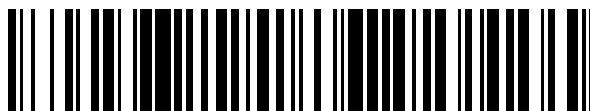


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 385**

51 Int. Cl.:

C12N 15/56	(2006.01)
C12N 9/24	(2006.01)
C12P 19/14	(2006.01)
C12P 19/02	(2006.01)
C12P 19/20	(2006.01)
C12P 7/06	(2006.01)
C12N 9/30	(2006.01)
C12N 9/28	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2012 PCT/US2012/045670**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013 WO13006756**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2012 E 12738308 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2019 EP 2729572**

54 Título: **Variantes de alfa-amilasa y polinucleótidos que codifican las mismas**

30 Prioridad:

06.07.2011 US 201161504771 P
07.07.2011 US 201161505192 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.11.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MATSUI, TOMOKO;
TOMIKI, AKI y
COWARD-KELLY, GUILLERMO

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 729 385 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 alfa-amilasa y polinucleótidos que codifican las mismas

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 5 [0001] La presente invención se refiere a variantes de una alfa-amilasa, polinucleótidos que codifican las variantes, métodos de producción de las variantes y métodos de uso de las variantes.

Descripción de las técnicas relacionadas

- 10 [0002] La presente invención proporciona variantes de una alfa-amilasa parental con propiedades mejoradas en comparación con su progenitor. Las alfa-amilasas (1,4- α -D-glucano glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1) constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de almidón y otros oligo- y polisacáridos 1,4-glucosídicos lineales y ramificados.

- 15 [0003] Hay un cuerpo muy extenso de bibliografía de patentes y científica relacionada con esta clase de enzimas muy importante industrialmente. Una serie de alfa-amilasas denominadas "alfa-amilasas similares a Termamyl®-0" y variantes de las mismas se conocen de, por ejemplo, WO 90/11352, WO 95/10603, WO 95/26397, WO 96/23873 y WO 96/23874. Las alfa-amilasas similares a Termamyl® son muy termoestables y, por lo tanto, adecuadas para los procesos realizados a altas temperaturas como la licuefacción del almidón en los procesos de producción de dextrosa.

- 20 [0004] Otro grupo de alfa-amilasas se denominan "alfa-amilasas similares a Fungamyl™", que están relacionadas con las alfa-amilasas o son homólogas a la alfa-amilasa derivada de *Aspergillus oryzae*. Las alfa-amilasas similares a Fungamyl tienen una termoestabilidad relativamente baja, por ejemplo, el producto comercial vendido bajo el nombre comercial FUNGAMYL™ por Novozymes A/S, Dinamarca, tiene una temperatura óptima de alrededor de 55°C y no es adecuada para los procesos realizados a altas temperaturas. Las alfa-amilasas similares a Fungamyl™ se usan hoy para la fabricación de jarabes, por ejemplo, para la industria cervecera.

- 25 [0005] Previamente se ha aislado con éxito una alfa-amilasa con una termoestabilidad aumentada, preferiblemente a un pH ácido. WO 2004/055178 divulga un gen de *Rhizomucor pusillus* que codifica una alfa-amilasa denominada AM782. La caracterización de esta amilasa ha demostrado que es una alfa-amilasa altamente termoacidófila que tiene una actividad muy interesante como demuestra el perfil de azúcares de la hidrólisis de maltodextrina por la amilasa AM782. La amilasa AM782 puede trabajar a una temperatura muy alta, al menos de hasta 70°C. Sin embargo, esta alfa-amilasa tiene una estabilidad de almacenamiento pobre si se almacena sin enfriamiento. WO2009/030728 divulga una alfa-amilasa híbrida de *Rhizomucor pusillus* con un conector y un SBD de la glucoamilasa de *A. niger* estabilizada con sulfito de sodio en la formulación.

- 30 [0006] Es un objeto de la presente invención proporcionar variantes de la AM782 estables durante el almacenamiento como la SEQ ID NO: 3 (polipéptido maduro), que han retenido una buena actividad de hidrólisis de almidón crudo.

Resumen de la invención

- 35 [0007] La presente invención se refiere a variantes de alfa-amilasa que tienen una termoestabilidad mejorada en comparación con una alfa-amilasa parental divulgada como la SEQ ID NO: 3, que comprenden una sustitución en una posición que corresponde a la posición 143 y que comprenden además una o más sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 128, 141, 192, 20, 76, 123, 136, 142, 165, 219, 224, 265, 383 y 410 del polipéptido de la SEQ ID NO: 3, donde la variante de alfa-amilasa o un fragmento de la misma tiene actividad de alfa-amilasa, y donde la variante de alfa-amilasa tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID NO: 3, y donde la variante de alfa-amilasa o un fragmento de la misma comprende al menos una de las siguientes sustituciones o combinaciones de sustituciones:
- 40

G128D + D143N; o
N142D + D143N; o

Y141W + D143N; o
 Y141W + N142D + D143N; o
 G128D + Y141W + D143N; o
 Y141W + D143N + P219C; o
 Y141W + D143N + K192R; o
 G128D + D143N + K192R; o
 Y141W + D143N + K192R + P219C; o
 G128D + Y141W + D143N + K192R; o
 G128D + Y141W + D143N + K192R + P219C.

- 5
- 10 [0008] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican las variantes; construcciones de ácido nucleico, vectores y células huésped que comprenden los polinucleótidos; y métodos para producir las variantes.

[0009] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón usando las variantes de la invención.

15 **Descripción detallada de la invención**

[0010] La presente descripción se refiere a variantes de una alfa-amilasa parental, que comprende una sustitución en una o más (varias) posiciones correspondientes a las posiciones 128, 143, 141, 192, 20, 76, 123, 136, 142, 165, 219, 224, 265, 383 y 410 del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, donde la variante tiene actividad de alfa-amilasa.

Definiciones

- 20 [0011] **Actividad de alfa-amilasa:** el término "actividad de alfa-amilasa" significa una 1,4-alfa-D-glucano glucanohidrolasa, EC. 3.2.1.1, que cataliza la hidrólisis del almidón y otros oligo- y polisacáridos 1,4-glucosídicos lineales y ramificados. Para fines de la presente invención, la actividad de alfa-amilasa se puede determinar usando un kit de ensayo de alfa-amilasa, por ejemplo, disponible de Kikkoman Biochemifa Company, n.º de cat. 60213. Véase la sección de materiales y métodos para más detalle. 1U = 1 µmol de CNP liberado/min. a 30°C, pH 4,0. Alternativamente se pueden usar otros métodos adecuados para determinar la actividad de las alfa-amilasas.
- 25

[0012] Los polipéptidos de las variantes de la presente invención tienen al menos un 20%, por ejemplo, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% y al menos el 100% de la actividad de alfa-amilasa del polipéptido maduro de la alfa-amilasa parental comprendida en la SEQ ID NO: 2. En una forma de realización, la alfa-amilasa madura consiste en la SEQ ID NO: 3.

- 30 [0013] **Variante:** el término "variante" significa un polipéptido con actividad de alfa-amilasa que comprende una modificación, es decir, una sustitución, inserción y/o delección, en una o más (varias) posiciones. Una sustitución significa una sustitución de un aminoácido que ocupa una posición por un aminoácido diferente; una delección significa la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa la adición de uno o más, por ejemplo 1-3, aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición. Preferiblemente la modificación es una sustitución. Los polipéptidos de las variantes de la presente invención tienen al menos un 20%, por ejemplo, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% y al menos el 100% de la actividad de alfa-amilasa del polipéptido maduro de la alfa-amilasa parental, por ejemplo, la SEQ ID NO: 3.
- 35

[0014] **Mutante:** el término "mutante" significa un polinucleótido que codifica una variante.

- 40 [0015] **Enzima de tipo salvaje:** el término alfa-amilasa "de tipo salvaje" significa una alfa-amilasa expresada por un microorganismo de origen natural, tal como una bacteria, una levadura o un hongo filamentoso encontrados en la naturaleza.

- 45 [0016] **Progenitor o alfa-amilasa parental:** el término "progenitor" o "alfa-amilasa parental" significa una alfa-amilasa a la que se le produce una modificación para producir las variantes enzimáticas de la presente invención. El progenitor puede ser un polipéptido de origen natural (de tipo salvaje) o una variante del mismo.

[0017] **Aislado:** el término "aislado(s)/aislada(s)/aislar/aísla" significa una sustancia en una forma o un entorno que no ocurre en la naturaleza. Los ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no ocurra de forma natural, (2) cualquier sustancia incluyendo, pero de forma no limitativa, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se extrae al menos parcialmente de uno o más o todos los constituyentes de origen natural con los cuales está asociada 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 aumentando la cantidad de la sustancia con respecto a otros componentes con los cuales está naturalmente asociada (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.

[0018] **Variante sustancialmente pura:** el término "variante sustancialmente pura" significa una preparación que contiene como mucho un 10%, como mucho un 8%, como mucho un 6%, como mucho un 5%, como mucho un 4%, como mucho un 3%, como mucho un 2%, como mucho un 1% y como mucho un 0,5% en peso de otro material polipeptídico con el cual se asocia originalmente o por recombinación. Preferiblemente, la variante es al menos un 92% pura, por ejemplo, al menos un 94% pura, al menos un 95% pura, al menos un 96% pura, al menos un 97% pura, al menos un 98% pura, al menos un 99%, al menos un 99,5% pura o el 100% pura en peso del material polipeptídico total presente en la preparación. Las variantes de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura. Esto se puede conseguir, por ejemplo, preparando la variante por métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación tradicionales.

[0019] **Polipéptido maduro:** el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final tras la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como el procesamiento N-terminal, el truncamiento C-terminal, la glicosilación, la fosforilación, etc. En una forma de realización, el polipéptido maduro consiste en los aminoácidos 34 a 471 de la SEQ ID NO: 2 en base al programa SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6) que predice que los aminoácidos 1 a 21 de la SEQ ID NO: 2 son un péptido señal y los aminoácidos 22 a 33 son un propéptido. El polipéptido maduro se divulga como la SEQ ID NO: 3.

[0020] **Secuencia codificante del polipéptido maduro:** el término "secuencia codificante del polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro con actividad de alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro consiste en los nucleótidos 100 a 1416 (incluyendo el codón de terminación) de la SEQ ID NO: 1 en base a SignalP (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6) que predice que los nucleótidos 1 a 63 de la SEQ ID NO: 1 codifican un péptido señal y los nucleótidos 64 a 99 codifican un propéptido.

[0021] **Identidad de secuencia:** la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad de secuencia". Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son una penalización por apertura de espacio de 10, una penalización por extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

(Residuos idénticos x 100)/(Longitud del alineamiento – Número total de espacios en el alineamiento)

[0022] Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, *supra*), preferiblemente la versión 5.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son una penalización por apertura de espacio de 10, una penalización por extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión de EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido usando la opción -nobrief) se usa como el porcentaje de identidad y se calcula de la siguiente manera:

(Desoxirribonucleótidos idénticos x 100)/(Longitud del alineamiento – Número total de espacios en el alineamiento)

[0023] **Fragmento:** el término "fragmento" significa un polipéptido con uno o más (varios) aminoácidos eliminados del amino y/o carboxilo terminal de un polipéptido maduro; donde el fragmento tiene actividad de alfa-amilasa.

5 [0024] **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 la mutación y puede resultar en polimorfismos dentro de las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos con secuencias de aminoácidos modificadas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

10 [0025] **Polinucleótido sustancialmente puro:** el término "polinucleótido sustancialmente puro" significa una preparación polinucleotídica libre de otros nucleótidos externos o no deseados y en una forma adecuada para el uso dentro de sistemas de producción de polipéptidos genéticamente modificados. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como mucho un 10%, como mucho un 8%, como mucho un 6%, como mucho un 5%, como mucho un 4%, como mucho un 3%, como mucho un 2%, como mucho un 1% o como mucho un 0,5% en peso de otro material polinucleotídico con el cual se asocia originalmente o por recombinación. Un polinucleótido sustancialmente puro puede, sin embargo, incluir regiones no traducidas 5'- y 3'- de origen natural, tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido sustancialmente puro sea al menos un 90% puro, por ejemplo, al menos un 92% puro, al menos un 94% puro, al menos un 95% puro, al menos un 96% puro, al menos un 97% puro, al menos un 98% puro, al menos un 99% puro o al menos un 99,5% puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura.

20 [0026] **Secuencia codificante:** el término "secuencia codificante" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto polipeptídico. Los límites de la secuencia codificante están determinados generalmente por un marco de lectura abierto, que empieza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG y acaba con un codón de terminación tal como TAA, TAG y TGA. La secuencia codificante puede ser un polinucleótido de ADN, ADNc, sintético o recombinante.

25 [0027] **ADNc:** el término "ADNc" significa una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm empalmado maduro obtenida de una célula eucariota. El ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito de ARN primario inicial es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de pasos, incluido el empalme, antes de aparecer como ARNm empalmado maduro.

30 [0028] **Construcción de ácido nucleico:** el término "construcción de ácido nucleico" significa una molécula de ácido nucleico, ya sea uni- o bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o se modifica para contener segmentos de de ácidos nucleicos de manera que de otro modo no existiría en la naturaleza o que es sintética. El término construcción de ácido nucleico es sinónimo del término "casete de expresión" cuando la construcción de ácido nucleico contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

35 [0029] **Secuencias de control:** el término "secuencias de control" significa todos los componentes necesarios para la expresión de un polinucleótido que codifica una variante de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o exógena respecto al polinucleótido que codifica la variante o nativa o exógena entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control pueden proporcionarse con conectores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten el ligamiento de las secuencias de control con la región codificante del polinucleótido que codifica una variante.

[0030] **Operativamente unido:** el término "operativamente unido/a" significa una configuración donde una secuencia de control se coloca en una posición apropiada respecto a la secuencia codificante de un polinucleótido de manera que la secuencia de control dirija la expresión de la secuencia codificante.

45 [0031] **Expresión:** el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de la variante incluyendo, pero de forma no limitativa, la transcripción, la modificación postranscripcional, la traducción, la modificación postraduccional y la secreción.

[0032] **Vector de expresión:** el término "vector de expresión" significa una molécula lineal o circular de ADN que comprende un polinucleótido que codifica una variante y está operativamente unido a nucleótidos adicionales que proveen a su expresión.

5 [0033] **Célula huésped:** el término "célula huésped" significa cualquier tipo celular que es susceptible a la transformación, la transfección, la transducción y similares con una construcción de ácido nucleico o un vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula parental que no es idéntico a la célula parental debido a las mutaciones que ocurren durante la replicación.

10 [0034] **Propiedad mejorada:** el término "propiedad mejorada" significa una característica asociada a una variante que está mejorada en comparación con el progenitor. Tales propiedades mejoradas incluyen, pero de forma no limitativa, la actividad térmica, la termoestabilidad, la actividad de pH, la estabilidad de pH, la especificidad de sustrato/cofactor, las propiedades superficiales mejoradas, la especificidad de producto, la estabilidad aumentada, la estabilidad mejorada bajo condiciones de almacenamiento y la estabilidad química.

15 [0035] **Termoestabilidad mejorada:** el término "termoestabilidad mejorada" significa una variante que presenta una actividad de alfa-amilasa residual mejorada después de un periodo de incubación a temperatura elevada respecto al progenitor, ya sea en un tampón o bajo condiciones tales como aquellas que existen durante el almacenamiento/transporte del producto o condiciones similares a aquellas que existen durante el uso industrial de la variante. Una variante puede o puede no presentar un perfil de actividad térmica modificado respecto al progenitor. Por ejemplo, una variante puede tener una capacidad mejorada para volver a plegarse tras la incubación a una temperatura elevada respecto al progenitor. Una variante según la presente invención presenta una actividad residual mejorada en comparación con la alfa-amilasa parental de *Rhizomucor pusilus*, divulgada como el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, después de la incubación durante 1 hora a 65°C a pH 3,5. La actividad residual se midió como se describe en los ejemplos.

20

25 [0036] En un aspecto, la termoestabilidad de la variante con actividad de alfa-amilasa es al menos 1,05 veces, por ejemplo, al menos 1,1 veces, al menos 1,5 veces, al menos 1,8 veces, al menos 2 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, al menos 15 veces, al menos 20 veces o al menos 25 veces más termoestable que el progenitor cuando la actividad residual se compara usando, por ejemplo, el kit de actividad de amilasa disponible de Kikkoman Biochemifa Company, n.º de cat. 60213). También pueden usarse otros ensayos de amilasa adecuados.

30 [0037] **Estabilidad al pH mejorada:** el término "estabilidad al pH mejorada" significa una variante que presenta una retención de la actividad de alfa-amilasa después de un periodo de incubación a un pH específico, que reduce la actividad enzimática del progenitor. Las variantes según la presente invención pueden tener una tolerancia mejorada a un pH inferior a 4,7, tal como inferior a 4,5, particularmente inferior a 4,0, más particularmente inferior a 3,8, tal como pH 3,5.

35 [0038] **Estabilidad de almacenamiento mejorada:** el término "estabilidad de almacenamiento mejorada" significa una variante que presenta una actividad de alfa-amilasa residual mejorada con respecto a una alfa-amilasa parental tras la incubación durante un periodo de tiempo a un pH y una temperatura específicos. Las condiciones evaluadas incluyen un pH 4,0, a 40°C durante 3 a 10 días.

Convenciones para la designación de las variantes

40 [0039] Para fines de la presente invención, el polipéptido maduro comprendido en la SEQ ID NO: 2 se usa para determinar el residuo de aminoácido correspondiente en otra alfa-amilasa. En una forma de realización particular, el polipéptido maduro consiste en el polipéptido de la SEQ ID NO: 3 y las posiciones específicas sustituidas según la invención se refieren a las posiciones de la SEQ ID NO 3. La secuencia de aminoácidos de otra alfa-amilasa se alinea por lo tanto con el polipéptido maduro comprendido en la SEQ ID NO: 2 y, en función del alineamiento, el número de posición del aminoácido correspondiente a cualquier residuo de aminoácido en el polipéptido maduro comprendido en la SEQ ID NO: 2 se determina usando 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 la versión 5.0.0 o posterior.

45

[0040] La identificación del residuo de aminoácido correspondiente en otra alfa-amilasa se puede confirmar mediante un alineamiento de secuencias polipeptídicas múltiples usando varios programas informáticos incluyendo, pero de forma

no limitativa, MUSCLE (comparación de múltiples secuencias por log-expectativa; versión 3.5 o posterior; Edgar, 2004, Nucleic Acids Research 32: 1792-1797), MAFFT (versión 6.857 o posterior; Katoh y Kuma, 2002, Nucleic Acids Research 30: 3059-3066; Katoh et al., 2005, Nucleic Acids Research 33: 511-518; Katoh y Toh, 2007, Bioinformatics 23: 372-374; Katoh et al., 2009, Methods in Molecular Biology 537: 39-64; Katoh y Toh, 2010, Bioinformatics 26: 1899-1900) y EMBOSS EMMA utilizando ClustalW (1.83 o posterior; Thompson et al., 1994, Nucleic Acids Research 22: 4673-4680), usando sus respectivos parámetros por defecto.

[0041] Cuando la otra enzima ha divergido del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de manera que la comparación tradicional basada en secuencias no consigue detectar su relación (Lindahl y Elofsson, 2000, J. Mol. Biol. 295: 613-615), se pueden usar otros algoritmos de comparación de secuencias por pares. Se puede lograr una mayor sensibilidad en la búsqueda de secuencias usando programas de búsqueda que utilizan representaciones probabilísticas de familias de polipéptidos (perfiles) para buscar en las bases de datos. Por ejemplo, el programa PSI-BLAST genera perfiles a través de un proceso de búsqueda en bases de datos iterativo y es capaz de detectar homólogos remotos (Atschul et al., 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). Se puede conseguir incluso una mayor sensibilidad si la familia o la superfamilia del polipéptido tiene uno o más representantes en las bases de datos de estructuras de proteínas. Programas tales como el GenTHREADER (Jones, 1999, J. Mol. Biol. 287: 797-815; McGuffin y Jones, 2003, Bioinformatics 19: 874-881) utilizan información de una variedad de fuentes (PSI-BLAST, predicción de estructuras secundarias, perfiles de alineamiento estructural y potenciales de solvatación) como entrada a una red neuronal que predice el plegamiento estructural para una secuencia de consulta. De forma similar, el método de Gough et al., 2000, J. Mol. Biol. 313: 903-919, se puede usar para alinear una secuencia de estructura desconocida con los modelos de superfamilias presentes en la base de datos SCOP. Estos alineamientos se pueden usar a su vez para generar modelos de homología para el polipéptido, y se puede evaluar la precisión de tales modelos usando una variedad de herramientas desarrolladas para ese fin.

