tyr Trp Asn Gln Thr  
 180 185 190  
 50

Thr Phe Asp Leu Trp Glu Glu Val Asn Ser Ser Ser Phe Phe Thr Thr  
 195 200 205  
 55

Ala Val Gln His Arg Ala Leu Arg Glu Gly Ala Ala Phe Ala Thr Lys  
 210 215 220  
 60

Ile Gly Gln Thr Ser Ser Val Ser Ser Tyr Thr Thr Gln Ala Ala Asn  
 225 230 235 240  
 65

Leu Leu Cys Phe Leu Gln Ser Tyr Trp Asn Pro Thr Ser Gly Tyr Ile  
 245 250 255  
 70

Thr Ala Asn Thr Gly Gly Gly Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr Leu  
 260 265 270  
 75

Leu Ala Ser Ile His Thr Tyr Asp Pro Ser Ala Gly Cys Asp Ala Thr  
 275 280 285  
 80

Thr Phe Gln Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val Tyr

# ES 2 674 701 T3

	290		295		300															
5	Val 305	Asp	Ser	Phe	Arg	Ser 310	Val	Tyr	Ser	Ile	Asn 315	Ser	Gly	Ile	Ala	Ser 320				
10	Asn	Ala	Ala	Val	Ala 325	Thr	Gly	Arg	Tyr	Pro 330	Glu	Asp	Ser	Tyr	Gln 335	Gly				
15	Gly	Asn	Pro	Trp 340	Tyr	Leu	Thr	Thr	Phe 345	Ala	Val	Ala	Glu	Gln 350	Leu	Tyr				
20	Asp	Ala	Leu 355	Asn	Val	Trp	Ala	Ala 360	Gln	Gly	Ser	Leu	Asn 365	Val	Thr	Ser				
25	Ile	Ser 370	Leu	Pro	Phe	Phe	Gln 375	Gln	Phe	Ser	Ser	Ser 380	Val	Thr	Ala	Gly				
30	Thr 385	Tyr	Ala	Ser	Ser	Ser 390	Thr	Thr	Tyr	Thr	Thr 395	Leu	Thr	Ser	Ala	Ile 400				
35	Lys	Ser	Phe	Ala	Asp 405	Gly	Phe	Val	Ala	Ile 410	Asn	Ala	Gln	Tyr	Thr 415	Pro				
40	Ser	Asn	Gly	Gly 420	Leu	Ala	Glu	Gln	Phe 425	Ser	Arg	Ser	Asn	Gly 430	Ala	Pro				
45	Val	Ser	Ala	Val	Asp	Leu	Thr	Trp 440	Ser	Tyr	Ala	Ser	Ala 445	Leu	Thr	Ala				
50	Phe	Glu 450	Ala	Arg	Asn	Asn	Thr 455	Gln	Phe	Ala	Gly	Trp 460	Gly	Ala	Val	Gly				
55	Leu 465	Thr	Val	Pro	Thr	Ser 470	Cys	Ser	Ser	Asn	Ser 475	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly 480				
60	Ser	Thr	Val	Ala	Val 485	Thr	Phe	Asn	Val	Asn 490	Ala	Gln	Thr	Val	Trp 495	Gly				
65	Glu	Asn	Ile	Tyr 500	Ile	Thr	Gly	Ser	Val 505	Asp	Ala	Leu	Ser	Asn 510	Trp	Ser				
70	Pro	Asp	Asn 515	Ala	Leu	Leu	Leu	Ser 520	Ser	Ala	Asn	Tyr	Pro 525	Thr	Trp	Ser				
75	Ile	Thr 530	Val	Asn	Leu	Pro	Ala 535	Ser	Thr	Ala	Ile	Gln 540	Tyr	Lys	Tyr	Ile				
80	Arg 545	Lys	Asn	Asn	Gly	Ala 550	Val	Thr	Trp	Glu	Ser 555	Asp	Pro	Asn	Asn	Ser 560				

# ES 2 674 701 T3

Ile Thr Thr Pro Ala Ser Gly Ser Val Thr Glu Asn Asp Thr Trp Arg  
565 570 575

5 <210> 3  
<211> 559  
<212> PRT  
<213> Gloeophyllum trabeum

10 <400> 3

Gln Ser Val Asp Ser Tyr Val Gly Ser Glu Gly Pro Ile Ala Lys Ala  
1 5 10 15

15 Gly Val Leu Ala Asn Ile Gly Pro Asn Gly Ser Lys Ala Ser Gly Ala  
20 25 30

20 Ala Ala Gly Val Val Val Ala Ser Pro Ser Lys Ser Asp Pro Asp Tyr  
35 40 45

25 Trp Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Ser Leu Val Phe Lys Ser Leu Ile  
50 55 60

30 Asp Gln Tyr Thr Thr Gly Ile Asp Ser Thr Ser Ser Leu Arg Ser Leu  
65 70 75 80

35 Ile Asp Ser Phe Val Ile Ala Glu Ala Asn Ile Gln Gln Val Ser Asn  
85 90 95

40 Pro Ser Gly Thr Leu Thr Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Asn  
100 105 110

40 Val Asp Glu Thr Ala Phe Thr Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp  
115 120 125

45 Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Leu Ile Thr Tyr Gly Asn Trp Leu  
130 135 140