[0042] Para proteínas de estructura conocida, están disponibles varias herramientas y recursos para recuperar y generar alineamientos estructurales. Por ejemplo, las superfamilias de proteínas de SCOP se han alineado estructuralmente, y esos alineamientos son accesibles y descargables. Se pueden alinear dos o más estructuras de proteínas usando una variedad de algoritmos como la matriz de alineamiento de distancias (Holm y Sander, 1998, Proteins 33: 88-96) o extensión combinatoria (Shindyalov y Bourne, 1998, Protein Engineering 11: 739-747), y las implementaciones de estos algoritmos se pueden utilizar además para consultar bases de datos de estructuras con una estructura de interés para descubrir posibles homólogos estructurales (por ejemplo, Holm y Park, 2000, Bioinformatics 16: 566-567).

[0043] Al describir las variantes de alfa-amilasa de la presente invención, se adapta la nomenclatura descrita a continuación para facilitar la referencia. Se emplean las abreviaturas de aminoácidos de una sola letra o de tres letras aceptadas por la IUPAC.

[0044] Sustituciones. Para la sustitución de un aminoácido, se usa la nomenclatura siguiente: aminoácido original, posición, aminoácido sustituido. Por consiguiente, la sustitución de treonina por alanina en la posición 226 se designa como "Thr226Ala" o "T226A". Las sustituciones múltiples se separan con signos de suma ("+"), por ejemplo, "Gly205Arg + Ser411Phe" o "G205R + S411F", representan sustituciones en las posiciones 205 y 411 de glicina (G) por arginina (R) y serina (S) por fenilalanina (F), respectivamente.

[0045] Deleciones. Para la delección de un aminoácido, se usa la nomenclatura siguiente: aminoácido original, posición*. Por consiguiente, la delección de glicina en la posición 195 se designa como "Gly195*" o "G195*". Las deleciones múltiples se separan con signos de suma ("+"), por ejemplo, "Gly195* + Ser411*" o "G195* + S411*".

[0046] Inserciones. Para la inserción de un aminoácido, se usa la nomenclatura siguiente: aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado. Por consiguiente, la inserción de lisina después de una glicina en la posición 195 se designa "Gly195GlyLys" o "G195GK". Una inserción de aminoácidos múltiples se designa [aminoácido original, posición, aminoácido original, aminoácido insertado #1, aminoácido insertado #2; etc.]. Por ejemplo, la inserción de lisina y alanina después de glicina en la posición 195 se indica como "Gly195GlyLysAla" o "G195GKA".

[0047] En tales casos, el/los residuo(s) de aminoácido(s) insertado(s) se numera(n) mediante la adición de letras minúsculas al número de posición del residuo del aminoácido precedente al/a los residuo(s) de aminoácido(s) insertado(s). En el ejemplo anterior, la secuencia sería así:

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

[0048] Modificaciones múltiples. Las variantes que comprenden modificaciones múltiples se separan con signos de suma ("+"), por ejemplo, "Arg170Tyr+Gly195Glu" o "R170Y+G195E" representan una sustitución de tirosina y ácido glutámico por arginina y glicina en las posiciones 170 y 195, respectivamente.

- 5 [0049] Diferentes sustituciones. Cuando se pueden introducir diferentes sustituciones en una posición, las diferentes sustituciones se separan con una coma, por ejemplo, "Arg170Tyr,Glu" representa una sustitución de arginina por tirosina o ácido glutámico en la posición 170. Así, "Tyr167Gly,Ala + Arg170Gly,Ala" designa las variantes siguientes: "Tyr167Gly+Arg170Gly", "Tyr167Gly+Arg170Ala", "Tyr167Ala+Arg170Gly" y "Tyr167Ala+Arg170Ala".

Alfa-amilasa parental

- 10 [0050] La alfa-amilasa parental puede ser (a) un polipéptido con al menos un 60% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2; (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos un 60% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1; o (c) un fragmento del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, que tiene actividad de alfa-amilasa.

- 15 [0051] En una forma de realización, el progenitor tiene una identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 de al menos un 60%, por ejemplo, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o el 100%, que tiene actividad de alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos del progenitor difiere en no más de diez aminoácidos, por ejemplo, en cinco aminoácidos, en cuatro aminoácidos, en tres aminoácidos, en dos aminoácidos y/o en un aminoácido del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. El progenitor comprende o consiste preferiblemente en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, el progenitor comprende o consiste en los aminoácidos 34 a 471 de la SEQ ID NO: 2. Los aminoácidos 34 a 471 de la SEQ ID NO: 2 también se describen en la presente como la SEQ ID NO: 3.

[0052] En otra forma de realización, el progenitor es una variante alélica del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

- 25 [0053] En otra forma de realización, el progenitor está codificado por un polinucleótido con una identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 de al menos un 60%, por ejemplo, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o el 100%, que codifica un polipéptido con actividad de alfa-amilasa. En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro consiste en los nucleótidos 100 a 1413 de la SEQ ID NO: 1. En una forma de realización, el progenitor está codificado por un polinucleótido que comprende o consiste en los nucleótidos 100 a 1413 de la SEQ ID NO: 1.

[0054] El progenitor se puede obtener de microorganismos de cualquier género. Para fines de la presente invención, el término "obtener/se obtiene(n)/obtenido/a/os/as de" como se utiliza en la presente en relación con una fuente dada significará que el progenitor codificado por un polinucleótido está producido por la fuente o por una célula donde se ha insertado el polinucleótido de la fuente. En un aspecto, el progenitor se secreta extracelularmente.

- 35 [0055] El progenitor puede ser una alfa-amilasa fúngica. Por ejemplo, el progenitor puede ser una alfa-amilasa fúngica filamentosa tal como una alfa-amilasa de *Rhizomucor*.

[0056] En otro aspecto, el progenitor es una alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus*, por ejemplo, la alfa-amilasa de la SEQ ID NO: 2 o el polipéptido maduro de la misma. En otra forma de realización, el progenitor es la secuencia codificante del polipéptido maduro de la alfa-amilasa depositada en DSM 15334.

- 40 [0057] Se entenderá que, para las especies anteriormente mencionadas, la invención abarca tanto los estados perfectos como los imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de

la especie por el que se conocen. Las personas expertas en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes apropiados.

5 [0058] Las cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en una serie de colecciones de cultivos, como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

10 [0059] El progenitor se puede identificar y obtener de otras fuentes, incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.), usando las sondas anteriormente mencionadas. Las técnicas para aislar microorganismos y ADN directamente de hábitats naturales se conocen en la técnica. El polinucleótido que codifica un progenitor puede derivarse entonces cribando de forma similar una biblioteca de ADNc o genómica de otro microorganismo o muestra de ADN mezclado. Una vez se ha detectado con una sonda(s) un polinucleótido que codifica un progenitor, el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que conocen aquellas personas expertas en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).

[0060] El progenitor puede ser un polipéptido híbrido donde una parte de un polipéptido se fusiona en el extremo N-terminal y/o el extremo C-terminal de una parte de otro(s) polipéptido(s).

20 [0061] El progenitor también puede ser un polipéptido fusionado o polipéptido de fusión escindible donde un polipéptido se fusiona en el extremo N-terminal y/o el extremo C-terminal de otro(s) polipéptido(s). Un polipéptido fusionado se puede producir fusionando un polinucleótido que codifica un polipéptido con un polinucleótido que codifica otro polipéptido. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estén en marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo control del/de los mismo(s) promotor(es) y terminador. También se pueden construir polipéptidos de fusión usando la tecnología de inteina donde se crean fusiones postraduccionales (Cooper et al., 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, Science 266: 776-779).

30 [0062] Un polipéptido de fusión puede comprender adicionalmente un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Tras la secreción de la proteína de fusión, el sitio se escinde liberando los dos polipéptidos. Los ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios divulgados en Martin et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina et al., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.

35 [0063] En una forma de realización más particular, el polipéptido híbrido de la invención es una variante de alfa-amilasa de la invención conectada a un módulo de unión a carbohidratos (CBM) a través de un conector. Tales híbridos, que comprenden un polipéptido que tiene actividad de alfa-amilasa y un módulo de unión a carbohidratos, principalmente con afinidad por el almidón, tienen la ventaja sobre las alfa-amilasas existentes de que seleccionando un dominio catalítico con las propiedades deseadas, por ejemplo, el perfil de pH, el perfil de temperatura, la resistencia a la oxidación, la estabilidad de calcio, la afinidad de sustrato o el perfil de producto, se puede combinar con un módulo de unión a carbohidratos con afinidades de unión más fuertes o más débiles, por ejemplo, afinidades específicas por la amilosa, afinidades específicas por la amilopectina o afinidades por una estructura específica del carbohidrato.

Secuencia conectora

45 [0064] La secuencia conectora puede ser cualquier secuencia conectora adecuada, por ejemplo, una secuencia conectora derivada de una alfa-amilasa o una glucoamilasa (GA) (referida también como una amiloglucosidasa (AMG)). El conector puede ser un enlace o un grupo conector corto que comprende de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 átomos de carbono, en particular de 2 a 40 átomos de carbono. Sin embargo, el conector es preferiblemente una secuencia de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos, más preferiblemente de 4 a 40 residuos de aminoácidos, tal como de 6 a 15 residuos de aminoácidos.

[0065] Preferiblemente un polipéptido híbrido comprende una secuencia conectora derivada de cualquier especie seleccionada del grupo que consiste en *Acremonium*, *Aspergillus*, *Athelia*, *Coniochaeta*, *Leucopaxillus*, *Meripilus*,

Pachykytospora, *Penicillium*, *Sublispota*, *Trametes*, *Trichophaea* y *Valsaria*. El conector también puede derivar de una bacteria, por ejemplo, de una cepa de *Bacillus* sp. Más preferiblemente, el conector deriva de una especie seleccionada del grupo que consiste en *Acremonium* sp., *Coniochaeta* sp., *Meripilus giganteus*, *Penicillium* sp., *Sublispota provurvata*, *Trametes corrugata*, *Trichophaea saccata*, *Valsaria rubricosa*, *Valsario spartii*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus niger*, *Athelia rolfsii*, *Leucopaxillus gigantus*, *Pachykytospora papayracea*, *Trametes cingulata* y *Bacillus flavothermus*.

[0066] Aún más preferiblemente, el conector es un conector de una glucoamilasa seleccionada del grupo que consiste en *Pachykytospora papayracea* (por ejemplo, la SEQ ID NO: 8), *Trametes cingulata* (por ejemplo, la SEQ ID NO: 9), *Leucopaxillus gigantus* (por ejemplo, la SEQ ID NO: 10), *Athelia rolfsii* (por ejemplo, la SEQ ID NO: 19), *Aspergillus kawachii* (por ejemplo, la SEQ ID NO: 20), *Aspergillus niger* (por ejemplo, la SEQ ID NO: 21) o un conector de una alfa-amilasa seleccionada del grupo que consiste en *Sublispota provurvata* (por ejemplo, la SEQ ID NO: 12), *Valsaria rubricosa* (por ejemplo, la SEQ ID NO: 13), *Acremonium* sp. (por ejemplo, la SEQ ID NO: 14), *Meripilus giganteus* (por ejemplo, la SEQ ID NO: 15), *Bacillus flavothermus* (por ejemplo, la SEQ ID NO: 16), la SEQ ID NO: 17 o la SEQ ID NO: 18), *Coniochaeta* sp. AM603 (por ejemplo, la SEQ ID NO: 22), *Coniochaeta* sp. (por ejemplo, la SEQ ID NO: 23), *Trametes corrugata* (por ejemplo, la SEQ ID NO: 24), *Valsario spartii* (por ejemplo, la SEQ ID NO: 25), *Penicillium* sp. (por ejemplo, la SEQ ID NO: 26), *Trichophaea saccata* (por ejemplo, la SEQ ID NO: 11).

[0067] Preferida también para la divulgación es cualquier secuencia de aminoácidos conectora con al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o incluso al menos un 95% de identidad con cualquier secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 25 y la SEQ ID NO: 26.

[0068] En otra forma de realización preferida de la divulgación, el polipéptido híbrido tiene una secuencia conectora que difiere de unas secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 8, la SEQ ID NO: 9, la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11, la SEQ ID NO: 12, la SEQ ID NO: 13, la SEQ ID NO: 14, la SEQ ID NO: 15, la SEQ ID NO: 16, la SEQ ID NO: 17, la SEQ ID NO: 18, la SEQ ID NO: 19, la SEQ ID NO: 20, la SEQ ID NO: 21, la SEQ ID NO: 22, la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 24, la SEQ ID NO: 25 y la SEQ ID NO: 26 en no más de 10 posiciones, no más de 9 posiciones, no más de 8 posiciones, no más de 7 posiciones, no más de 6 posiciones, no más de 5 posiciones, no más de 4 posiciones, no más de 3 posiciones, no más de 2 posiciones o incluso no más de 1 posición.

[0069] Para más detalles sobre el ADN que codifica estos conectores véase WO 06/069290.

30 Módulos de unión a carbohidratos

[0070] Un módulo de unión a carbohidratos (CBM), o como se denomina a menudo, un dominio de unión a carbohidratos (CBD), es una secuencia polipeptídica de aminoácidos que se une preferentemente a un poli- u oligosacárido (carbohidrato), frecuentemente –pero no necesariamente de manera exclusiva– a una forma insoluble en agua (incluyendo una cristalina) del mismo.

[0071] Los CBM derivados de enzimas degradadoras de almidón se denominan a menudo módulos de unión al almidón (SBM) o dominios de unión al almidón (SBD). Los CBM pueden ocurrir en determinadas enzimas amilolíticas, tales como determinadas glucoamilasas (GA), o en enzimas tales como las ciclodextrina glucanotransferasas o en alfa-amilasas. Asimismo, otras subclases de CBM abarcarían, por ejemplo, módulos de unión a la celulosa (CBM de enzimas celulolíticas), módulos de unión a la quitina (CBM que ocurren típicamente en quitinasas), módulos de unión al xilano (CBM que ocurren típicamente en xilanasas), módulos de unión al manano (CBM que ocurren típicamente en mananasas). Los SBM se denominan a menudo SBD (dominios de unión al almidón).

[0072] Los CBM se encuentran como partes integrales de grandes polipéptidos o proteínas consistentes en dos o más regiones de secuencias polipeptídicas de aminoácidos, especialmente en enzimas hidrolíticas (hidrolasas) que comprenden típicamente un módulo catalítico que contiene el sitio activo para la hidrólisis del sustrato y un módulo de unión a carbohidratos (CBM) para unirse al sustrato de carbohidratos en cuestión. Tales enzimas pueden comprender más de un módulo catalítico y uno, dos o tres CBM y, opcionalmente, comprender además una o más regiones de secuencias polipeptídicas de aminoácidos que conectan el/los CBM con el/los módulo(s) catalítico(s), donde una región del último tipo se denomina normalmente "conector". Los ejemplos de enzimas hidrolíticas que comprenden un CBM –alguno de los cuales ya se ha mencionado anteriormente– son celulasas, xilanasas, mananasas, arabinofuranosidasas,

acetilsterasas y quitinasas. Los CBM también se han encontrado en algas, por ejemplo, en el alga roja *Porphyra purpurea* en forma de una proteína de unión a polisacáridos no hidrolítica.

[0073] En proteínas/polipéptidos donde se dan CBM (por ejemplo, enzimas, típicamente enzimas hidrolíticas), un CBM puede estar situado en el extremo N o C terminal o en una posición interna.

- 5 [0074] Esa parte de un polipéptido o una proteína (por ejemplo, una enzima hidrolítica) que constituye un CBM *per se* consiste típicamente en más de aproximadamente 30 y menos de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos.

[0075] El "módulo de unión a carbohidratos de la familia 20" o un módulo CBM-20 se define en el contexto de esta invención como una secuencia de aproximadamente 100 aminoácidos con al menos un 45% de identidad con el módulo de unión a carbohidratos (CBM) del polipéptido divulgado en la figura 1 de Joergensen et al., 1997, *Biotechnol. Lett.* 19: 1027-1031. El CBM comprende los últimos 102 aminoácidos del polipéptido, es decir, la subsecuencia del aminoácido 582 al aminoácido 683. La numeración de las familias de las glicosido hidrolasas sigue el concepto de Coutinho, P.M. y Henrissat, B. (1999) CAZy - Carbohydrate-Active Enzymes server at URL: afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html o alternativamente Coutinho y Henrissat, 1999, The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach, en "Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation", K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita y T. Kimura eds., Uni Publishers Co., Tokio, págs. 15-23 y Bourne y Henrissat, 2001, Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules, *Current Opinion in Structural Biology* 11: 593-600.

[0076] Ejemplos de enzimas que comprenden un CBM adecuado para usar en el contexto de la invención son las alfa-amilasas, las alfa-amilasas maltogénicas, las celulasas, las xilanasas, las mananasas, las arabinofuranosidasas, las acetilsterasas y las quitinasas. CBM adicionales de interés en relación a la presente invención incluyen los CBM que derivan de glucoamilasas (EC 3.2.1.3) o de CGTasas (EC 2.4.1.19).

[0077] Los CBM que derivan de fuentes fúngicas, bacterianas o vegetales serán generalmente adecuados para usar en el híbrido de la invención. Se prefieren los CBM de origen fúngico. A este respecto, las técnicas adecuadas para aislar los genes pertinentes se conocen bien en la técnica.

25 [0078] Se prefieren híbridos que comprenden un CBM de las familias 20, 21 o 25 de módulos de unión a carbohidratos. Los CBM de la familia 20 de módulos de unión a carbohidratos adecuados para la invención que pueden derivar de glucoamilasas de *Aspergillus awamori* (SWISSPROT Q12537), *Aspergillus kawachii* (SWISSPROT P23176), *Aspergillus niger* (SWISSPROT P04064), *Aspergillus oryzae* (SWISSPROT P36914), de alfa-amilasas de *Aspergillus kawachii* (EMBL:#AB008370), *Aspergillus nidulans* (NCBI AAF17100.1), de beta-amilasas de *Bacillus cereus* (SWISSPROT P36924) o de CGTasas de *Bacillus circulans* (SWISSPROT P43379).

[0079] Preferiblemente, el híbrido comprende un CBM que deriva de cualquier familia o especie seleccionada del grupo que consiste en *Acremonium*, *Aspergillus*, *Athelia*, *Coniochaeta*, *Cryptosporiopsis*, *Dichotomocladium*, *Dinemasporium*, *Diplodia*, *Gliocladium*, *Leucopaxillus*, *Malbranchea*, *Meripilus*, *Nectria*, *Pachykytospora*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rhizomucor pusillus*, *Streptomyces*, *Subulispora*, *Thermomyces*, *Trametes*, *Trichophaea saccata* y *Valsaria*. El CBM también puede derivar de una planta, por ejemplo, de maíz (por ejemplo, *Zea mays*) o una bacteria, por ejemplo, *Bacillus*. Más preferiblemente, el híbrido comprende un CBM derivado de cualquier especie seleccionada del grupo que consiste en *Acremonium* sp., *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Athelia rolfsii*, *Bacillus flavothermus*, *Coniochaeta* sp., *Cryptosporiopsis* sp., *Dichotomocladium hesseltinei*, *Dinemasporium* sp., *Diplodia* sp., *Gliocladium* sp., *Leucopaxillus gigantus*, *Malbranchea* sp., *Meripilus giganteus*, *Nectria* sp., *Pachykytospora papayracea*, *Penicillium* sp., *Rhizomucor pusillus*, *Streptomyces thermocyaneoviolaceus*, *Streptomyces limosus*, *Subulispora provurvata*, *Thermomyces lanuginosus*, *Trametes cingulata*, *Trametes corrugata*, *Trichophaea saccata*, *Valsaria rubricosa*, *Valsaria spartii* y *Zea mays*.

[0080] Más preferiblemente, el híbrido comprende un CBM de una glucoamilasa seleccionada del grupo que consiste en *Pachykytospora papayracea* (SEQ ID NO: 28), *Trametes cingulata* (SEQ ID NO: 29), *Leucopaxillus gigantus* (SEQ ID NO: 30), *Athelia rolfsii* (SEQ ID NO: 36), *Aspergillus kawachii* (SEQ ID NO: 37), *Aspergillus niger* (SEQ ID NO: 38) o de una alfa-amilasa seleccionada del grupo consistente en *Trichophaea saccata* (SEQ ID NO: 27), *Subulispora provurvata* (SEQ ID NO: 31), *Valsaria rubricosa* (SEQ ID NO: 32), *Acremonium* sp. (SEQ ID NO: 33), *Meripilus giganteus* (SEQ ID NO: 34), *Bacillus flavothermus* (SEQ ID NO: 35), *Coniochaeta* sp. (SEQ ID NO: 39), *Zea mays* (SEQ ID NO: 40), *Coniochaeta* sp. (SEQ ID NO: 41), *Trametes corrugata* (SEQ ID NO: 42), *Valsaria spartii* (SEQ ID NO: 43) y *Penicillium* sp. (SEQ ID NO: 44).

5 [0081] En otra forma de realización preferida, la enzima híbrida tiene una secuencia de CBM que difiere de unas secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo consistente en la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38, la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 40, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 44 en no más de 10 posiciones, no más de 9 posiciones, no más de 8 posiciones, no más de 7 posiciones, no más de 6 posiciones, no más de 5 posiciones, no más de 4 posiciones, no más de 3 posiciones, no más de 2 posiciones o incluso no más de 1 posición.

10 [0082] También se prefieren los CBM que tienen al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o incluso al menos un 95% de identidad con cualquier secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38, la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 40, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 44.

15 [0083] En una forma de realización particularmente preferida, la variante de alfa-amilasa de la invención se fusiona con el conector (SEQ ID NO: 19) y el CBM (SEQ ID NO: 36) de la AMG (glucoamilasa) de *Athelia rolfsii*. Esta construcción se muestra en la SEQ ID NO: 5 excepto que el centro catalítico incluido en la SEQ ID NO: 5 no tiene ninguna de las sustituciones conforme a la invención y es por tanto idéntica a la alfa-amilasa parental mostrada como la SEQ ID NO: 2. El ADN que codifica la SEQ ID NO: 5 se divulga en la presente como la SEQ ID NO: 4. Más particularmente, la variante de alfa-amilasa de la invención se fusiona con un conector y un CBM con al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o incluso al menos un 95% de identidad con el conector y el CBM comprendidos en la SEQ ID NO: 5.

20

25 [0084] En otra forma de realización particularmente preferida, la variante de alfa-amilasa de la invención se fusiona con el conector (SEQ ID NO: 21) y el CBM (SEQ ID NO: 38) de la AMG de *Aspergillus niger*. Esta construcción se muestra en la SEQ ID NO: 7 excepto que el centro catalítico incluido en la SEQ ID NO: 7 no tiene ninguna de las sustituciones conforme a la invención y es por tanto idéntica a la alfa-amilasa parental mostrada como la SEQ ID NO: 2. La secuencia de ADN que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO: 7 se divulga en la presente como la SEQ ID NO: 6. Más particularmente, la variante de alfa-amilasa de la invención se fusiona con un conector y un CBM con al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90% o incluso al menos un 95% identidad con el conector y el CBM comprendidos en la SEQ ID NO: 7.

30 [0085] Para más detalles acerca del ADN que codifica los CBM véase WO 06/069290.

Preparación de las variantes

[0086] La mutagénesis dirigida al sitio es una técnica donde se crean una o más (varias) mutaciones en uno o más sitios definidos en un polinucleótido que codifica el progenitor.

35 [0087] La mutagénesis dirigida al sitio se puede realizar *in vitro* por PCR, lo que implica el uso de cebadores oligonucleotídicos con la mutación deseada. La mutagénesis dirigida al sitio puede realizarse también *in vitro* por mutagénesis de "casete", lo que implica la escisión por una enzima de restricción en un sitio en el plásmido que comprende un polinucleótido codificante del progenitor y el ligamiento posterior de un oligonucleótido que contiene la mutación del polinucleótido. Normalmente, la enzima de restricción que digiere el plásmido y el oligonucleótido es la misma, lo que permite que los extremos pegajosos del plásmido y el inserto se liguen uno con el otro. Véase, por ejemplo, Scherer y Davis, 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 4949-4955; y Barton et al., 1990, Nucleic Acids Res. 18: 7349-4966.

40

[0088] La mutagénesis dirigida al sitio también se puede realizar *in vivo* por métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2004/0171154; Storici et al., 2001, Nature Biotechnol. 19: 773-776; Kren et al., 1998, Nat. Med. 4: 285-290; y Calissano y Macino, 1996, Fungal Genet. Newslett. 43: 15-16.

45 [0089] En la presente invención se puede usar cualquier procedimiento de mutagénesis dirigida al sitio. Hay muchos kits comerciales disponibles que se pueden usar para preparar variantes.

[0090] La construcción génica sintética implica la síntesis *in vitro* de una molécula de polinucleótido diseñada para codificar un polipéptido de interés. La síntesis génica se puede realizar utilizando una serie de técnicas, como la tecnología multiplex a base de microchips descrita por Tian et al. (2004, Nature 432: 1050-1054) y tecnologías similares donde se sintetizan y se ensamblan oligonucleótidos sobre chips microfluídicos fotoprogramables.

5 [0091] Se pueden hacer y evaluar sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos únicas o múltiples usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o transposición, seguido de un procedimiento de cribado pertinente, tal como los divulgados por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen la PCR propensa a error, la presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832-10837; patente de EE.UU. n.º 5,223,409; WO 92/06204) y la mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire et al., 1986, Gene 46: 145; Ner et al., 1988, DNA 7: 127).

15 [0092] Se pueden combinar métodos de mutagénesis/transposición con métodos de cribado automatizados de alto rendimiento para detectar la actividad de polipéptidos mutagenizados clonados expresados por las 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 estándares en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de los residuos de aminoácidos individuales de un polipéptido.

20 [0093] La construcción génica semisintética se puede realizar combinando aspectos de la construcción génica sintética, y/o la mutagénesis dirigida al sitio, y/o la mutagénesis aleatoria, y/o la transposición. Se puede caracterizar una construcción semisintética por un proceso que utilice fragmentos de polinucleótidos que se sintetizan, en combinación con técnicas de PCR. Las regiones definidas de los genes se pueden sintetizar así *de novo*, mientras que otras regiones se pueden amplificar usando cebadores mutagénicos específicos de sitio, mientras que otras regiones se pueden someter a una amplificación por PCR propensa a error o PCR no propensa a error. Las subsecuencias de los polinucleótidos pueden entonces transponerse.

25 **Variantes**

[0094] La presente descripción proporciona variantes de alfa-amilasa que comprenden una modificación en una o más (varias) posiciones correspondientes a las posiciones 20, 76, 123, 128, 136, 141, 142, 143, 165, 192, 219, 224, 265, 383 y 410 del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2, donde la variante tiene actividad de alfa-amilasa. Particularmente, la modificación es una sustitución.

30 [0095] En un aspecto, la variante tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, tal como al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% y/o al menos un 99%, pero menos del 100%, de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En un aspecto, el número de sustituciones en las variantes de la presente invención es 1-20, por ejemplo, 1-10 y 1-5, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 sustituciones.

35 [0096] En otro aspecto, la variante es codificada por un polinucleótido con una identidad de secuencia de al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99%, pero menos del 100%, con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1.

40 [0097] En otro aspecto, la variante está codificada por un polinucleótido que hibrida bajo condiciones de astringencia muy baja, condiciones de astringencia baja, condiciones de astringencia media, condiciones de astringencia media-alta, condiciones de astringencia alta o condiciones de astringencia muy alta con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1 o (ii) la cadena complementaria en toda su longitud de (i) (Sambrook, Fritsch y Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).

45 [0098] El polinucleótido de la SEQ ID NO: 1 o una subsecuencia del mismo, así como la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento de la misma, se puede usar para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar ADN codificante de un progenitor de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para la hibridación con el ADNc o genómico del género o la especie de interés, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente en el mismo. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deben ser de al menos 14, por ejemplo, al menos 25, al menos 35 o al menos 70 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, la sonda de ácido nucleico es de al menos 100 nucleótidos de longitud, por ejemplo, al menos 200

nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos o al menos 900 nucleótidos de longitud. Se pueden usar tanto sondas de ADN como de ARN. Las sondas se marcan típicamente para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con ^{32}P , ^3H , ^{35}S , biotina o avidina). Tales sondas están abarcadas por la presente invención.

5 [0099] Se puede cribar una biblioteca de ADN genómico o ADNc preparada a partir de tales otros organismos para buscar ADN que hibride con las sondas anteriormente descritas y codifique un progenitor. Se puede separar ADN genómico o de otro tipo de tales otros organismos por electroforesis en gel de poliacrilamida o de agarosa o por otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado se puede transferir a e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que sea homólogo a la SEQ ID NO: 1 o una subsecuencia de la misma, se usa el material portador en una transferencia de Southern.

[0100] Para fines de la presente invención, la hibridación indica que el polinucleótido hibrida con una sonda de nucleótidos marcada correspondiente al polinucleótido mostrado en la SEQ ID NO: 1, su cadena complementaria o una subsecuencia del mismo, bajo condiciones de astringencia baja a muy alta. Se pueden detectar moléculas con las que hibrida la sonda usando, por ejemplo, película radiográfica o cualquier otro medio de detección conocido en la técnica.

15 [0101] En un aspecto, la sonda de ácido nucleico es la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, la sonda de ácido nucleico consiste en los nucleótidos 100 a 1413 de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es un polinucleótido que codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 o un fragmento del mismo. En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es la SEQ ID NO: 1.

20 [0102] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia muy baja a muy alta se definen como la prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3%, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado y formamida al 25% para astringencias muy bajas y bajas, formamida al 35% para astringencias medias y medias-altas o formamida al 50% para astringencias altas y muy altas, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas de manera óptima. El material portador se lava finalmente tres veces, cada una durante 15 minutos usando SSC 2X, SDS al 0,2% a 45°C (astringencia muy baja), 50°C (astringencia baja), 55°C (astringencia media), 60°C (astringencia media-alta), 65°C (astringencia alta) o 70°C (astringencia muy alta).

30 [0103] Para sondas cortas que tienen aproximadamente de 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia se definen como la prehibridación e hibridación a de aproximadamente 5°C a aproximadamente 10°C por debajo de la T_m calculada usando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 1390) en 0,9 M de NaCl, 0,09 M de Tris-HCl pH 7,6, 6 mM de EDTA, NP-40 al 0,5%, solución de Denhardt 1X, 1 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de fosfato monobásico de sodio, 0,1 mM de ATP y 0,2 mg de ARN de levadura por ml siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas de manera óptima. El material portador se lava finalmente una vez en SSC 6X más SDS al 0,1% durante 15 minutos y dos veces cada una durante 15 minutos usando SSC 6X a de 5°C a 10°C por debajo de la T_m calculada.

35 [0104] En otro aspecto, la variante es un fragmento del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2 que tiene una sustitución en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 128, 143, 141, 192, 20, 76, 123, 136, 142, 165, 219, 224, 265, 383 y 410, que tiene actividad de alfa-amilasa que contiene, por ejemplo, al menos 435 residuos de aminoácidos, por ejemplo, al menos 433 o, por ejemplo, al menos 431 residuos de aminoácidos.

40 [0105] En un aspecto, una variante comprende una sustitución en una o más (varias) posiciones correspondientes a las posiciones seleccionadas de 20, 76, 123, 128, 136, 141, 142, 143, 165, 192, 219, 224, 265, 383 y 410. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en dos posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones seleccionadas de 20, 76, 123, 128, 136, 141, 142, 143, 165, 192, 219, 224, 265, 383 y 410. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en tres posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones seleccionadas de 20, 76, 123, 128, 136, 141, 142, 143, 165, 192, 219, 224, 265, 383 y 410. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en cuatro posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones seleccionadas de 20, 76, 123, 128, 136, 141, 142, 143, 165, 192, 219, 224, 265, 383 y 410. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en cinco posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones seleccionadas de 20, 76, 123, 128, 136, 141, 142, 143, 165, 192, 219, 224, 265, 383 y 410. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en seis posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones seleccionadas de 20, 76, 123, 128, 136, 141, 142, 143, 165, 192, 219, 224, 265, 383 y 410. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en siete posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones seleccionadas de 20, 76, 123, 128, 136, 141, 142, 143, 165, 192, 219, 224, 265, 383 y 410.

5 En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en ocho posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones seleccionadas de 20, 76, 123, 128, 136, 141, 142, 143, 165, 192, 219, 224, 265, 383 y 410. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en nueve posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones seleccionadas de 20, 76, 123, 128, 136, 141, 142, 143, 165, 192, 219, 224, 265, 383 y 410. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en diez posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones seleccionadas de 20, 76, 123, 128, 136, 141, 142, 143, 165, 192, 219, 224, 265, 383 y 410. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en once posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones seleccionadas de 20, 76, 123, 128, 136, 141, 142, 143, 165, 192, 219, 224, 265, 383 y 410. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en doce posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones seleccionadas de 20, 76, 123, 128, 136, 141, 142, 143, 165, 192, 219, 224, 265, 383 y 410. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en trece posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones seleccionadas de 20, 76, 123, 128, 136, 141, 142, 143, 165, 192, 219, 224, 265, 383 y 410. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en catorce posiciones correspondientes a cualquiera de las posiciones seleccionadas de 20, 76, 123, 128, 136, 141, 142, 143, 165, 192, 219, 224, 265, 383 y 410. En otro aspecto, una variante comprende una sustitución en cada posición correspondientes a las posiciones seleccionadas de 20, 76, 123, 128, 136, 141, 142, 143, 165, 192, 219, 224, 265, 383 y 410.

[0106] En un aspecto particular, la variante comprende sustituciones en las posiciones 128 y 143. En otro aspecto particular, la variante comprende sustituciones en las posiciones 128 y 141. En otro aspecto particular, la variante comprende sustituciones en las posiciones 141 y 143.

20 [0107] En un aspecto particular, la variante comprende sustituciones en las posiciones 128, 141 y 143. En otro aspecto particular, la variante comprende sustituciones en las posiciones 128, 141 y 192. En otro aspecto particular, la variante comprende sustituciones en las posiciones 128, 143 y 192. En otro aspecto particular, la variante comprende sustituciones en las posiciones 141, 143 y 192.

[0108] En otro aspecto particular, la variante comprende sustituciones en las posiciones 128, 141, 143 y 192.

25 [0109] En un aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 20. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 20 se sustituye por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente por Ser.

[0110] En un aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 76. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 76 se sustituye por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente por Gly.

30 [0111] En un aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 123. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 123 se sustituye por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente por His.

35 [0112] En un aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 128. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 128 se sustituye por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente por Asp.

[0113] En un aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 136. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 136 se sustituye por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente por Phe.

40 [0114] En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 141. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 141 se sustituye por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente por Trp.

[0115] En un aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 141. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 141 se sustituye por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente por Arg.

- [0116] En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 142. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 142 se sustituye por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente por Asp.
- 5 [0117] En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 143. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 143 se sustituye por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente por Asn.
- [0118] En un aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 165. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 165 se sustituye por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente por Met.
- 10 [0119] En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 192. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 192 se sustituye por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente por Arg.
- [0120] En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 219. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 219 se sustituye por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente por Cys.
- 15 [0121] En un aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 224. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 224 se sustituye por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente por Ala.
- [0122] En un aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 224. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 224 se sustituye por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente por Arg.
- 20 [0123] En un aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 265. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 265 se sustituye por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente por Cys.
- [0124] En un aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 383. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 383 se sustituye por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente por Arg.
- 25 [0125] En otro aspecto, la variante comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 410. En otro aspecto, el aminoácido en una posición correspondiente a la posición 410 se sustituye por Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr o Val, preferiblemente por Ala.
- 30 [0126] En otro aspecto, la variante comprende la sustitución G20S del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución A76G del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución S123H del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución G128D del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución K136F del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución Y141W del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución Y141R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución N142D del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución D143N del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución D165M del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución K192R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución P219C del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución P224A del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución P224R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución A265C del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución N383R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2. En otro aspecto, la variante comprende la sustitución V410A del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- 35
40
45

ES 2 729 385 T3

- [0127] En otro aspecto, la variante comprende la sustitución Y141W del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- [0128] En otro aspecto, la variante comprende la sustitución Y141R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- [0129] En otro aspecto, la variante comprende la sustitución K136F del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- [0130] En otro aspecto, la variante comprende la sustitución K192R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- 5 [0131] En otro aspecto, la variante comprende la sustitución P224A del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- [0132] En otro aspecto, la variante comprende la sustitución P224R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- [0133] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones S123H + Y141W del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- 10 [0134] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones G20S + Y141W del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- [0135] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones A76G + Y141W del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- [0136] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones G128D + Y141W del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- 15 [0137] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones G128D + D143N del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- [0138] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones Y141W + D143N del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- 20 [0139] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones Y141W + K192R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- [0140] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones Y141W + P219C del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- [0141] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones Y141W + N383R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- 25 [0142] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones N142D + D143N del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- [0143] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones G128D + Y141W + D143N del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- 30 [0144] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones Y141W + N142D + D143N del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- [0145] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones Y141W + D143N + K192R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- [0146] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones Y141W + D143N + P219C del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.

- [0147] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones Y141W + K192R + V410A del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- [0148] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones Y141W + P219C + A265C del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- 5 [0149] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones G128D + D143N + K192R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- [0150] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones G128D + Y141W + D143N + K192R del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- 10 [0151] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones G128D + D143N + K192R + P219C + Y141W del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- [0152] En otro aspecto, la variante comprende las sustituciones Y141W + D143N + K192R + P219C del polipéptido maduro de la SEQ ID NO: 2.
- [0153] Las variantes pueden comprender además una o más modificaciones adicionales en una o más (por ejemplo, varias) posiciones distintas.
- 15 [0154] Los cambios de aminoácidos pueden ser de una naturaleza menor, es decir, sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente el plegamiento y/o la actividad de la proteína; deleciones pequeñas, típicamente de 1-30 aminoácidos; extensiones amino- o carboxiterminales pequeñas, tales como un residuo de metionina aminoterminal; un péptido conector pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.
- 20 [0155] Ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro de 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 no modifican generalmente la actividad específica se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en, *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Son sustituciones comunes 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.
- 25 [0156] Se pueden identificar aminoácidos esenciales en un progenitor según procedimientos conocidos en la técnica, tales como la mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis por barrido de alanina (Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En esta última técnica, se introducen mutaciones únicas de alanina en cada residuo de la molécula y se evalúa la actividad de alfa-amilasa de las moléculas mutantes resultantes para identificar residuos de aminoácidos que son fundamentales para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708. El sitio activo de la alfa-amilasa u otra interacción biológica puede también determinarse por análisis físico de la estructura, como se determina por técnicas tales como la resonancia magnética nuclear, la cristalografía, la difracción electrónica o el marcaje por fotoafinidad, junto con la mutación de aminoácidos del sitio de contacto putativo. Véase, 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. Las identidades de aminoácidos esenciales también se pueden inferir del análisis de identidades con polipéptidos que están relacionados con el progenitor.
- 30 [0157] En una forma de realización, la variante tiene una estabilidad de pH mejorada en comparación con la enzima parental.
- 35 [0158] En una forma de realización, la variante tiene una estabilidad de almacenamiento mejorada en comparación con la enzima parental.
- 40 [0159] En una forma de realización, la variante tiene una termoestabilidad mejorada en comparación con la enzima parental.
- 45

Polinucleótidos

[0160] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican cualquiera de las variantes de la presente invención.