50 Leu Ser Asn Gly Asn Thr Thr Trp Val Thr Ser Thr Leu Trp Pro Ile  
145 150 155 160

55 Ile Gln Asn Asp Leu Asn Tyr Val Val Gln Tyr Trp Asn Gln Thr Thr  
165 170 175

60 Phe Asp Leu Trp Glu Glu Val Asn Ser Ser Ser Phe Phe Thr Thr Ala  
180 185 190

60 Val Gln His Arg Ala Leu Arg Glu Gly Ala Ala Phe Ala Thr Lys Ile  
195 200 205

65 Gly Gln Thr Ser Ser Val Ser Ser Tyr Thr Thr Gln Ala Ala Asn Leu  
210 215 220

# ES 2 674 701 T3

	Leu	Cys	Phe	Leu	Gln	Ser	Tyr	Trp	Asn	Pro	Thr	Ser	Gly	Tyr	Ile	Thr	225	230	235	240
5	Ala	Asn	Thr	Gly	Gly	Gly	Arg	Ser	Gly	Lys	Asp	Ala	Asn	Thr	Leu	Leu	245	250	255	
10	Ala	Ser	Ile	His	Thr	Tyr	Asp	Pro	Ser	Ala	Gly	Cys	Asp	Ala	Thr	Thr	260	265	270	
15	Phe	Gln	Pro	Cys	Ser	Asp	Lys	Ala	Leu	Ser	Asn	Leu	Lys	Val	Tyr	Val	275	280	285	
20	Asp	Ser	Phe	Arg	Ser	Val	Tyr	Ser	Ile	Asn	Ser	Gly	Ile	Ala	Ser	Asn	290	295	300	
25	Ala	Ala	Val	Ala	Thr	Gly	Arg	Tyr	Pro	Glu	Asp	Ser	Tyr	Gln	Gly	Gly	305	310	315	320
30	Asn	Pro	Trp	Tyr	Leu	Thr	Thr	Phe	Ala	Val	Ala	Glu	Gln	Leu	Tyr	Asp	325	330	335	
35	Ala	Leu	Asn	Val	Trp	Ala	Ala	Gln	Gly	Ser	Leu	Asn	Val	Thr	Ser	Ile	340	345	350	
40	Ser	Leu	Pro	Phe	Phe	Gln	Gln	Phe	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Gly	Thr	355	360	365	
45	Tyr	Ala	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Tyr	Thr	Thr	Leu	Thr	Ser	Ala	Ile	Lys	370	375	380	
50	Ser	Phe	Ala	Asp	Gly	Phe	Val	Ala	Ile	Asn	Ala	Gln	Tyr	Thr	Pro	Ser	385	390	395	400
55	Asn	Gly	Gly	Leu	Ala	Glu	Gln	Phe	Ser	Arg	Ser	Asn	Gly	Ala	Pro	Val	405	410	415	
60	Ser	Ala	Val	Asp	Leu	Thr	Trp	Ser	Tyr	Ala	Ser	Ala	Leu	Thr	Ala	Phe	420	425	430	
65	Glu	Ala	Arg	Asn	Asn	Thr	Gln	Phe	Ala	Gly	Trp	Gly	Ala	Val	Gly	Leu	435	440	445	
70	Thr	Val	Pro	Thr	Ser	Cys	Ser	Ser	Asn	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	450	455	460	
75	Thr	Val	Ala	Val	Thr	Phe	Asn	Val	Asn	Ala	Gln	Thr	Val	Trp	Gly	Glu	465	470	475	480
80	Asn	Ile	Tyr	Ile	Thr	Gly	Ser	Val	Asp	Ala	Leu	Ser	Asn	Trp	Ser	Pro	485	490	495	