Construcciones de ácido nucleico

- 5 [0161] La presente invención también se refiere a construcciones de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido condificante de una variante de la presente invención operativamente unido a una o más (varias) secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.
- 10 [0162] Un polinucleótido se puede manipular de diversas maneras para proporcionar la expresión de una variante. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria en función del vector de expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante se conocen en la técnica.
- 15 [0163] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora, que es reconocida por una célula huésped para la expresión del polinucleótido. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcional que median la expresión de la variante. El promotor puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico que muestre actividad transcripcional en la célula huésped, incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y se puede obtener de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares tanto homólogos como heterólogos a la célula huésped.
- 20 [0164] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos del gen de la alfa-amilasa (amyQ) de *Bacillus amyloliquefaciens*, el gen de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*, el gen de la penicilinas (penP) de *Bacillus licheniformis*, el gen de la amilasa maltogénica (amyM) de *Bacillus stearothermophilus*, el gen de la levansucrasa (sacB) de *Bacillus subtilis*, los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, el operón *lac* de *E. coli*, el gen de la agarasa de (*dagA*) *Streptomyces coelicolor* y el gen de la beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 3727-3731), así como el promotor *tac* (DeBoer et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 21-25). Se describen promotores adicionales en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilbert et al., 1980, Scientific American 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, *supra*.
- 25 [0165] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácido nucleico de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son los promotores obtenidos de los genes para la acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, la alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, la glucoamilasa (*glaA*) de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, la proteasa similar a la tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), la amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Daria de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), Quinn de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), la lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, la celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, la celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa de *Trichoderma reesei* IV, la endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, la xilanasas I de *Trichoderma reesei*, la xilanasas II de *Trichoderma reesei*, la beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, así como el promotor NA2-tpi (un promotor modificado que incluye un gen codificante de una alfa-amilasa neutra en aspergilos donde el líder no traducido se ha sustituido por un líder no traducido de un gen codificante de una triosa fosfato isomerasa de aspergilos; ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados que incluyen el gen codificante de la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* donde el líder no traducido se ha sustituido por un líder no traducido del gen codificante de la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.
- 30 [0166] En un huésped de levadura, se obtienen promotores útiles de los genes para la enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, la galactocinasa (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, la alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH1, ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*, la triosa fosfato isomerasa (TPI) de *Saccharomyces cerevisiae*, la metalotioneína (CUP1) de *Saccharomyces cerevisiae* y la 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huéspedes de levadura son descritos por Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423-488.
- 45

- [0167] La secuencia de control también puede ser una secuencia de terminación de la transcripción adecuada, que es reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia de terminación está operativamente unida al extremo 3' del polinucleótido codificante de la variante. Se puede usar cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped.
- 5 [0168] Los terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para la antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, la alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y la proteasa similar a la tripsina de *Fusarium oxysporum*.
- [0169] Los terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen de los genes para la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae* y la gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Se describen otros terminadores útiles para células huésped de levadura en Romanos et al., 1992, *supra*.
- 10 [0170] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está operativamente unida al extremo 5' del polinucleótido codificante de la variante. Se puede usar cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped.
- 15 [0171] Los líderes preferidos para las células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.
- [0172] Los líderes adecuados para células huésped de levadura se obtienen de los genes para la enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, la 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y la alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 20 [0173] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente unida al extremo 3' de la secuencia codificante de la variante y, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Se puede usar cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped.
- 25 [0174] Las secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para la antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y la proteasa similar a la tripsina de *Fusarium oxysporum*.
- [0175] Se describen secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura en Guo y Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15: 5983-5990.
- 30 [0176] La secuencia de control también puede ser una región codificante del péptido señal que codifique un péptido señal unido al extremo N-terminal de una variante y dirija la variante a la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante del polinucleótido puede contener intrínsecamente una región codificante del péptido señal unida naturalmente en el marco de lectura de traducción con el segmento de la región codificante que codifica la variante. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región codificante del péptido señal que es exógena a la secuencia codificante. La región codificante del péptido señal exógena puede requerirse cuando la secuencia codificante no contiene naturalmente una región codificante del péptido señal. Alternativamente, la región codificante del péptido señal exógena puede simplemente reemplazar la región codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción de la variante. Sin embargo, se puede usar cualquier región codificante del péptido señal que dirija la variante expresada a la vía secretora de una célula huésped.
- 35 [0177] Secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para la amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, la subtilisina de *Bacillus licheniformis*, la beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, las proteasas neutras (*nprT*, *nprS*, *nprM*) de *Bacillus stearothermophilus* y la *prsA* de *Bacillus subtilis*. Se describen péptidos señal adicionales en Simonen y Palva, 1993, Microbiological Reviews 57: 109-137.
- 40
- 45

[0178] Secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para la amilasa neutra de *Aspergillus niger*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la celulasa de *Humicola insolens*, la endoglucanasa V de *Humicola insolens*, la lipasa de *Humicola lanuginosa* y la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

5

[0179] Péptidos señal útiles para células huésped de levadura se obtienen de los genes para el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y la invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes del péptido señal útiles son descritas en Romanos et al., 1992, *supra*.

[0180] La secuencia de control también puede ser una región codificante del propéptido que codifica un propéptido posicionada en el extremo N-terminal de una variante. El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o un propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propolipéptido es generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido del propolipéptido. La región codificante del propéptido puede obtenerse de los genes para la proteasa alcalina (*aprE*) de *Bacillus subtilis*, la proteasa neutra (*nprT*) de *Bacillus subtilis*, la lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836), la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*.

10

15

[0181] Cuando están presentes las regiones tanto del péptido señal como del propéptido en el extremo N-terminal de una variante, la región del propéptido está situada junto al extremo N-terminal de la variante y la región del péptido señal está situada junto al extremo N-terminal de la región del propéptido.

[0182] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión de la variante en relación al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que causan que la expresión del gen que se va a activar o apagar en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores de los sistemas procarióticos incluyen los sistemas de operadores *lac*, *tac* y *trp*. En levadura, se puede usar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En los hongos filamentosos, se puede usar el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, el promotor de la TAKA alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* y el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellos que permiten la amplificación de genes. En los sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneínas que se amplifican con metales pesados. En estos casos, el polinucleótido codificante de la variante estaría operativamente unido con la secuencia reguladora.

20

25

30 Vectores de expresión

[0183] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Las diversas secuencias de nucleótidos y de control se pueden juntar para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más (varios) sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido codificante de la variante en tales sitios. Alternativamente, el polinucleótido se puede expresar insertando el polinucleótido o una construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se ubica en el vector de modo que la secuencia codificante esté operativamente unida con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

35

[0184] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o un virus) que se pueda someter convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y que pueda producir la expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que debe introducirse el vector. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado.

40

[0185] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica con el/los cromosoma(s) en el/los que se ha integrado. Además, se puede usar un solo vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que, juntos, contengan el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

45

[0186] El vector contiene preferiblemente uno o más (varios) marcadores seleccionables que permiten una selección fácil de las células transformadas, transfectadas, transducidas o similares. Un marcador seleccionable es un gen el producto del cual proporciona resistencia a biocidas o viral, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos, y similares.

5 [0187] Ejemplos de marcadores bacterianos seleccionables son los genes *dal* de *Bacillus licheniformis* o *Bacillus subtilis*, o marcadores que confieren resistencia a antibióticos tales como resistencia a la ampicilina, el cloranfenicol, la kanamicina o la tetraciclina. Marcadores adecuados para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Los marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *bar* (fosfotricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa) y *trpC* (antranilato sintasa), así como equivalentes de los mismos. Para usar en una célula de *Aspergillus* se prefieren los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygrosopicus*.

10

15 [0188] El vector contiene preferiblemente un elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independientemente del genoma.

[0189] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede basarse en la secuencia del polinucleótido que codifica la variante o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una ubicación precisa(s) en el/los cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos de integración deben contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tales como de 100 a 10.000 pares de bases, de 400 a 10.000 pares de bases y/o de 800 a 10.000 pares de bases, que tengan un alto grado de identidad con la secuencia diana correspondiente para aumentar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos de integración pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga a la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos de integración pueden ser secuencias de nucleótidos no codificantes o codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

20

25

[0190] Para una replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita que el vector se replique de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador de plásmido que medie la replicación autónoma que funcione en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador de plásmido" significa una secuencia de nucleótidos que permite que un plásmido o vector se replique *in vivo*.

30

[0191] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAMβ1 que permiten la replicación en *Bacillus*.

35 [0192] 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.

[0193] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems et al., 1991, Gene 98: 61-67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Res. 15: 9163-9175; WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se puede realizar según los métodos divulgados en WO 00/24883.

40

[0194] Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en la célula huésped para aumentar la producción de una variante. Se puede obtener un aumento en el número de copias del polinucleótido integrando 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 se pueden seleccionar las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y por lo tanto copias adicionales del polinucleótido, cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

45

[0195] Los procedimientos usados para ligar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son bien conocidos por una persona experta en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, *supra*) para obtener variantes sustancialmente puras.

Células huésped

- [0196] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente unido a una o más (varias) secuencias de control que dirigen la producción de una variante de la presente invención. Una construcción o un vector que comprende un polinucleótido se introduce en una célula huésped de modo que la construcción o el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula parental que no es idéntico a la célula parental debido a mutaciones que ocurren durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifica la variante y su fuente.
- [0197] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de una variante, por ejemplo, una procariota o una eucariota.
- [0198] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria grampositiva o gramnegativa. Las bacterias grampositivas incluyen, pero de forma no limitativa, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Streptomyces*. Las bacterias gramnegativas incluyen, pero de forma no limitativa, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Ureaplasma*.
- [0199] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus*, incluyendo, pero de forma no limitativa, células de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*.
- [0200] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus*, incluyendo, pero de forma no limitativa, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus equi* subesp. *zooepidemicus*.
- [0201] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces*, incluyendo, pero de forma no limitativa, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces lividans*.
- [0202] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* puede, por ejemplo, efectuarse por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Mol. Gen. Genet. 168: 111-115), usando células competentes (véase, por ejemplo, Young and Spizizen, 1961, J. Bacteriol. 81: 823-829 o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, J. Mol. Biol. 56: 209-221), por electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751) o por conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* puede, por ejemplo, efectuarse por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (véase, por ejemplo, Dower et al., 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* puede, por ejemplo, efectuarse por transformación de protoplastos y electroporación (véase, por ejemplo, Gong et al., 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), por conjugación (véase, por ejemplo, Mazodier et al., 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585), o por transducción (véase, por ejemplo, Burke et al., 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* puede, por ejemplo, efectuarse por electroporación (véase, por ejemplo, Choi et al., 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397) o por conjugación (véase, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* puede, por ejemplo, efectuarse por competencia natural (véase, por ejemplo, Perry y Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), por transformación de protoplastos (véase, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, Microbios 68: 189-2070, por electroporación (véase, por ejemplo, Buckley et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804) o por conjugación (véase, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436). Sin embargo, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para introducir ADN en una célula huésped.
- [0203] La célula huésped también puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, de insecto, vegetal o fúngica.
- [0204] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Hongos" como se utiliza en la presente incluye los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota, así como Oomycota y todos los hongos mitospóricos

(como los definen Hawkswort et al., en, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido).

5 [0205] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura/s" como se utiliza en la presente incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporogénea y levadura perteneciente a los hongos imperfectos (Blastomycetes). Debido a que la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura se define como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M. y Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series n.º 9, 1980).

10 [0206] La célula huésped de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia* tal como una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis* o *Yarrowia lipolytica*.

15 [0207] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como definen Hawkswort et al., 1995, *supra*). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por elongación de hifas y el catabolismo del carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es por brote de un talo unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo.

20 [0208] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

25 [0209] Por ejemplo, la célula huésped fúngica filamentosa puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis 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 sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

35 [0210] Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implique la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en EP 238023 y Yelton et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474. Se describen métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* en Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156 y WO 96/00787. La levadura puede transformarse usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, volumen 194, págs. 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito et al., 1983, J. Bacteriol. 153: 163; y Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1920.

Métodos de producción

45 [0211] La presente invención también se refiere a métodos de producción de una variante, que comprenden: (a) el cultivo de una célula huésped de la presente invención bajo condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y (b) la recuperación de la variante.

[0212] 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 agitado, o fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, por lote, por lote alimentado o en estado

5 sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizada en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan que el polipéptido sea expresado y/o aislado. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). Si la variante se secreta en el medio nutritivo, la variante se puede recuperar directamente del medio. Si la variante no se secreta, se puede recuperar de lisados celulares.

10 [0213] La variante puede detectarse usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para las variantes. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede usar un ensayo enzimático para determinar la actividad de la variante.

[0214] La variante se puede recuperar por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la variante se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero de forma no limitativa, la recolección, la centrifugación, la filtración, la extracción, el secado por pulverización, la evaporación o la precipitación.

15 [0215] La variante se puede purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero de forma no limitativa, la cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, el cromatoenfoco y de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, el isoelectroenfoco preparativo), la solubilidad diferencial (por ejemplo, la precipitación con sulfato amónico), la SDS-PAGE o la extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener variantes sustancialmente puras.

20 [0216] En un aspecto alternativo, la variante no se recupera, sino que se usa como fuente de la variante una célula huésped de la presente invención que expresa una variante.

Composiciones

25 [0217] La presente descripción también se refiere a composiciones que comprenden una variante de la presente invención. Preferiblemente, las composiciones están enriquecidas en tal variante. El término "enriquecidas" significa que la actividad de alfa-amilasa de la composición se ha aumentado, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de 1,1.

30 [0218] La composición puede comprender una variante como el componente enzimático principal, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender actividades enzimáticas múltiples, tales como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glucosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanas. En una forma de realización particular, la composición comprende una variante de amilasa según la invención y una o más enzimas seleccionadas del grupo consistente en una proteasa, una glucoamilasa.

35 [0219] La(s) enzima(s) adicional(es) pueden producirse, por ejemplo, por un microorganismo perteneciente al género *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*; *Fusarium*, por ejemplo, *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 sulphureum*, *Fusarium toruloseum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*; *Humicola*, por ejemplo, *Humicola insolens* o *Humicola lanuginosa*; o *Trichoderma*, por ejemplo, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

45 [0220] Las composiciones se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de una composición líquida o seca. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de un granulado o un microgranulado. La variante se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

Plantas

- 5 [0221] La presente descripción también se refiere a plantas, por ejemplo, una planta transgénica, parte de una planta o célula vegetal, que comprenden un polinucleótido de la presente invención para expresar y producir la variante en cantidades recuperables. La variante se puede recuperar de la planta o parte de una planta. Alternativamente, la planta o parte de una planta que contiene la variante se puede usar como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, mejorando el valor nutricional, la palatabilidad y las propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.
- 10 [0222] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicotiledón) o monocotiledónea (una monocotiledón). Ejemplos de plantas monocotiledóneas son las hierbas, tales como la poa de los prados (pasto azul, *Poa*), hierbas forrajeras tales como *Festuca*, *Lolium*, hierbas de zonas templadas, tales como *Agrostis*, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz.
- [0223] Ejemplos de plantas dicotiledóneas son el tabaco, las leguminosas, tales como los altramuces, la patata, la remolacha azucarera, el guisante, la judía y la soja, y las plantas crucíferas (familia Brassicaceae), tales como la coliflor, la semilla de colza y el organismo modelo estrechamente relacionado *Arabidopsis thaliana*.
- 15 [0224] Ejemplos de partes de plantas son el tallo, los callos, las hojas, la raíz, los frutos, las semillas y los tubérculos, así como los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo, la epidermis, el mesófilo, el parénquima, los tejidos vasculares, los meristemos. Los compartimentos específicos de las células vegetales, tales como los cloroplastos, los apoplastos, las mitocondrias, las vacuolas, los peroxisomas y el citoplasma también se consideran parte de una planta. Además, cualquier célula vegetal, cualquiera que sea el origen del tejido, se considera parte de una planta. Asimismo, las partes de plantas tales como los tejidos específicos y las células aisladas para facilitar la utilización de la invención se consideran también partes de plantas, por ejemplo, los embriones, los endospermos, la aleurona y los tegumentos.
- 20 [0225] También se incluyen dentro del alcance de la presente invención la progenie de tales plantas, partes de plantas y células vegetales.
- 25 [0226] La planta o la célula vegetal transgénica que expresa una variante se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. Brevemente, la planta o célula vegetal se construye incorporando una o más (varias) construcciones de expresión que codifican una variante en el genoma de la planta huésped o el genoma de los cloroplastos y propagando la planta o célula vegetal modificada resultante en una planta o célula vegetal transgénica.
- 30 [0227] La construcción de expresión es convenientemente una construcción de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica una variante operativamente unido con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión del polinucleótido en la planta o parte de una planta de elección. Además, la construcción de expresión puede comprender un marcador seleccionable útil para identificar células vegetales en las que se ha integrado la construcción de expresión y secuencias de ADN necesarias para la introducción de la construcción en la planta en cuestión (esto último depende del método que vaya a utilizarse para la introducción de ADN).
- 35 [0228] La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y terminadoras y, opcionalmente, secuencias señal o de tránsito, se determina, por ejemplo, en función de cuándo, dónde y cómo se desea que se exprese la variante. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica una variante puede ser constitutiva o inducible, o puede ser específica del desarrollo, la fase o el tejido, y el producto génico se puede dirigir a un tejido o parte de una planta específicos tales como las semillas o las hojas. Se describen secuencias reguladoras, por ejemplo, en Tague et al., 1988, Plant Physiology 86: 506.
- 40 [0229] Para la expresión constitutiva, se puede usar el promotor 35S-CaMV, el de la ubiquitina 1 de maíz y el de la actina 1 del arroz (Franck et al., 1980, Cell 21: 285-294; Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689; Zhang et al., 1991, Plant Cell 3: 1155-1165). Los promotores específicos de un órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata y frutos (Edwards y Coruzzi, 1990, Ann. Rev. Genet. 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos tales como los meristemos (Ito et al., 1994, Plant Mol. Biol. 24: 863-878), un promotor específico de semillas como el promotor de la glutelina, la prolamina, la globulina o la albúmina del arroz (Wu et al., 1998, Plant Cell Physiol. 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* de la legumina B4 y el gen desconocido de la proteína de semilla de *Vicia faba* (Conrad et al., 1998, J. Plant Physiology 152: 708-711), un promotor de una proteína del cuerpo oleoso de semillas (Chen et al., 1998, Plant Cell Physiol. 39: 935-941), el promotor
- 45

- de la proteína de almacenamiento *napA* de *Brassica napus* o cualquier otro promotor específico de semillas conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor *rbcs* de arroz o tomate (Kyojuka et al., 1993, Plant Physiol. 102: 991-1000), el promotor del gen de la adenina metiltransferasa del virus de chlorella (Mitra y Higgins, 1994, Plant Mol. Biol. 26: 85-93), el promotor del gen *aldP* del arroz (Kagaya et al., 1995, Mol. Gen. Genet. 248: 668-674) o un promotor inducible por heridas como el promotor *pin2* de la patata (Xu et al., 1993, Plant Mol. Biol. 22: 573-588). Asimismo, el promotor puede ser inducible por tratamientos abióticos tales como la temperatura, la sequía o las modificaciones de la salinidad o inducido por sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, por ejemplo, el etanol, los estrógenos, las hormonas vegetales como el etileno, el ácido abscísico y el ácido giberélico, y los metales pesados.
- 5
- 10 [0230] También se puede usar un elemento potenciador del promotor para conseguir una mayor expresión de una variante en la planta. Por ejemplo, el elemento potenciador del promotor puede ser un intrón que se coloca entre el promotor y el polinucleótido codificante de una variante. Por ejemplo, Xu et al., 1993, *supra*, revelan el uso del primer intrón del gen de la actina 1 del arroz para aumentar la expresión.
- 15 [0231] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes de la construcción de expresión se pueden elegir de aquellos disponibles en la técnica.
- [0232] La construcción de ácido nucleico se incorpora en el genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo la transformación mediada por *Agrobacterium*, la transformación mediada por virus, la microinyección, el bombardeo de partículas, la transformación biolística y la electroporación (Gasser et al., 1990, Science 244: 1293; Potrykus, 1990, Bio/Technology 8: 535; Shimamoto et al., 1989, Nature 338: 274).
- 20 [0233] Actualmente, la transferencia génica mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método de elección para generar dicotiledóneas transgénicas (para una revisión, véase Hooykas y Schilperoort, 1992, Plant Mol. Biol. 19: 15-38) y también puede usarse para transformar monocotiledóneas, aunque a menudo se usan otros métodos de transformación para estas plantas. Actualmente, el método de elección para generar monocotiledóneas transgénicas es el bombardeo de partículas (partículas microscópicas de oro o de tungsteno recubiertas con el ADN transformante) de callos embriogénicos o embriones en desarrollo (Christou, 1992, Plant J. 2: 275-281; Shimamoto, 1994, Curr. Opin. Biotechnol. 5: 158-162; Vasil et al., 1992, Bio/Technology 10: 667-674). Un método alternativo para la transformación de monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplastos como se describe en Omirulleh et al., 1993, Plant Mol. Biol. 21: 415-428. Métodos de transformación adicionales para usar conforme a la presente descripción incluyen aquellos descritos en las patentes de EE.UU. Nos. 6,395,966 y 7,151,204.
- 25
- 30 [0234] Después de la transformación, los transformantes que han incorporado la construcción de expresión se seleccionan y se regeneran en plantas enteras según métodos bien conocidos en la materia. A menudo, el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes de selección o durante la regeneración o en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, la cotransformación con dos construcciones de ADN-T separadas o la escisión específica de sitio del gen de selección por una recombinasa específica.
- 35 [0235] Además de la transformación directa del genotipo de una planta particular con una construcción preparada según la presente invención, se pueden crear plantas transgénicas cruzando una planta con la construcción con una segunda planta que carece de la construcción. Por ejemplo, una construcción que codifica una variante se puede introducir en una variedad de planta particular por cruce, sin la necesidad de transformar directamente una planta de esa variedad determinada. Por lo tanto, la presente invención abarca no solo una planta regenerada directamente de células que se han transformado conforme a la presente invención, sino también los descendientes de tales plantas. Como se usa en la presente, descendientes puede referirse a la descendencia de cualquier generación de una planta parental preparada conforme a la presente invención. Tal descendiente puede incluir una construcción de ADN preparada conforme a la presente invención o una parte de una construcción de ADN preparada conforme a la presente invención. El cruce resulta en la introducción de un transgén en una línea vegetal por polinización cruzada de una línea inicial con una línea vegetal donadora. Ejemplos no limitativos de tales pasos se articulan además en la patente de EE.UU. n.º 7,151,204.
- 40
- 45 [0236] Las plantas se pueden generar a través de un proceso de conversión de retrocruzamiento. Por ejemplo, las plantas incluyen plantas denominadas genotipo, línea, cepa endogámica o híbrido convertido por retrocruzamiento.
- [0237] Los marcadores genéticos se pueden usar para asistir en la introgresión de uno o más transgenes de la invención de un contexto genético a otro. La selección asistida por marcadores ofrece ventajas con respecto al cultivo convencional, ya que se puede usar para evitar errores causados por variaciones fenotípicas. Además, los marcadores
- 50

5 genéticos pueden proporcionar datos con respecto al grado relativo de germoplasma de élite en el descendiente individual de un cruce particular. Por ejemplo, cuando una planta con una característica deseada que de otro modo tiene un contexto genético agronómicamente no deseable se cruza con un progenitor de élite, los marcadores genéticos se pueden usar para seleccionar descendientes que no solo poseen la característica de interés, sino que también tienen una proporción relativamente grande del germoplasma deseado. De esta manera, el número de generaciones requeridas para la introgresión de una o más características se minimiza en un contexto genético particular.

[0238] La presente invención también se refiere a métodos de producción de una variante de la presente invención que comprenden: (a) el cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica la variante bajo condiciones propicias para la producción de la variante; y (b) la recuperación de la variante.

10 Usos

[0239] La presente invención se dirige también a procesos/métodos para usar los polipéptidos con actividad de alfa-amilasa de la invención.

15 [0240] Los usos según la invención incluyen la conversión de almidón a, por ejemplo, jarabe y productos de fermentación, incluyendo etanol y bebidas. Ejemplos de procesos donde se puede usar una alfa-amilasa de la invención incluyen aquellos descritos a continuación y otros procesos para la producción de etanol conocidos en la técnica que requieren la hidrólisis de material que contiene almidón.

Producción de productos de fermentación

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

20 [0241] En este aspecto, la presente invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación, especialmente etanol, a partir de material que contiene almidón, proceso que incluye un paso de licuefacción y pasos de sacarificación y fermentación realizados consecutiva o simultáneamente.

[0242] La invención se refiere a un método para la producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que comprende los pasos de:

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

30 [0243] El producto de fermentación, tal como especialmente el etanol, puede recuperarse opcionalmente después de la fermentación, por ejemplo, por destilación. Se enumeran materiales de partida que contienen almidón adecuados en la sección "materiales que contienen almidón" a continuación. Se enumeran enzimas contempladas en la sección de "enzimas" a continuación. La licuefacción se realiza preferiblemente en presencia de una alfa-amilasa. La fermentación se realiza preferiblemente en presencia de levadura, preferiblemente una cepa de *Saccharomyces*. Se enumeran organismos fermentadores adecuados en la sección "organismos fermentadores" a continuación. En ejemplos de realización preferidos, los pasos (b) y (c) se realizan consecutiva o simultáneamente (es decir, como un proceso de SSF).

35 [0244] En una forma de realización particular, el proceso de la invención además comprende, antes del paso (a), los pasos de:

- x) reducción del tamaño de partícula del material que contiene almidón, preferiblemente por molienda; y
 y) formación de una suspensión que comprende el material que contiene almidón y agua.

40 [0245] La suspensión acuosa puede contener un 10-40 % en peso, preferiblemente un 25-35 % en peso de material que contiene almidón. La suspensión se calienta por encima de su temperatura de gelatinización y se puede añadir una alfa-amilasa, preferiblemente una alfa-amilasa bacteriana y/o fúngica ácida, para iniciar la licuefacción (disolución). La suspensión puede, en una forma de realización, cocerse con vapor a presión para gelatinizar adicionalmente la suspensión antes de someterla a una alfa-amilasa en el paso (a) de la invención.

5 [0246] Más específicamente, la licuefacción se puede realizar como un proceso de suspensión en caliente de tres pasos. La suspensión se calienta a entre 60-95°C, preferiblemente 80-85°C, y se añade una alfa-amilasa para iniciar la licuefacción (disolución). Luego, la suspensión se puede cocer con vapor a presión a una temperatura entre 95-140°C, preferiblemente 105-125°C, durante 1-15 minutos, preferiblemente durante 3-10 minutos, especialmente alrededor de 5 minutos. La suspensión se enfría a 60-95°C y se añade más alfa-amilasa para finalizar la hidrólisis (licuefacción secundaria). El proceso de licuefacción se realiza normalmente a pH 4,5-6,5, en particular a un pH entre 5 y 6. Los granos enteros molidos y licuados se conocen como mosto.

10 [0247] La sacarificación en el paso (b) se puede realizar usando condiciones bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, un proceso de sacarificación completo puede durar hasta de aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas, sin embargo, es común hacer solo una presacarificación de típicamente 40-90 minutos a una temperatura de entre 30-65°C, típicamente aproximadamente 60°C, seguida de una sacarificación completa durante la fermentación en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (proceso de SSF). La sacarificación se realiza típicamente a temperaturas de 30-65°C, típicamente alrededor de 60°C, y a un pH entre 4 y 5, normalmente a alrededor de pH 4,5.

15 [0248] El proceso más ampliamente usado en la producción de un producto de fermentación, especialmente el etanol, es el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), donde no hay fase de retención para la sacarificación, lo que significa que se pueden añadir juntos el organismo fermentador, tal como una levadura, y la(s) enzima(s). La SSF puede realizarse típicamente a una temperatura de entre 25°C y 40°C, tal como entre 29°C y 35°C, tal como entre 30°C y 34°C, tal como alrededor de 32°C. Según la invención, la temperatura se puede ajustar hacia arriba o hacia abajo durante la fermentación.

20 [0249] Conforme a la presente invención, el paso de fermentación (c) puede incluir, 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, H₂ y CO₂); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B₁₂, beta-caroteno); y hormonas. Los procesos de fermentación preferidos incluyen procesos de fermentación alcohólica, como son bien conocidos en la técnica. Procesos de fermentación preferidos son los procesos de fermentación anaeróbica, como son bien conocidos en la técnica.

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

30 [0250] En este aspecto, la invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón sin gelatinización del material que contiene almidón (es decir, material que contiene almidón crudo). Según la invención, el producto de fermentación deseado, tal como el etanol, se puede producir sin licuar la suspensión acuosa que contiene el material que contiene almidón. En una forma de realización, un proceso de la invención incluye la sacarificación de material que contiene almidón (molido), por ejemplo, almidón granulado, por debajo de su temperatura de gelatinización en presencia de una alfa-amilasa de la invención 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 y una alfa-amilasa de la invención se usan durante la sacarificación y la fermentación. Particularmente, la glucoamilasa es AMG de *Trametes cingulata* y la alfa-amilasa es la amilasa de la invención que incluye preferentemente un conector y un CBD. En otra forma más de realización, una proteasa, una alfa-amilasa y una enzima desramificante (por ejemplo, una pululanasa o una glucoamilasa) se usan antes de la sacarificación y la fermentación.

40 [0251] Por consiguiente, en un aspecto, la invención se refiere a un método para la producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que comprende:

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

45 [0252] Los pasos (a) y (b) del proceso de la invención se pueden realizar consecutiva o simultáneamente. En una forma de realización, una suspensión que comprende agua y material que contiene almidón se prepara antes del paso (a).

[0253] El proceso de fermentación se puede realizar durante un periodo de 1 a 250 horas, preferiblemente de 25 a 190 horas, más preferiblemente de 30 a 180 horas, más preferiblemente de 40 a 170 horas, aún más preferiblemente de 50

a 160 horas, aún más preferiblemente de 60 a 150 horas, incluso aún más preferiblemente de 70 a 140 horas, y más preferiblemente de 80 a 130 horas.

5 [0254] El término "temperatura de gelatinización inicial" significa la temperatura más baja a la cual comienza la gelatinización del almidón. El almidón calentado en agua empieza a gelatinizar entre 50°C y 75°C; la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón específico y puede determinarla fácilmente la persona experta en la materia. Así, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según la especie vegetal de la que se obtiene el material que contiene almidón, así como con las condiciones de crecimiento. En el contexto de esta invención, la temperatura de gelatinización inicial de un material que contiene almidón dado es la temperatura a la cual se pierde birrefringencia en un 5% de los gránulos de almidón usando el método descrito por Gorinstein y Lii, 1992, Starch/Stärke 44(12): 461-466.

10 [0255] Antes del paso (a) puede prepararse una suspensión de material que contiene almidón, tal como almidón granulado, con un 10-55 % en peso de sólidos secos, preferiblemente 25-40 % en peso de sólidos secos, más preferiblemente 30-35 % en peso de sólidos secos del material que contiene almidón. La suspensión puede incluir agua y/o aguas de proceso, tales como la vinaza (residuo), el agua de lavado, el condensado o destilado de evaporador, el agua de extracción secundaria de destilación u otra agua de proceso de una planta de producto de fermentación. Debido a que el proceso de la invención se realiza por debajo de la temperatura de gelatinización y, por tanto, no se produce ningún aumento significativo de la viscosidad, se pueden usar altos niveles de vinaza si se desea. En una forma de realización, la suspensión acuosa contiene de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 70 % en volumen de vinaza, preferiblemente 15-60 % en volumen de vinaza, especialmente de aproximadamente 30 a 50 % en volumen de vinaza.

20 [0256] El material que contiene almidón se puede preparar reduciendo el tamaño de partícula, preferiblemente por molienda húmeda o seca, a de 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente 0,1-0,5 mm. Después de ser sometido a un proceso de la invención, al menos un 85%, al menos un 86%, al menos un 87%, al menos un 88%, al menos un 89%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o preferiblemente al menos un 99% de los sólidos secos del material que contiene almidón se convierte en un hidrolizado de almidón soluble.

[0257] El proceso de la invención se realiza a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial. Preferiblemente, la temperatura a la cual se realiza el paso (a) es de entre 30-75°C, preferiblemente entre 45-60°C.

30 [0258] En una forma de realización preferida, el paso (a) y el paso (b) se realizan como un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas o secuenciales. En tal forma de realización preferida, el proceso se realiza típicamente a una temperatura de entre 25°C y 40°C, tal como entre 29°C y 35°C, tal como entre 30°C y 34°C, tal como alrededor de 32°C. Según la invención, la temperatura se puede ajustar hacia arriba o hacia abajo durante la fermentación.

35 [0259] En una forma de realización, la sacarificación y la fermentación simultáneas se realizan de modo que el nivel de azúcar, tal como el nivel de glucosa, se mantenga a un nivel bajo tal como inferior a un 6 % en peso, preferiblemente inferior a aproximadamente un 3 % en peso, preferiblemente inferior a aproximadamente un 2 % en peso, de manera más preferida inferior a aproximadamente un 1 % en peso, aún más preferida inferior a aproximadamente un 0,5 % en peso, o aún más preferida un 0,25 % en peso, tal como inferior a aproximadamente un 0,1 % en peso. Tales bajos niveles de azúcar se pueden conseguir simplemente utilizando cantidades ajustadas de enzima y organismo fermentador. Una persona experta en la técnica puede determinar fácilmente qué cantidades de enzima y organismo fermentador usar. Las cantidades empleadas de enzima y organismo fermentador también se pueden seleccionar para mantener concentraciones bajas de maltosa en el caldo de fermentación. Por ejemplo, el nivel de maltosa se puede mantener inferior a aproximadamente un 0,5 % en peso o inferior a aproximadamente un 0,2 % en peso.

[0260] El proceso de la invención se puede realizar a un pH en el rango de entre 3 y 7, preferiblemente de pH 3,5 a 6, o más preferiblemente de pH 4 a 5.

Materiales que contienen almidón

45 [0261] Se puede usar cualquier material de partida que contenga almidón adecuado, incluyendo almidón granulado, según la presente invención. El material de partida se selecciona generalmente en función del producto de fermentación deseado. Ejemplos de materiales de partida que contienen almidón, adecuados para usar en un proceso de la presente invención, incluyen tubérculos, raíces, tallos, granos enteros, granos de maíz, mazorcas, trigo, cebada, centeno, milo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, alubias, o boniatos, o mezclas de los mismos, o cereales, materias

primas que contienen azúcar, tales como melaza, materiales de frutas, caña de azúcar o remolacha azucarera, patatas, y materiales que contienen celulosa, tales como los residuos de madera o plantas, o mezclas de los mismos. Se contemplan tanto tipos cerosos como no cerosos de maíz y cebada.

5 [0262] El término "almidón granulado" significa almidón crudo sin cocer, es decir, almidón en su forma natural encontrada en cereales, tubérculos o granos. El almidón se forma dentro de las células vegetales como gránulos pequeños insolubles en agua. Cuando se ponen en agua fría, los gránulos de almidón pueden absorber una pequeña cantidad del líquido e hincharse. A temperaturas de hasta 50°C a 75°C el hinchamiento puede ser reversible. Sin embargo, con temperaturas más altas empieza un hinchamiento irreversible llamado "gelatinización". El almidón granulado que se va a procesar puede ser una calidad de almidón muy refinado, preferiblemente al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 97% o al menos un 99,5% puro o puede ser un material que contiene almidón más crudo que comprende granos enteros molidos incluidas las fracciones no amiláceas tales como los residuos de germen y fibras. La materia prima, tal como granos enteros, se muelen para abrir la estructura y permitir un procesamiento posterior. Se prefieren dos procesos de molienda según la invención: molienda húmeda y seca. En la molienda seca, se muelen y usan granos enteros. La molienda húmeda proporciona una buena separación del germen y la harina (gránulos de almidón y proteína) y se aplica a menudo en ubicaciones donde se usa el hidrolizado de almidón en la producción de jarabes. Tanto la molienda húmeda como la seca son bien conocidas en la técnica del procesamiento del almidón y se contemplan igualmente para el proceso de la invención.

20 [0263] El material que contiene almidón se reduce en tamaño de partícula, preferiblemente por molienda seca o húmeda, para exponer más área de superficie. En una forma de realización, el tamaño de partícula es de entre 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente 0,1-0,5 mm, o de modo que al menos un 30%, preferiblemente al menos un 50%, más preferiblemente al menos un 70%, aún más preferiblemente al menos un 90% del material que contiene almidón se ajuste a través de un tamiz con una malla de 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente una malla de 0,1-0,5 mm.

Productos de fermentación

25 [0264] El término "producto de fermentación" significa un producto producido por un proceso que incluye un paso de fermentación usando un organismo fermentador. Los productos de fermentación contemplados según la invención incluyen 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, H₂ y CO₂) antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B₁₂, beta-caroteno); y hormonas. En una forma de realización preferida, 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 del alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), la industria láctea (por ejemplo, productos lácteos fermentados), la industria del cuero y la industria del tabaco. Los tipos de cerveza preferidos comprenden cervezas *ale*, cervezas *stout*, cervezas *porter*, cervezas *lager*, bíters, licores de malta, cerveza *happoushu*, cerveza con alto contenido de alcohol, cerveza baja en alcohol, cerveza baja en calorías o cerveza ligera. Los procesos de fermentación preferidos usados incluyen procesos de fermentación alcohólica, como son bien conocidos en la técnica. Los procesos de fermentación preferidos son los procesos de fermentación anaeróbica, como son bien conocidos en la técnica.

Organismos fermentadores

40 [0265] "Organismo fermentador" se refiere a cualquier organismo, incluidos los organismos bacterianos y fúngicos, adecuados para usar en un proceso de fermentación y capaces de producir un producto de fermentación deseado. Los organismos fermentadores especialmente adecuados son capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares, tales como la glucosa o la maltosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado. Los ejemplos de organismos fermentadores incluyen organismos fúngicos, tales como las levaduras. Las levaduras preferidas incluyen cepas de *Saccharomyces* spp., en particular, *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, Red Star™/Lesaffre Ethanol Red (disponible de Red Star/Lesaffre, EE.UU.), FALI (disponible de Fleischmann's Yeast, una división de Burns Philp Food Inc., EE.UU.), SUPERSTART (disponible de Alltech), GERT STRAND (disponible de GERT STRAND AB, Suecia) y FERMIOL (disponible de DSM Specialties).

ENZIMAS

Glucoamilasas

50 [0266] El término "glucoamilasa" (1,4-alfa-D-glucano glucohidrolasa, EC 3.2.1.3) es una enzima que cataliza la liberación de D-glucosa de los extremos no reductores del almidón o moléculas de oligo- y polisacáridos relacionadas.

[0267] Una glucoamilasa se puede derivar de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, derivada de un microorganismo o una planta. Las glucoamilasas preferidas son de origen fúngico o bacteriano. Los ejemplos de glucoamilasas adecuadas incluyen glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular la glucoamilasa G1 o G2 de *Aspergillus niger* (Boel et al., 1984, EMBO J. 3(5): 1097-1102), o variantes de las mismas, tales como las divulgadas en WO 92/00381, WO 00/04136 y WO 01/04273 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa de *A. awamori* divulgada en WO 84/02921, la glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* (Hata et al., 1991, Agric. Biol. Chem. 55(4): 941-949), o variantes o fragmentos de las mismas. Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes con una termoestabilidad aumentada: G137A y G139A (Chen et al., 1996, Prot. Eng. 9: 499-505); D257E y D293E/Q (Chen et al., 1995, Prot. Eng. 8: 575-582); N182 (Chen et al., 1994, Biochem. J. 301: 275-281); enlaces disulfuro, A246C (Fierobe et al., 1996, Biochemistry 35: 8698-8704); y la introducción de residuos de Pro en las posiciones A435 y S436 (Li et al., 1997, Prot. Eng. 10: 1199-1204).

[0268] Otras glucoamilasas incluyen la glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (previamente denominada *Corticium rolfsii*) (véase patente de EE.UU. n.º 4,727,026 y Nagasaka et al., 1998, Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 323-330), las glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular derivadas de *Talaromyces duponti*, *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente de EE.UU. n.º re. 32,153) y *Talaromyces thermophilus* (patente de EE.UU. n.º de registro 32,153), y *Talaromyces thermophilus* (patente de EE.UU. n.º 4,587,215), *Trametes cingulata*, *Pachykytospora papyracea* y *Leucopaxillus giganteus*, todas divulgadas en WO 2006/069289; o *Peniophora rufomarginata* divulgada en PCT/US2007/066618; o una mezcla de las mismas.

[0269] Las composiciones de glucoamilasas disponibles comercialmente incluyen AMG 200L; AMG 300L; SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L, SPIRIZYME™ PLUS, SPIRIZYME™ FUEL, SPIRIZYME™ B4U, SPIRIZYME ULTRA™ y AMG™ E (de Novozymes A/S, Dinamarca); OPTIDEX™ 300; GC480™ y GC147™ (de Genencor Int., USA); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME™ G900, G-ZYME™ y G990 ZR (de Genencor Int.).

Alfa-amilasas

[0270] La variante de alfa-amilasa según la invención se ha descrito en detalle anteriormente. Otras alfa-amilasas de origen fúngico o bacteriano también pueden ser pertinentes en combinación con la alfa-amilasa de la invención.

[0271] En una forma de realización preferida, una alfa-amilasa adicional es una alfa-amilasa ácida, por ejemplo, una alfa-amilasa ácida fúngica o una alfa-amilasa ácida bacteriana. El término "alfa-amilasa ácida" significa una alfa-amilasa (EC 3.2.1.1) que añadida en una cantidad eficaz tiene una actividad óptima a un pH en el rango de 3 a 7, preferiblemente de 3,5 a 6, o más preferiblemente de 4-5.

Alfa-amilasas bacterianas

[0272] Una alfa-amilasa bacteriana puede preferiblemente derivarse del género *Bacillus*.

[0273] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa de *Bacillus* se deriva de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* o *B. stearothermophilus*, pero también se puede derivar de otra *Bacillus* sp. Ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (BLA) mostrada en la SEQ ID NO: 4 en WO 99/19467, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (BAN) mostrada en la SEQ ID NO: 5 en WO 99/19467 y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (BSG) mostrada en la SEQ ID NO: 3 en WO 99/19467. En una forma de realización de la invención, la alfa-amilasa es una enzima con un grado de identidad de al menos un 60%, preferiblemente al menos un 70%, de manera más preferida al menos un 80%, aún más preferida al menos un 90%, tal como al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad con cualquiera de las secuencias mostradas como las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente, en WO 99/19467.