# ES 2 674 701 T3

```

    <212> ADN
    <213> Artificial

    <220>
5    <223> Cebador PCR

    <400> 8
    agcaggtccc taatcccagc                                20

10

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

15

    <220>
    <223> Cebador PCR

    <400> 9
20    gattagggac ctgctgaatg                                20

    <210> 10
    <211> 20
25    <212> ADN
    <213> Artificial

    <220>
    <223> Cebador PCR

30

    <400> 10
    accggtccgt ggggtcgacc                                20

35

    <210> 11
    <211> 20
    <212> ADN
    <213> Artificial

40

    <220>
    <223> Cebador PCR

    <400> 11
45    accccacgga ccggtgaatg                                20

    <210> 12
    <211> 15
50    <212> ADN
    <213> Artificial

    <220>
    <223> Cebador PCR

55

    <400> 12
    tcactcgggt tcaag                                    15

60

    <210> 13
    <211> 15
    <212> ADN
    <213> Artificial

    <220>
65    <223> Cebador PCR

    <400> 13

```

# ES 2 674 701 T3

	cttgaacccg agtga	15
5	<210> 14 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Cebador PCR	
	<400> 14 acgcgtgact cgtcactctg tttcaagtct	30
15	<210> 15 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Cebador PCR	
25	<400> 15 agacttgaaa cagagtgacg agtcacgcgt	30
30	<210> 16 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> Cebador PCR	
	<400> 16 acatggagct atggttctgc attgaccgcg	30
40	<210> 17 <211> 30 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Cebador PCR	
50	<400> 17 cgcggtcaat gcagaacat agtccatgt	30
55	<210> 18 <211> 42 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Cebador PCR	
60	<400> 18 acttggacgc gtgactcgtc actcattttc aagtctctca tt	42
65	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	

# ES 2 674 701 T3

```

<220>
<223> Cebador PCR

5 <400> 19
  tgacgagtca cgcgtccaag                                20

<210> 20
10 <211> 40
  <212> ADN
  <213> Artificial

<220>
15 <223> Cebador PCR

  <400> 20
  cgaaggcccc atagcaaagg cgggtttct tgccaacatt          40

20
  <210> 21
  <211> 22
  <212> ADN
  <213> Artificial

25
  <220>
  <223> Cebador PCR

  <400> 21
30 ggcctttgct atggggcctt cg                                22

  <210> 22
  <211> 20
35 <212> ADN
  <213> Artificial

  <220>
  <223> Cebador PCR

40
  <400> 22
  taccagggcg ggaacccatg                                20

45
  <210> 23
  <211> 30
  <212> ADN
  <213> Artificial

50
  <220>
  <223> Cebador PCR

  <400> 23
55 gttcccgcce tggtagcagt cttccgggta                    30

  <210> 24
  <211> 27
  <212> ADN
60 <213> Artificial

  <220>
  <223> Cebador PCR

65
  <400> 24
  gatgaaactg cattctgggg tgcatgg                        27

```

# ES 2 674 701 T3

<210> 25  
<211> 20  
<212> ADN  
5 <213> Artificial  
  
<220>  
<223> Cebador PCR  
  
10 <400> 25  
gaatgcagtt tcatcgacat

20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Variante de glucoamilasa, que comprende una sustitución en una o más posiciones correspondientes a posiciones 95, 59, 119, y 121, del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3, donde la variante tiene actividad de glucoamilasa y donde la variante tiene al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%, pero menos de la 100% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID N.º: 3, cuya variante comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consiste en 59A, 95P, 119W y 121P, y donde la variante comprende al menos una de las siguientes sustituciones o combinaciones de sustituciones:
- 10 V59A;  
S95P;  
A121P;  
T119W;  
S95P + A121P;  
15 V59A + S95P;  
S95P + T119W;  
V59A + S95P + A121P; o  
S95P + T119W + A121P; y donde las variantes tienen termo-estabilidad aumentada en comparación con la glucoamilasa progenitora de la SEQ ID N.º: 3.
- 20 2. Composición que comprende el polipéptido según la reivindicación 1.
- 30 3. Composición según la reivindicación 2, que incluye una alfa-amilasa.
4. Uso de un polipéptido según la reivindicación 1 para la producción de jarabe y/o un producto de fermentación.
5. Proceso de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye las etapas de:
- 25 (a) licuefacción de material que contiene almidón en presencia de una alfa amilasa;  
(b) sacarificación del material licuado; y  
(c) fermentación con un organismo fermentador;
- donde el paso (a) y/o paso (b) se realiza usando al menos una glucoamilasa variante según la reivindicación 1.
- 30 6. Proceso de producción de un producto de jarabe de material que contiene almidón, que comprende el paso de:
- (a) licuefacción de material que contiene almidón en presencia de una alfa amilasa;  
(b) sacarificación del material licuado en presencia de una glucoamilasa variante según la reivindicación 1.
- 35 7. Polinucleótido aislado que codifica la variante según la reivindicación 1.
8. Constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido según la reivindicación 7.
9. Vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 7.
10. Célula huésped que comprende el polinucleótido según la reivindicación 7.