[0274] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o un híbrido, especialmente uno descrito en cualquiera de WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059 y WO 02/10355. Específicamente se divulgan variantes de alfa-amilasa contempladas en las patentes de EE.UU. Nos. 6,093,562, 6,187,576 y 6,297,038 e incluyen variantes de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (alfa-amilasa BSG) con una delección de uno o dos aminoácidos en la posición de 179 a 182, preferiblemente una delección doble divulgada en WO 96/23873 –véase, por ejemplo, la página 20, líneas 1-10–, preferiblemente correspondiente a delta(181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en la SEQ ID NO: 3 divulgada en WO 99/19467 o una delección de los aminoácidos 179 y 180 usando la SEQ ID NO: 3 en WO 99/19467 para la numeración. Aún más preferidas son las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente la alfa-amilasa

de *Bacillus stearothermophilus*, que tiene una deleción doble correspondiente a delta(181-182) y además comprende una sustitución N193F (también denominada I181* + G182* + N193F) comparada con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* de tipo salvaje expuesta en la SEQ ID NO: 3 divulgada en WO 99/19467.

- 5 [0275] La alfa-amilasa también puede ser una alfa-amilasa maltogénica. Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa, 3.2.1.133) es capaz de hidrolizar la amilosa y la amilopectina a maltosa en la configuración alfa. Una alfa-amilasa maltogénica de la cepa de *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está comercialmente disponible de Novozymes A/S, Dinamarca. La alfa-amilasa maltogénica se describe en las patentes de EE.UU. Nos. 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628.

Alfa-amilasas híbridas bacterianas

- 10 [0276] Una alfa-amilasa híbrida específicamente contemplada comprende 445 residuos de aminoácidos C-terminales de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada como la SEQ ID NO: 3 en WO 99/19467) y los 37 residuos de aminoácidos N-terminales de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada como la SEQ ID NO: 5 en WO 99/19467), con una o más, especialmente todas, de las siguientes sustituciones:
 15 G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S (usando la numeración de *Bacillus licheniformis*).
 También preferidas son las variantes con una o varias de las siguientes mutaciones (o mutaciones correspondientes en otros esqueletos de la alfa-amilasa de *Bacillus*): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o la deleción de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferiblemente la deleción de E178 y G179 (usando la numeración de la SEQ ID NO: 5 de WO 99/19467).

[0277] La alfa-amilasa bacteriana se puede añadir en cantidades que son bien conocidas en la técnica.

Alfa-amilasas fúngicas

[0278] Las alfa-amilasas fúngicas ácidas incluyen alfa-amilasas ácidas derivadas de una cepa del género *Aspergillus*, tales como las alfa-amilasas de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* o de *Aspergillus kawachii*.

- 25 [0279] Una alfa-amilasa fúngica ácida preferida es una alfa-amilasa similar a Fungamyl que se deriva preferiblemente a partir de una cepa de *Aspergillus oryzae*. En la presente divulgación, el término "alfa-amilasa similar a Fungamyl" indica una alfa-amilasa que presenta una identidad alta, 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 el 100% de identidad con la parte madura de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 10 en WO 96/23874.

- 30 [0280] Otra alfa-amilasa ácida preferida se deriva a partir de una cepa de *Aspergillus niger*. En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa fúngica ácida es la de *A. niger* divulgada como "AMYA_ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TrEMBL bajo el n.º de acceso primario P56271 y descrito con más detalle en WO 89/01969 (ejemplo 3). La alfa-amilasa ácida de *Aspergillus niger* se muestra también como la SEQ ID NO: 1 en WO 2004/080923 (Novozymes). También se contemplan variantes de dicha amilasa fúngica ácida con al menos un 70% de identidad, tal como al menos un 80% o incluso al menos un 90% de identidad, tal como al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad con la SEQ ID NO: 1 de WO 2004/080923.

- 35 [0281] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa se deriva de *Aspergillus kawachii* y se divulga en Kaneko et al., 1996, J. Ferment. Bioeng. 81:292-298, "Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachii*"; y además como EMBL: #AB008370.

- 40 [0282] La alfa-amilasa ácida fúngica también puede ser una enzima de tipo salvaje que comprende un módulo de unión a carbohidratos (CBM) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir, una no híbrida), o una variante de la misma. En una forma de realización, la alfa-amilasa ácida de tipo salvaje se deriva a partir de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

Alfa-amilasas híbridas fúngicas

[0283] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida. Ejemplos preferidos de alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen aquellas divulgadas en WO 2005/003311 o la publicación de solicitud de EE.UU. n.º 2005/0054071 (Novozymes) o la solicitud de patente de EE.UU. n.º 60/638,614 (Novozymes).

Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico de alfa-amilasa (CD) y un dominio/módulo de unión a carbohidratos (CBM) y opcionalmente un conector.

5 [0284] Los ejemplos específicos de las alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellas divulgadas en la solicitud de EE.UU. n.º 60/638,614 incluyendo la variante de Fungamyl con el dominio catalítico JA118 y el SBD de *Athelia rolfsii* (SEQ ID NO: 100 en la solicitud de EE.UU. n.º 60/638,614), la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con el conector y el SBD de la AMG de *Athelia rolfsii* (SEQ ID NO: 101 en la solicitud de EE.UU. n.º 60/638,614) y la alfa-amilasa de *Meripilus giganteus* con el conector y el SBD de la glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (SEQ ID NO: 102 en la solicitud de EE.UU. n.º 60/638,614).

10 [0285] Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellas divulgadas en la publicación de solicitud de EE.UU. n.º 2005/0054071, incluidas aquellas divulgadas en la tabla 3 en la página 15, tal como la alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con un dominio de unión al almidón y un conector de *Aspergillus kawachii*.

Productos de alfa-amilasa comerciales

15 [0286] Las composiciones comerciales preferidas que comprenden una alfa-amilasa incluyen MYCOLASE de DSM (Gist Brocades), BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X y SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE™ L-40,000, DEX-LO™, SPEZYME™ FRED, SPEZYME™ AA, SPEZYME™ Ethyl, GC358, GC980, SPEZYME™ RSL y SPEZYME™ DELTA AA (Genencor Int.).

20 [0287] La invención descrita y reivindicada en la presente no debe estar limitada en su alcance por las formas de realización específicas divulgadas en la presente, ya que estas formas de realización están pensadas como ilustraciones de varios aspectos de la invención. Cualquier forma de realización equivalente está destinada a estar dentro del alcance de esta invención. De hecho, varias modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas en la presente serán evidentes para las personas expertas en la técnica a partir de la descripción precedente. En caso de conflicto, prevalecerá la presente divulgación, incluidas las definiciones.

[0288] La presente invención se describe adicionalmente mediante los ejemplos siguientes.

EJEMPLOS

25 **Ejemplo 1: preparación de las variantes y prueba de termoestabilidad**

Cepas y plásmidos

[0289] Se usó *E. coli* DH12S (disponible de Gibco BRL) para el rescate de plásmidos de levadura.

30 [0290] pLAV019 es un vector transportador de *S. cerevisiae* y *E. coli* bajo el control del promotor TPI, descrito en WO06069290, con la secuencia señal de la alfa-amilasa ácida de *Aspergillus niger*, el gen de la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* y la secuencia parcial del gen de la glucoamilasa de *Athelia rolfsii* que comprende solo el conector y el CBM. El vector se usó para construir bibliotecas de ingeniería de proteínas y variantes dirigidas al sitio.

[0291] Se usó *Saccharomyces cerevisiae* YNG318: MATa Dpep4[cir+] ura3-52, leu2-D2, his 4-539 para la expresión de variantes de alfa-amilasa. Se describe en J. Biol. Chem. 272(15): 9720-9727 (1997).

Medios y sustratos

35 [0292] Solución basal 10X: base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (DIFCO) 66,8 g/l, succinato 100 g/l, NaOH 60 g/l.

40 [0293] Glucosa SC: 100 ml/l de glucosa al 20% (es decir, una concentración final del 2% = 2 g/100 ml), 4 ml/l de treonina al 5%, 10 ml/l de triptófano al 1%, 25 ml/l de casaminoácidos al 20%, 100 ml/l de solución basal 10 X. La solución se esteriliza usando un filtro de un tamaño de poros de 0,20 micrómetros. El agar y el H₂O (aprox. 761 ml) se autoclavan juntos, y la solución de glucosa SC esterilizada por separado se añade a la solución de agar.

[0294] Placa de glucosa SC + almidón: almidón de maíz al 0,5-0,8% se añade al medio de glucosa SC anterior que contiene un 2% de agar.

[0295] YPD: 20 g/l de bacto peptona, 10 g/l de extracto de levadura, 100 ml/l de glucosa al 20%.

[0296] Solución de PEG/LiAc: 50 ml de PEG4000 al 40%, 1 ml de 5 M de acetato de litio.

5 Manipulaciones del ADN

[0297] A menos que se indique lo contrario, las manipulaciones y las transformaciones del ADN se realizaron usando métodos estándares de biología molecular como los descritos en Sambrook et al. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor lab. Cold Spring Harbor, NY.

Transformación de levaduras

- 10 [0298] La transformación de levaduras se efectuó por el método del acetato de litio. Mezclar 0,5 microL de vector (digerido por endonucleasas de restricción) y 1 microL de fragmentos de la PCR. Descongelar células YNG318 competentes en hielo. Mezclar 100 microL de las células, la mezcla de ADN y 10 microL de ADN portador YEAST MAKER (Clontech) en tubos de polipropileno de 12 ml (Falcon 2059). Añadir 0,6 ml de solución de PEG/LiAc y mezclar suavemente. Incubar durante 30 min a 30°C y 200 r.p.m. Incubar durante 30 min a 42°C (choque térmico). Transferir a un tubo de microcentrífuga y centrifugar durante 5 s. Eliminar el sobrenadante y redissolver en 3 ml de YPD. Incubar la suspensión celular durante 45 min a 200 r.p.m. a 30°C. Verter la suspensión en placas de glucosa SC e incubar a 30°C durante 3 días para crear colonias. Se extrajo el ADN total de levadura con el kit Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep (ZYMO research).

Secuenciación del ADN

- 20 [0299] La transformación de *E. coli* para la secuenciación del ADN se efectuó por electroporación (BIO-RAD Gene Pulser). Los plásmidos de ADN se prepararon por el método alcalino (*Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor, Sambrook et al., 1989, *supra*) o con el Qiagen® Plasmid Kit. Se recuperaron los fragmentos de ADN del gel de agarosa con el Qiagen gel extraction Kit. La PCR se realizó usando un PTC-200 DNA Engine. Se usó el ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer para determinar todas las secuencias de ADN.

25 Construcción de una biblioteca de levadura y variantes dirigidas al sitio

[0300] Se construyeron una biblioteca en levadura y variantes dirigidas al sitio por el método de PCR SOE (Splicing by Overlap Extension, véase "PCR: A practical approach", p. 207-209, Oxford University Press, 1991, eds. McPherson, Quirke, Taylor), seguido de la recombinación *in vivo* de levadura.

- 30 [0301] Se utilizan los siguientes cebadores para producir fragmentos de ADN que contienen cualquier fragmento mutado por el método SOE junto con cebadores degenerados (AM34 + cebador inverso y AM35 + cebador directo) o solo para amplificar un gen de amilasa entero (AM34 + AM35). AM34 y AM35 son cebadores localizados aguas arriba y aguas abajo del gen de la amilasa.

AM34 TAGGAGTTTAGTGAACCTTGC (SEQ ID NO: 45)
 AM35 TTCGAGCGTCCCAAACC (SEQ ID NO: 46)

Sistema de reacción PCR:		Condiciones:	
48,5 microL	H ₂ O	1	94°C 2 min
2 microesferas	puRe Taq Ready-To-Go PCR	2	94°C 30 s
Microesferas (Amersham Biosciences)		3	55°C 30 s
0,5 microL X 2	100 pmol/microL	4	72°C 90 s
Cebadores		2-4	25 ciclos
0,5 microL	ADN molde	5	72°C 10 min

[0302] Los fragmentos de ADN se recuperaron de un gel de agarosa con el Qiagen gel extraction Kit. Los fragmentos purificados resultantes se mezclaron con el digerido del vector. La solución mezclada se introdujo en *Saccharomyces cerevisiae* para construir bibliotecas o variantes dirigidas al sitio por recombinación *in vivo*.

Construcción de híbridos de amilasa con otro conector y CBM

5 [0303] Los híbridos de amilasa que comprenden el centro catalítico de *Rhizomucor pusilus* fusionado con conectores y CBM diferentes de aquellos de la glucoamilasa de *Athelia rolfsii* se construyeron por el método SOE utilizando la recombinación *in vivo* de levadura.

10 [0304] La secuencia parcial que codifica la región CBM de *Athelia rolfsii* se eliminó de los plásmidos de variantes con el conector y CBM de la glucoamilasa de *Athelia rolfsii* digiriendo con las enzimas de restricción, SacI y NotI, y el vector resultante se mezcló con el fragmento de la PCR amplificado usando un par de los cebadores siguientes del gen de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*. Se introdujeron en levadura para construir híbridos con el conector y el CBM de la glucoamilasa de *Aspergillus niger*.

Conector F de AN CGGCTATCTTCACCTCTGCTACTGGCGGCACCACTACG (SEQ ID NO: 47)

Conector R de AN CTAATTACATGATGCGGCCCGCGGCCGCCTACCGCCAGGTGTCTCAGTC (SEQ ID NO: 48)

15 Expresión de amilasas con un CBM en *Aspergillus niger*

[0305] Las construcciones que comprenden los genes de una variante de alfa-amilasa que incluyen un conector y un CBM se usaron para construir vectores de expresión. El plásmido parental, pAspV019, consiste en un casete de expresión basado en el promotor de la amilasa neutra II de *Aspergillus niger* fusionado con la secuencia líder no traducida de la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* (Pna2/tpi) y el terminador de la amiloglucosidasa de *Aspergillus niger* (Tamg). También estaba presente en el plásmido el marcador selectivo *amdS* de *Aspergillus* procedente de *Aspergillus nidulans* que permite el crecimiento en acetamida como única fuente de nitrógeno. Los plásmidos de expresión de *Aspergillus* se transformaron en *Aspergillus* como se describe en Lassen et al., 2001, Applied and Environmental Microbiology 67: 4701-4707. Los transformantes que expresaban variantes de V019 se aislaron, purificaron y cultivaron en matraces de agitación. Los caldos de cultivo de fermentaciones de *Aspergillus niger* que expresaban amilasa con un CBM se purificaron por purificación de afinidad (Biochem. J. 372: 905-910 (2003)).

Cribado de bibliotecas de ingeniería de proteínas y variantes de mutagénesis dirigida al sitio

[0306] Se reinocularon clones de levadura en glucosa SC sobre placas de glucosa SC que contenían almidón y los clones que presentaron zonas claras se inocularon en un pocillo de una placa de microtitulación de 24-pocillos que contenía medio YPD, y se cultivaron a 28°C durante 3 días. Se añadió tampón de acetato sódico 2 M, pH 3,5, a los sobrenadantes de los cultivos a la concentración final de 100 mM, y se incubaron a 4 y 65°C durante 1 hora. Las actividades de alfa-amilasa residuales se midieron con el kit de ensayo de alfa-amilasa (Kikkoman Biochemifa Company, n.º de cat. 60213), según el protocolo del proveedor. El ensayo se basa en la degradación de N3-G5-β-CNP (2 cloro-4 nitrofenil 6⁵-azida-6⁵-desoxi-b-maltopentósido) por la alfa-amilasa para liberar G3-β-CNP y G2-β-CNP, que se degradan posteriormente por la glucoamilasa y la beta-glucosidasa proporcionadas en las soluciones del kit a CNP. 1U de actividad de alfa-amilasa se definió como 1 μmol de CNP liberado/min a pH 4,0 y 30°C.

[0307] Se calculó la unidad/ml de cada muestra después de la incubación de parte de la muestra 1 hora a 4°C y otra parte de la muestra después de una incubación de 1 hora a 65°C. En la tabla siguiente, la proporción entre estas dos actividades para cada muestra se muestra como el % de la actividad residual. U/ml se calculó como: actividad de alfa-amilasa = $(E_{\text{muestra}} - E_{\text{blanco}}) \times 0,179 \times \text{factor de dilución}$, donde se detectó el CPN liberado por espectrofotometría a A400.

40 [0308] Se seleccionaron los clones con una proporción más alta de la actividad después de incubar a 65°C/actividad después de incubar a 4°C que la variante parental y se determinó la secuencia.

Tabla 1. Actividad de alfa-amilasa residual de las variantes.

Variante n.º	CBM	Sustituciones	La proporción de la actividad residual después de incubar a 65°C/4°C (la proporción de la amilasa parental (tipo salvaje (WT) u otra variante))
PE12	AR (Ath.rolfsii)	D165M	55% (WT 34%)
PE15	AR	Y141R	68% (WT 34%)
PE16	AR	Y141W	89% (WT 34%)
PE27	AR	S123H+Y141W	50% (WT 22%, PE16 40%)
PE30	AR	G20S+Y141W	43% (WT 18%, PE16 32%)
PE34	AR	A76G+Y141W	27% (WT 15%, PE16 30%)
PE36	AR	G128D+Y141W	31% (WT 15%, PE16 30%)
PE39	AR	Y141W+P219C	26% (PE16 18%)
PE41	AR	N142D+D143N	40% (PE16 18%)
PE53	AR	Y141W+K192R	57% (PE16 23%)
PE55	AR	Y141W+P219C+A265C	35% (PE16 28%)
PE57	AR	Y141W+N142D+D143N	55% (PE16 26%, PE41 46%)
PE58	AR	Y141W+D143N	66% (PE16 26%)
PE64	AR	Y141W+N383R	21% (PE16 15%)
PE65	AR	Y141W+K192R+V410A	55% (PE16 15%)
PE67	AR	G128D+Y141W+D143N	37% (PE16 8%, PE58 38%)
PE71	AR	Y141W+D143N+K192R	50% (PE16 8%, PE58 38%)
PE75	AR	Y141W+D143N+K192R+P219C	34% (PE16 23%)
PE77	AR	G128D+Y141W+D143N+ K192R	57% (PE16 8%, PE58 38%)
PE79	AR	G128D+Y141W+D143N+ K192R+P219C	37% (PE16 23%)
PE81	AR	Y141W+D143N+K192R (=PE71)	72% (PE16 31%, PE58 64%)
PE84	AN (Asp. niger)	Y141W+D143N	70% (WT 20%)
PE85	AN	G128D+Y141W+D143N	66% (WT 15%)
PE86	AN	G128D+Y141W+D143N +K192R	85% (WT 15%)
PE96	AN	G128D+D143N	65% (WT 20%)
PE97	AN	K136F	46% (WT 20%)
PE99	AN	P224A	26% (WT 20%)
PE100	AN	P224R	28% (WT 20%)
PE101	AN	G128D+D143N+K192R	79% (WT 16%)
PE122	AN	K192R	73% (WT 29%)

[0309] Como se observa en la tabla, todas las variantes evaluadas presentaron una termoestabilidad mejorada en comparación con la alfa-amilasa de tipo salvaje.

Ejemplo 2: estabilidad de almacenamiento de las variantes

- 5 [0310] Se expresó una de las variantes, PE16, en *Aspergillus niger* y los sobrenadantes de los cultivos se purificaron por un procedimiento cromatográfico de tres pasos: intercambio aniónico a pH 7,0 y pH 5,0 seguido de cromatografía de exclusión por tamaño. Dos fracciones con actividad amilasa, con un PM de aprox. 50 kDa y 60 kDa que corresponden a las moléculas con el CBM (parte central) escindido y el conector y el CBM intactos, se recogieron y se evaluaron para

la estabilidad de almacenamiento. Las muestras se incubaron a pH 3,8, a 4°C y 40°C durante 6 días y las actividades restantes se midieron cada día.

Tabla 2. Los resultados se dan como actividad residual relativa.

Almacenamiento a pH 3,8 a 4°C o 40°C	Días				
	0	1	2	3	6
Tipo salvaje, 4°C	100%	99%	102%	96%	102%
Tipo salvaje, 40°C	100%	60%	38%	22%	6%
PE16 (parte central), 4°C	100%	98%	101%	100%	107%
PE16 (parte central), 40°C	100%	79%	62%	48%	25%
PE16, 4°C	100%	97%	99%	98%	104%
PE16, 40°C	100%	76%	59%	45%	21%

5 [0311] Los datos demuestran que la presencia de un conector y un CBM no afecta las mejoras obtenidas introduciendo las sustituciones según la invención en la región central.

Ejemplo 3. Termoestabilidad a pH 3,5

[0312] La termoestabilidad de las fusiones de las variantes seleccionadas que incluyen un conector y un CBD se evaluó usando las condiciones siguientes.

10 [0313] Se añadió 1/20 (v/v) de 2 M de tampón de acetato sódico, pH 3,5, a los sobrenadantes de los cultivos de levadura de clones que expresan las variantes de alfa-amilasa seleccionadas y se incubaron las muestras a 4, 60, 65 y 70°C durante 1 hora.

[0314] Las actividades residuales se midieron con el kit de ensayo de alfa-amilasa (Kikkoman #60123) como se ha descrito anteriormente y las actividades residuales resultantes son relativas a la actividad a 4°C.

Tabla 3. Actividad de alfa-amilasa residual relativa a las muestras a 4°C.

Enzima	Conector y CBD	60°C	65°C	70°C
PE84	AMG de <i>A. niger</i>	78%	53%	33%
PE85	AMG de <i>A. niger</i>	80%	48%	33%
PE86	AMG de <i>A. niger</i>	76%	55%	46%
PE96	AMG de <i>A. niger</i>	73%	48%	25%
PE97	AMG de <i>A. niger</i>	65%	32%	8%
PE100	AMG de <i>A. niger</i>	58%	19%	2%
PE101	AMG de <i>A. niger</i>	81%	60%	42%
WT	AMG de <i>A. niger</i>	53%	13%	1%

15 [0315] Bajo las condiciones evaluadas, todas las variantes mostraron una termoestabilidad mejorada.

Ejemplo 4. Estabilidad de almacenamiento de las variantes a pH 4,0

[0316] Variantes de alfa-amilasa purificadas expresadas en *Aspergillus oryzae* se incubaron a 40°C durante 3 días y 10 días (4°C como control) bajo las condiciones siguientes:

20 50 mM de tampón de NaOAc (pH 4,0)
0,5 mM de CaCl₂
0,005% de tritón X-100

[0317] Se midieron las actividades residuales con el kit de ensayo de alfa-amilasa (Kikkoman #60123) como se ha descrito anteriormente.

Tabla 4. Actividad de alfa-amilasa residual.

Enzima	Conector y CBD	3 días	10 días
Wt	AMG de <i>A. rolfsii</i>	36%	3%
Wt	AMG de <i>A. niger</i>	34%	2%
PE67	AMG de <i>A. rolfsii</i>	108%	56%
PE85	AMG de <i>A. niger</i>	110%	54%
PE96	AMG de <i>A. niger</i>	81%	53%
PE77	AMG de <i>A. rolfsii</i>	95%	83%
PE86	AMG de <i>A. niger</i>	97%	78%
PE101	AMG de <i>A. niger</i>	88%	79%

[0318] Bajo las condiciones evaluadas, todas las variantes mostraron una estabilidad de almacenamiento mejorada.

5 **Ejemplo 5. Prueba de las variantes seleccionadas en un proceso de etanol basado en la hidrólisis de almidón crudo**

10 [0319] Se añadieron aproximadamente 405 g de maíz dentado amarillo (obtenido de varios productores de maíz a etanol de la región central de Estados Unidos; molienda propia con ajustes de molienda turca) a 595 g de agua del grifo. Esta mezcla se suplementó con 3 ppm de penicilina y 1000 ppm de urea. La suspensión se ajustó a pH 4,5 con H₂SO₄ al 40%. Se añadieron aproximadamente 5 g de esta suspensión a tubos de 15 mL. Cada tubo se dosificó con 0,0801 mg/g de DS glucoamilasa de *Trametes cingulata* y 0,0225 mg/g de DS alfa-amilasa, seguido de 200 µL de propagación de levadura (0,024 g de levadura Ethanol Red de Fermentis, se incubó durante toda la noche a 32°C en 50 mL de mosto de maíz licuado filtrado y 5,1 µL de AMG Sprizyme Plus). Se añadió agua a cada tubo para llevar el volumen total añadido (enzima + agua) al 1,2% del peso inicial del mosto.

15 [0320] Se incubaron los tubos a 32°C y se realizaron seis réplicas de fermentaciones de cada tratamiento. Todos los tubos se agitaron en vórtex a las 24, 48 y 70 horas. Una muestra se sacrificó para el análisis por HPLC a las 24 horas, dos a las 48 horas y tres a las 70 horas. La preparación de HPLC consistió en parar la reacción mediante la adición de 50 µL de H₂SO₄ al 40%, centrifugar durante 10 min a 1462xg y filtrar a través de un filtro de 0,45 µm. Las muestras se almacenaron a 4°C.

20 Análisis por HPLC para etanol
 Sistema de HPLC - serie 1100/1200 de Agilent con el software ChemStation
 Desgasificador
 Bomba cuaternaria
 Muestreador automático
 25 Compartimento de columna con calefactor
 Detector del índice de refracción (IR)
 Columna - columna de exclusión iónica HPX-87H de Bio-Rad 300 mm x 7,8 mm partes# 125-0140
 Cartucho protector de catión H Bio-Rad partes# 125-0129, soporte partes# 125-0131
 Método - fase móvil 0,005 M de H₂OSO₄
 30 Caudal de 0,6 ml/min
 Temperatura de la columna - 65°C
 Temperatura del detector de IR - 55°C

Tabla 5. Rendimiento de etanol relativo.

Enzima	70 h etanol
wt + Tc-AMG	100%

ES 2 729 385 T3

PE085 + Tc-AMG	100,55%
PE086 + Tc-AMG	99,83%
PE096+ Tc-AMG	100,15%
Tc-AMG solo	63,11%

Los resultados muestran que todas las variantes evaluadas según la invención han retenido su aplicabilidad en un proceso de hidrólisis de almidón crudo.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0321]

5 <110> Novozymes A/S

<120> Variantes de alfa-amilasa y polinucleótidos que codifican las mismas

<130> 12123-WO-PCT

10 <160> 48

<170> Versión de PatentIn 3.5

15 <210> 1

<211> 1416

<212> ADN

<213> Rhizomucor pusillus

20 <400> 1

atgaaattca gcatctctct ctcggcagca attgtactct tcgcggccgc aacaagcctt 60

gcaagccctt tgccccaaca gcagcgatat ggcaaaagag caacttcgga tgactggaaa 120

25 ggcaaggcca tttatcagct gcttacagat cgatttggcc gcgccgatga ctcaacaagc 180

aactgctcta atttatccaa ctactgtggt ggtacctacg aaggcattac gaagcatctt 240

gactacattt ccggtatggg ctttgatgct atctggatat cgccaattcc caagaactcg 300

30 gatggaggct accacggcta ctgggctaca gatttctacc aactaaacag caactttggt 360

gatgaatccc agctcaaagc gctcatccag gctgcccattg aacgtgacat gtatggtatg 420

35 cttgatgtcg tagccaatca tgcaggtccc accagcaatg gctactcggg ttacacattc 480

ggcgatgcaa gtttatatca tcctaaatgc accatagatt acaatgatca gacgtctatt 540

gagcaatgct gggttgctga cgagttgcct gatattgaca ctgaaaattc tgacaacgtg 600

40 gccattctca acgacatcgt ctccggctgg gtgggtaact atagctttga cggcatccgc 660

attgatactg tcaagcatat tcgcaaggac ttttggacag gctacgcaga agctgccggc 720

ES 2 729 385 T3

gtattcgcaa ctggagaggt cttcaatggt gatccggcct acgttggacc ttatcaaaag 780
 tacctgccat ctctcatcaa ttaccaatg tattacgctt tgaacgacgt ctttgtatcc 840
 5 aaaagcaaag gattcagccg catcagcga atgctaggat caaatcgcaa tgcgtttgag 900
 gataccagcg tacttacaac gtttgtagac aaccatgaca atccgcgctt cttgaacagt 960
 caaagcgaca aggctctctt caagaacgct ctacatacg tactgctagg tgaaggcatc 1020
 10 ccaattgtgt attatggttc tgagcaaggt ttcagcggag gagcggatcc tgctaaccgt 1080
 gaagtgctgt ggaccaccaa ttatgataca tccagcgatc tctaccaatt tatcaagaca 1140
 15 gtcaacagtg tccgcatgaa aagcaacaag gccgtctaca tggatattta tgettggcgac 1200
 aatgcttacg ctttaagca cggcgatgct ttggttgttc tcaataacta tggatcaggt 1260
 tccacaaacc aagtcagctt cagcgttagt ggcaagttcg atagcggcgc aagcctcatg 1320
 20 gatattgtca gtaacattac caccacggtg tcctcggatg gaacagtcac tttcaacctt 1380
 aaagatggac ttccggctat cttcacctct gcttaa 1416

25 <210> 2
 <211> 471
 <212> PRT
 <213> Rhizomucor pusillus

30 <400> 2

Met Lys Phe Ser Ile Ser Leu Ser Ala Ala Ile Val Leu Phe Ala Ala
 1 5 10 15

35 Ala Thr Ser Leu Ala Ser Pro Leu Pro Gln Gln Gln Arg Tyr Gly Lys
 20 25 30

40 Arg Ala Thr Ser Asp Asp Trp Lys Gly Lys Ala Ile Tyr Gln Leu Leu
 35 40 45

45 Thr Asp Arg Phe Gly Arg Ala Asp Asp Ser Thr Ser Asn Cys Ser Asn
 50 55 60

50 Leu Ser Asn Tyr Cys Gly Gly Thr Tyr Glu Gly Ile Thr Lys His Leu
 65 70 75 80

Asp Tyr Ile Ser Gly Met Gly Phe Asp Ala Ile Trp Ile Ser Pro Ile

ES 2 729 385 T3

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

ES 2 729 385 T3

5 Leu Thr Thr Phe Val Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Phe Leu Asn Ser
 305 310 315 320
 Gln Ser Asp Lys Ala Leu Phe Lys Asn Ala Leu Thr Tyr Val Leu Leu
 325 330 335
 10 Gly Glu Gly Ile Pro Ile Val Tyr Tyr Gly Ser Glu Gln Gly Phe Ser
 340 345 350
 15 Gly Gly Ala Asp Pro Ala Asn Arg Glu Val Leu Trp Thr Thr Asn Tyr
 355 360 365
 20 Asp Thr Ser Ser Asp Leu Tyr Gln Phe Ile Lys Thr Val Asn Ser Val
 370 375 380
 25 Arg Met Lys Ser Asn Lys Ala Val Tyr Met Asp Ile Tyr Val Gly Asp
 385 390 395 400
 30 Asn Ala Tyr Ala Phe Lys His Gly Asp Ala Leu Val Val Leu Asn Asn
 405 410 415
 Tyr Gly Ser Gly Ser Thr Asn Gln Val Ser Phe Ser Val Ser Gly Lys
 420 425 430
 35 Phe Asp Ser Gly Ala Ser Leu Met Asp Ile Val Ser Asn Ile Thr Thr
 435 440 445
 40 Thr Val Ser Ser Asp Gly Thr Val Thr Phe Asn Leu Lys Asp Gly Leu
 450 455 460
 45 Pro Ala Ile Phe Thr Ser Ala
 465 470
 <210> 3
 <211> 438
 <212> PRT
 50 <213> Rhizomucor pusillus
 <400> 3

ES 2 729 385 T3

Ala Thr Ser Asp Asp Trp Lys Gly Lys Ala Ile Tyr Gln Leu Leu Thr
1 5 10 15

5 Asp Arg Phe Gly Arg Ala Asp Asp Ser Thr Ser Asn Cys Ser Asn Leu
20 25 30

10 Ser Asn Tyr Cys Gly Gly Thr Tyr Glu Gly Ile Thr Lys His Leu Asp
35 40 45

15 Tyr Ile Ser Gly Met Gly Phe Asp Ala Ile Trp Ile Ser Pro Ile Pro
50 55 60

20 Lys Asn Ser Asp Gly Gly Tyr His Gly Tyr Trp Ala Thr Asp Phe Tyr
65 70 75 80

25 Gln Leu Asn Ser Asn Phe Gly Asp Glu Ser Gln Leu Lys Ala Leu Ile
85 90 95

30 Asn His Ala Gly Pro Thr Ser Asn Gly Tyr Ser Gly Tyr Thr Phe Gly
115 120 125

35 Asp Ala Ser Leu Tyr His Pro Lys Cys Thr Ile Asp Tyr Asn Asp Gln
130 135 140

40 Thr Ser Ile Glu Gln Cys Trp Val Ala Asp Glu Leu Pro Asp Ile Asp
145 150 155 160

45 Thr Glu Asn Ser Asp Asn Val Ala Ile Leu Asn Asp Ile Val Ser Gly
165 170 175

50 Trp Val Gly Asn Tyr Ser Phe Asp Gly Ile Arg Ile Asp Thr Val Lys
180 185 190

His Ile Arg Lys Asp Phe Trp Thr Gly Tyr Ala Glu Ala Ala Gly Val
195 200 205

Phe Ala Thr Gly Glu Val Phe Asn Gly Asp Pro Ala Tyr Val Gly Pro

ES 2 729 385 T3

	210		215		220												
5	Tyr 225	Gln	Lys	Tyr	Leu	Pro 230	Ser	Leu	Ile	Asn 235	Tyr	Pro	Met	Tyr	Tyr	Ala 240	
10	Leu	Asn	Asp	Val	Phe 245	Val	Ser	Lys	Ser	Lys 250	Gly	Phe	Ser	Arg	Ile	Ser 255	
15	Glu	Met	Leu	Gly 260	Ser	Asn	Arg	Asn	Ala 265	Phe	Glu	Asp	Thr	Ser	Val	Leu 270	
20	Thr	Thr	Phe 275	Val	Asp	Asn	His	Asp 280	Asn	Pro	Arg	Phe	Leu	Asn	Ser	Gln 285	
25	Ser	Asp 290	Lys	Ala	Leu	Phe	Lys 295	Asn	Ala	Leu	Thr	Tyr 300	Val	Leu	Leu	Gly	
30	Glu 305	Gly	Ile	Pro	Ile	Val 310	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Glu 315	Gln	Gly	Phe	Ser	Gly 320	
35	Gly	Ala	Asp	Pro	Ala 325	Asn	Arg	Glu	Val	Leu 330	Trp	Thr	Thr	Asn	Tyr	Asp 335	
40	Thr	Ser	Ser	Asp 340	Leu	Tyr	Gln	Phe	Ile 345	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	Val	Arg 350	
45	Met	Lys	Ser 355	Asn	Lys	Ala	Val	Tyr 360	Met	Asp	Ile	Tyr	Val	Gly	Asp	Asn 365	
50	Ala	Tyr 370	Ala	Phe	Lys	His	Gly 375	Asp	Ala	Leu	Val	Val 380	Leu	Asn	Asn	Tyr	
55	Gly 385	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn 390	Gln	Val	Ser	Phe	Ser 395	Val	Ser	Gly	Lys	Phe 400	
60	Asp	Ser	Gly	Ala	Ser 405	Leu	Met	Asp	Ile	Val 410	Ser	Asn	Ile	Thr	Thr	Thr 415	
65	Val	Ser	Ser	Asp 420	Gly	Thr	Val	Thr	Phe 425	Asn	Leu	Lys	Asp	Gly 430	Leu	Pro	

ES 2 729 385 T3

Ala Ile Phe Thr Ser Ala
435

5

<210> 4
<211> 1638
<212> ADN
10 <213> Artificial

<220>
<223> Centro catalítico de R. pusilus + conector y SBD de AMG de A. rolfsii

15

<400> 4
gcaacttcgg atgactggaa aggcaaggcc atttatcagc tgcttacaga tcgatttggc 60

20

cgcgccgatg actcaacaag caactgctct aatttatcca actactgtgg tggtagctac 120

gaaggcatta cgaagcatct tgactacatt tccggtatgg gctttgatgc tatctggata 180

tcgccaattc ccaagaactc ggatggaggc taccacggct actgggctac agatttctac 240

25

caactaaaca gcaactttgg tgatgaatcc cagctcaaag cgctcatcca ggctgccccat 300

gaacgtgaca tgtatgttat gcttgatgtc gtagccaatc atgcaggtcc caccagcaat 360

ggctactcgg gttacacatt cggcgatgca agtttatatc atcctaaatg caccatagat 420

30

tacaatgatc agacgtctat tgagcaatgc tgggttgctg acgagttgcc tgatattgac 480

actgaaaatt ctgacaacgt ggccattctc aacgacatcg tctccggctg ggtgggtaac 540

35

tatagctttg acggcatccg cattgatact gtcaagcata ttcgcaagga cttttggaca 600

ggctacgcag aagctgccgg cgtattcgca actggagagg tcttcaatgg tgatccggcc 660

40

tacgttggac cttatcaaaa gtacctgcca tctctcatca attacccaat gtattacgct 720

ttgaacgacg tctttgtatc caaaagcaaa ggattcagcc gcatcagcga aatgctagga 780

tcaaacgca atgcgtttga ggataccagc gtacttacia cgttttaga caaccatgac 840

45

aatccgcgct tcttgaacag tcaaagcgac aaggctctct tcaagaacgc tctcacatac 900

gtactgctag gtgaaggcat cccaattgtg tattatgggt ctgagcaagg tttcagcggc 960

50

ggagcggatc ctgctaaccg tgaagtgctg tggaccacca attatgatac atccagcgat 1020

ctctaccaat ttatcaagac agtcaacagt gtccgcatga aaagcaacia ggccgtctac 1080

atggatattt atgttggcga caatgcttac gccttcaagc acggcgatgc tttggttgtt 1140

ES 2 729 385 T3

```

ctcaataact atggatcagg ttccacaaac caagtcagct tcagcgttag tggcaagttc      1200
gatagcggcg caagcctcat ggatattgtc agtaacatta ccaccacggt gtcctcggat      1260
5  ggaacagtca ctttcaacct taaagatgga cttccggcta tcttcacctc tgctgggtgct      1320
acaagcccgg gtggctcctc gggtagtgtc gaggtcactt tcgacgttta cgctaccaca      1380
10 gtatatggcc agaacatcta tatcaccggt gatgtgagtg agctcggcaa ctggacaccc      1440
gccaatggtg ttgactctc ttctgctaac taccacacct ggagtgccac gatcgcctctc      1500
cccgtgaca cgacaatcca gtacaagtat gtcaacattg acggcagcac cgtcactctgg      1560
15 gaggatgcta tcagcaatcg cgagatcacg acgcccgcga gcggcacata caccgaaaaa      1620
gacacttggg atgaatct                                                    1638

20
<210> 5
<211> 546
<212> PRT
<213> Artificial
25
<220>
<223> Centro de GH13 de Rhizomucor pusillus más conector y SBD de AMG de
A. rolfsii
30 <400> 5

Ala Thr Ser Asp Asp Trp Lys Gly Lys Ala Ile Tyr Gln Leu Leu Thr
1          5          10          15

35
Asp Arg Phe Gly Arg Ala Asp Asp Ser Thr Ser Asn Cys Ser Asn Leu
          20          25          30

40
Ser Asn Tyr Cys Gly Gly Thr Tyr Glu Gly Ile Thr Lys His Leu Asp
          35          40          45

45
Tyr Ile Ser Gly Met Gly Phe Asp Ala Ile Trp Ile Ser Pro Ile Pro
          50          55          60

Lys Asn Ser Asp Gly Gly Tyr His Gly Tyr Trp Ala Thr Asp Phe Tyr
65          70          75          80

50
Gln Leu Asn Ser Asn Phe Gly Asp Glu Ser Gln Leu Lys Ala Leu Ile
          85          90          95

```

ES 2 729 385 T3

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

ES 2 729 385 T3

Glu Gly Ile Pro Ile Val Tyr Tyr Gly Ser Glu Gln Gly Phe Ser Gly
 305 310 315 320
 5
 Gly Ala Asp Pro Ala Asn Arg Glu Val Leu Trp Thr Thr Asn Tyr Asp
 325 330 335
 10
 Thr Ser Ser Asp Leu Tyr Gln Phe Ile Lys Thr Val Asn Ser Val Arg
 340 345 350
 15
 Met Lys Ser Asn Lys Ala Val Tyr Met Asp Ile Tyr Val Gly Asp Asn
 355 360 365
 20
 Ala Tyr Ala Phe Lys His Gly Asp Ala Leu Val Val Leu Asn Asn Tyr
 370 375 380
 25
 Gly Ser Gly Ser Thr Asn Gln Val Ser Phe Ser Val Ser Gly Lys Phe
 385 390 395 400
 30
 Asp Ser Gly Ala Ser Leu Met Asp Ile Val Ser Asn Ile Thr Thr Thr
 405 410 415
 35
 Val Ser Ser Asp Gly Thr Val Thr Phe Asn Leu Lys Asp Gly Leu Pro
 420 425 430
 40
 Ala Ile Phe Thr Ser Ala Gly Ala Thr Ser Pro Gly Gly Ser Ser Gly
 435 440 445
 45
 Ser Val Glu Val Thr Phe Asp Val Tyr Ala Thr Thr Val Tyr Gly Gln
 450 455 460
 50
 Asn Ile Tyr Ile Thr Gly Asp Val Ser Glu Leu Gly Asn Trp Thr Pro
 465 470 475 480
 55
 Ala Asn Gly Val Ala Leu Ser Ser Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ala
 485 490 495
 60
 Thr Ile Ala Leu Pro Ala Asp Thr Thr Ile Gln Tyr Lys Tyr Val Asn
 500 505 510

ES 2 729 385 T3

Ile Asp Gly Ser Thr Val Ile Trp Glu Asp Ala Ile Ser Asn Arg Glu
 515 520 525

5 Ile Thr Thr Pro Ala Ser Gly Thr Tyr Thr Glu Lys Asp Thr Trp Asp
 530 535 540

10 Glu Ser
 545

<210> 6
 <211> 1749
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Centro catalítico de R. pusilus + conector y SBD de AMG de A. niger

20 <400> 6
 gcgacgtcgg acgattggaa gggtaaggcc atttaccagt tgctcacgga ccgattcggg 60
 cgcgagatg actcgacctc gaactgttcg aacctctcga actactgtgg tggcaacttac 120
 25 gagggcatca ctaaacaatct cgactacatc tccgggatgg gcttcgatgc aatttggatt 180
 tcgccgatcc ctaagaactc ggacggtgga taccacggtt actggggccac agacttctat 240
 30 cagctcaact cgaacttcgg cgacgagtcg cagttgaaag cgctcatcca ggcggcccat 300
 gagcgggaca tgtatgtcat gctcgatgtg gtggcaaacc acgccggccc gacttcgaac 360
 ggatactcgg gttacacttt cgggtgatgcc tccctctacc atccgaaatg taccatcgat 420
 35 tacaacgatc agacatcgat cgaacagtgt tgggtcgcgg atgagttgcc cgatatcgac 480
 accgaaaact cggacaacgt cgcaatcctc aacgacatcg tctccggctg ggtgggtaac 540
 40 tactcgttcg atggtattcg gatcgacacc gtcaagcaca tccgcaagga cttctggaca 600
 ggttacgccg aagccgcggg tgtgttcgcg accggagagg tgttcaacgg agaccccgca 660
 tacgtgggac cctatcagaa atacttgctt tccctcatca actatcccat gtactacgcc 720
 45 ctcaacgacg tcttcgtctc gaagtcgaag ggtttctcca ggatttccga gatggtgggc 780
 tcgaaccgta acgccttcga agatacttcc gtcctcacca cgttcgtgga caaccacgac 840
 50 aaccctcgat tcttgaactc ccagtcggac aaagccctct tcaagaacgc gctcacatac 900
 gtggtgctcg gcgaaggaat ccccatcgtc tactatggat cggaacaggg cttctcgggc 960

ES 2 729 385 T3

ggtgcagacc ctgccaaccg agaagtcctc tggactacga actacgacac gtcgctcggat 1020
 ctctaccagt tcatcaagac cgtcaactcg gtgcgtatga agtcgaacaa ggcggtgtac 1080
 5 atggacattt acgtggggcga taacgcgtat gcattcaagc atggagacgc cttggtggtc 1140
 ctcaacaact acggctcggg ttcgaccaac caggtgtcct tctcgggtgtc gggaaagttc 1200
 gactccggcg cctccctcat ggatatcgtg tccaacatca caactactgt ctccctcggat 1260
 10 ggcacagtca ctttcaactt gaaggatggc ctcccggcga ttttcacctc cgcaactggc 1320
 ggcaccacta cgacgggtac ccccactggc tccggcagcg tgacctcgac cagcaagacc 1380
 15 accgcgactg ccagcaagac cagcaccagt acgtcatcaa cctcctgtac cactcccacc 1440
 gccgtggctg tgactttcga tctgacagct accaccacct acggcgagaa catctacctg 1500
 gtcggatcga tctctcagct gggtgactgg gaaaccagcg acggcatagc tctgagtgtc 1560
 20 gacaagtaca cttccagcga cccgctctgg tatgtcactg tgactctgcc ggctggtgag 1620
 tcgtttgagt acaagtttat ccgcattgag agcgatgact ccgtggagtg ggagagtgat 1680
 25 cccaaccgag aatacacctg tcctcaggcg tgcggaacgt cgaccgagac ggtgactgac 1740
 acctggcgg 1749

30 <210> 7
 <211> 583
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Centro de GH13 de Rhizomucor pusillus más conector y SBD de AMG de A. niger

40 <400> 7

Ala Thr Ser Asp Asp Trp Lys Gly Lys Ala Ile Tyr Gln Leu Leu Thr
 1 5 10 15

45 Asp Arg Phe Gly Arg Ala Asp Asp Ser Thr Ser Asn Cys Ser Asn Leu
 20 25 30

50 Ser Asn Tyr Cys Gly Gly Thr Tyr Glu Gly Ile Thr Lys His Leu Asp
 35 40 45

Tyr Ile Ser Gly Met Gly Phe Asp Ala Ile Trp Ile Ser Pro Ile Pro

ES 2 729 385 T3

	50		55		60												
5	Lys 65	Asn	Ser	Asp	Gly	Gly	Tyr	His	Gly	Tyr	Trp	Ala	Thr	Asp	Phe	Tyr	80
						70					75						
10	Gln	Leu	Asn	Ser	Asn	Phe	Gly	Asp	Glu	Ser	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Ile	95
					85					90							
15	Gln	Ala	Ala	His	Glu	Arg	Asp	Met	Tyr	Val	Met	Leu	Asp	Val	Val	Ala	
				100					105					110			
20	Asn	His	Ala	Gly	Pro	Thr	Ser	Asn	Gly	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Gly	
			115					120					125				
25	Asp	Ala	Ser	Leu	Tyr	His	Pro	Lys	Cys	Thr	Ile	Asp	Tyr	Asn	Asp	Gln	
	130						135					140					
30	Thr	Ser	Ile	Glu	Gln	Cys	Trp	Val	Ala	Asp	Glu	Leu	Pro	Asp	Ile	Asp	
	145					150					155					160	
35	Thr	Glu	Asn	Ser	Asp	Asn	Val	Ala	Ile	Leu	Asn	Asp	Ile	Val	Ser	Gly	
				165						170					175		
40	Trp	Val	Gly	Asn	Tyr	Ser	Phe	Asp	Gly	Ile	Arg	Ile	Asp	Thr	Val	Lys	
			180						185					190			
45	His	Ile	Arg	Lys	Asp	Phe	Trp	Thr	Gly	Tyr	Ala	Glu	Ala	Ala	Gly	Val	
			195					200					205				
50	Phe	Ala	Thr	Gly	Glu	Val	Phe	Asn	Gly	Asp	Pro	Ala	Tyr	Val	Gly	Pro	
	210						215					220					
55	Tyr	Gln	Lys	Tyr	Leu	Pro	Ser	Leu	Ile	Asn	Tyr	Pro	Met	Tyr	Tyr	Ala	
	225					230					235					240	
60	Leu	Asn	Asp	Val	Phe	Val	Ser	Lys	Ser	Lys	Gly	Phe	Ser	Arg	Ile	Ser	
				245						250					255		
65	Glu	Met	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Asn	Ala	Phe	Glu	Asp	Thr	Ser	Val	Leu	
			260						265					270			

ES 2 729 385 T3

Thr Thr Phe Val Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Phe Leu Asn Ser Gln
 275 280 285
 5
 Ser Asp Lys Ala Leu Phe Lys Asn Ala Leu Thr Tyr Val Leu Leu Gly
 290 295 300
 10
 Glu Gly Ile Pro Ile Val Tyr Tyr Gly Ser Glu Gln Gly Phe Ser Gly
 305 310 315 320
 15
 Gly Ala Asp Pro Ala Asn Arg Glu Val Leu Trp Thr Thr Asn Tyr Asp
 325 330 335
 20
 Thr Ser Ser Asp Leu Tyr Gln Phe Ile Lys Thr Val Asn Ser Val Arg
 340 345 350
 25
 Met Lys Ser Asn Lys Ala Val Tyr Met Asp Ile Tyr Val Gly Asp Asn
 355 360 365
 30
 Ala Tyr Ala Phe Lys His Gly Asp Ala Leu Val Val Leu Asn Asn Tyr
 370 375 380
 35
 Gly Ser Gly Ser Thr Asn Gln Val Ser Phe Ser Val Ser Gly Lys Phe
 385 390 395 400
 40
 Asp Ser Gly Ala Ser Leu Met Asp Ile Val Ser Asn Ile Thr Thr Thr
 405 410 415
 45
 Val Ser Ser Asp Gly Thr Val Thr Phe Asn Leu Lys Asp Gly Leu Pro
 420 425 430
 50
 Ala Ile Phe Thr Ser Ala Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro
 435 440 445
 Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala
 450 455 460
 Ser Lys Thr Ser Thr Ser Thr Ser Ser Thr Ser Cys Thr Thr Pro Thr
 465 470 475 480

ES 2 729 385 T3

Ala Val Ala Val Thr Phe Asp Leu Thr Ala Thr Thr Thr Tyr Gly Glu
 485 490 495

5 Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser Ile Ser Gln Leu Gly Asp Trp Glu Thr
 500 505 510

10 Ser Asp Gly Ile Ala Leu Ser Ala Asp Lys Tyr Thr Ser Ser Asp Pro
 515 520 525

15 Leu Trp Tyr Val Thr Val Thr Leu Pro Ala Gly Glu Ser Phe Glu Tyr
 530 535 540

Lys Phe Ile Arg Ile Glu Ser Asp Asp Ser Val Glu Trp Glu Ser Asp
 545 550 555 560

20 Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val Pro Gln Ala Cys Gly Thr Ser Thr Ala
 565 570 575

25 Thr Val Thr Asp Thr Trp Arg
 580

30 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Pachykytospora papayracea*

35 <400> 8
 Gly Asn Ala Gly Pro Ser
 1 5

40 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Trametes cingulata*

45 <400> 9
 Gly Ser Gly Gly Ala Gly Thr
 1 5

50 <210> 10
 <211> 11

ES 2 729 385 T3

<212> PRT
 <213> *Leucopaxillus giganteus*

<400> 10

5 Gly Gly Gly Ser Asn Pro Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10

10 <210> 11
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> *Trichophaea saccata*

15 <400> 11

Gly Thr Gly Ser Ser Thr Thr Ser Ser Thr Ser Ala Thr Ser Thr Thr
 1 5 10 15

20 Lys Ser Ser Thr Thr Ser Thr Ser Thr Ala Thr Ser Thr Ser Val Ala
 20 25 30

25 Thr Ser Ser
 35

30 <210> 12
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Subulispora provurvata*

<400> 12

35 Gly Gly Ser Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ser Thr Ala Gly Thr
 1 5 10 15

40 Ser Pro Thr Ser Thr Ala Cys Ser Ser
 20 25

45 <210> 13
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Valsaria rubricosa*

<400> 13

50 Thr Thr Thr Lys Thr Ser Thr Ser Thr Ala Ser Cys Ala Ala Thr
 1 5 10 15

ES 2 729 385 T3

<210> 14
 <211> 26
 <212> PRT
 5 <213> Acremonium sp

 <400> 14

 Thr Ser Thr Ala Leu Pro Thr Ser Ser Leu Thr Ala Ala Ser Ala Thr
 10 1 5 10 15

 Thr Thr Ala Ser Ala Cys Ser Leu Ser Ala
 15 20 25

 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 20 <213> Meripilus giganteus

 <400> 15

 Ala Thr Pro Thr Ser Ala Pro Ser Thr Thr Pro Thr Ser Gly Thr
 25 1 5 10 15

 <210> 16
 <211> 3
 30 <212> PRT
 <213> Bacillus flavothermus

 <400> 16

 35 Asn Ala Thr
 1

 <210> 17
 40 <211> 62
 <212> PRT
 <213> Bacillus flavothermus

 <400> 17
 45
 Thr Glu Lys Leu Ala Gly Ser Lys Ile Cys Ser Gly Ser Gly Asn Thr
 1 5 10 15

 50 Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ser Thr Ser Lys Ala Thr Thr Ser
 20 25 30

ES 2 729 385 T3

Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr Ser Ser Ser Cys Thr Ala
 35 40 45

5 Thr Ser Thr Thr Leu Pro Ile Thr Phe Glu Glu Leu Val Thr
 50 55 60

<210> 18
 10 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Bacillus flavothermus

<400> 18
 15 Thr Glu Lys Leu Ala Gly Ser Lys Ile Cys Ser Thr Tyr Thr Thr Ala
 1 5 10 15

20 Ser Pro Pro Pro Gly Gly Cys Ser Ala Gly Thr Val Val Phe Asp Val
 20 25 30

Tyr Val Gln
 25 35

<210> 19
 <211> 11
 30 <212> PRT
 <213> Athelia rolfsii

<400> 19
 35 Gly Ala Thr Ser Pro Gly Gly Ser Ser Gly Ser
 1 5 10

<210> 20
 40 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Aspergillus kawachii

<400> 20
 45 Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Ala Thr Ser Thr Ser Lys Ala Thr
 1 5 10 15

50 Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr Ser Ser Ser
 20 25 30

ES 2 729 385 T3

<210> 21
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus niger*
 5
 <400> 21

 Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro Thr Gly Ser Gly Ser Val
 1 5 10 15

 Thr Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala Ser Lys Thr Ser Thr Ser
 20 25 30

 15
 Thr Ser Ser Thr Ser
 35

 20
 <210> 22
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Coniochaeta sp*

 25
 <400> 22

 Thr Thr Thr Thr Ala Thr Thr Lys Thr Ser Thr Thr Leu Thr Thr Ser
 1 5 10 15

 30
 Thr Thr Thr Thr Ser Thr Lys Thr Ser Ser Ser Cys Thr Ala Thr Ala
 20 25 30

 35
 <210> 23
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> *Coniochaeta sp*

 40
 <400> 23

 Thr Thr Ser Thr Ser Thr Gly Thr Ser Ser Thr Thr Arg Thr Gly Thr
 1 5 10 15

 45
 Thr Leu Thr Thr Ser Thr Lys Thr Thr Ala Ser Thr Thr Thr Thr Lys
 20 25 30

 50
 Ser Ser Ser Ser Cys Thr Ala Thr Ala
 35 40

ES 2 729 385 T3

<210> 24
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trametes corrugata
 5
 <400> 24

 Thr Thr Thr Ala Ser Ala Cys Pro Thr Ser
 1 5 10
 10

 <210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Valsario spartii
 15
 <400> 25

 Thr Thr Ser Pro Thr Ala Gly Cys Pro Ser Thr
 1 5 10
 20

 <210> 26
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Penicillium sp
 25
 <400> 26

 Thr Thr Thr Thr Ser Ser Thr Ala Ser Thr Ser Thr Thr Thr Ser Thr
 1 5 10 15
 30

 Thr Leu Lys Thr Thr Thr Thr Thr Ser Thr Thr Ser Lys Thr Thr Thr
 20 25 30
 35

 Ser Thr Thr Ser Thr Ser Cys Thr Gln Ala Thr Ala
 35 40
 40

 <210> 27
 <211> 102
 <212> PRT
 <213> Trichopheraea saccata
 45
 <400> 27

 Gln Asn Thr Lys Arg Ser Thr Gln Val Ser Leu Ile Ser Tyr Thr Phe
 1 5 10 15
 50

 Ser Asn Asn Ile Leu Ser Gly Ser Ile Ser Ile Gln Asn Ile Ala Tyr

ES 2 729 385 T3

20 25 30

5 Ala Lys Thr Val Ser Val Thr Tyr Ala Ile Gly Ser Ser Trp Ser Ser
35 40 45

10 Ser Gln Val Ile Ser Ala Ala Tyr Ser Thr Gly Pro Asp Ser Thr Gly
50 55 60

15 Tyr Glu Val Trp Thr Phe Ser Gly Thr Ala Thr Gly Ala Thr Gln Phe
65 70 75 80

20 Tyr Ile Ala Tyr Thr Val Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Asp Pro Gly Asn
85 90 95

25 Gly Ile Asn Tyr Thr Ile
100

<210> 28
<211> 94
<212> PRT
<213> *Pachykytospora papayracea*

30 <400> 28

35 Val Lys Val Thr Phe Asn Val Gln Ala Thr Thr Thr Phe Gly Glu Asn
1 5 10 15

40 Ile Tyr Ile Thr Gly Asn Thr Ala Ala Leu Gln Asn Trp Ser Pro Asp
20 25 30

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

50 Leu Asp Leu Pro Ala Asn Thr Val Val Glu Tyr Lys Tyr Ile Arg Lys
50 55 60

55 Phe Asn Gly Gln Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Asn Ser Ile Thr
65 70 75 80

60 Thr Pro Ala Asp Gly Thr Phe Thr Gln Asn Asp Thr Trp Arg
85 90

ES 2 729 385 T3

<210> 29
 <211> 94
 <212> PRT
 5 <213> Trametes cingulata

 <400> 29

 Val Ala Val Thr Phe Asn Val Gln Ala Thr Thr Val Phe Gly Glu Asn
 10 1 5 10 15

 Ile Tyr Ile Thr Gly Ser Val Pro Ala Leu Gln Asn Trp Ser Pro Asp
 15 20 25 30

 Asn Ala Leu Ile Leu Ser Ala Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ile Thr
 20 35 40 45

 Val Asn Leu Pro Ala Ser Thr Thr Ile Glu Tyr Lys Tyr Ile Arg Lys
 50 55 60

 Phe Asn Gly Ala Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Asn Ser Ile Thr
 25 65 70 75 80

 Thr Pro Ala Ser Gly Thr Phe Thr Gln Asn Asp Thr Trp Arg
 30 85 90

 <210> 30
 <211> 94
 35 <212> PRT
 <213> Leucopaxillus gigantus

 <400> 30

 Val Ser Val Thr Phe Asn Val Gln Ala Thr Thr Thr Phe Gly Glu Asn
 40 1 5 10 15

 Ile Phe Leu Thr Gly Ser Ile Asn Glu Leu Ala Asn Trp Ser Pro Asp
 45 20 25 30

 Asn Ala Leu Ala Leu Ser Ala Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ser Thr
 50 35 40 45

 Val Asn Val Pro Ala Ser Thr Thr Ile Gln Tyr Lys Phe Ile Arg Lys
 50 55 60

ES 2 729 385 T3

5 Phe Asn Gly Ala Ile Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Gln Ile Thr
 65 70 75 80
 Thr Pro Ser Ser Gly Ser Phe Val Gln Asn Asp Ser Trp Lys
 85 90
 10 <210> 31
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Subulispora provurvata
 15 <400> 31
 Val Pro Val Thr Phe Arg Glu Thr Val Thr Thr Thr Val Gly Gln Thr
 1 5 10 15
 20 Ile Lys Ile Ser Gly Asp Val Ser Ala Leu Gly Asn Trp Asp Thr Asp
 20 25 30
 25 Asp Ala Val Ala Leu Ser Ala Ala Ser Tyr Thr Ser Ser Asn Pro Val
 35 35 40 45
 30 Trp Asp Val Thr Val Ser Phe Ala Pro Gly Thr Val Ile Glu Tyr Lys
 50 55 60
 35 Tyr Ile Asn Val Ala Ser Gly Gly Ala Val Thr Trp Glu Ala Asp Pro
 65 70 75 80
 40 Asn His Thr Tyr Thr Val Pro Ser Ser Cys Ala Thr Ala Val Val Ser
 85 90 95
 45 Asn Thr Trp Gln Thr
 100
 50 <210> 32
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Valsaria rubricosa
 <400> 32
 Val Ala Val Thr Phe Asn Glu Leu Val Thr Thr Asn Tyr Gly Asp Thr

ES 2 729 385 T3

Asn Arg Val Tyr Thr Val Pro Cys Ala Thr Ala Thr Val Ser Ser Thr
85 90 95

5
Trp Arg

10 <210> 34
<211> 95
<212> PRT
<213> Meripilus giganteus

15 <400> 34
Val Ser Met Thr Phe Ala Glu Gln Ala Thr Thr Thr Phe Gly Glu Asn
1 5 10 15

20 Ile Phe Leu Val Gly Ser Ile Ser Gln Leu Gly Asn Trp Asn Pro Ala
20 25 30

25 Ser Ala Ile Ala Leu Ser Ser Ala Ala Tyr Pro Thr Trp Ser Val Ser
35 40 45

30 Val Asn Ile Pro Ala Gly Thr Thr Phe Gln Tyr Lys Phe Ile Arg Lys
50 55 60

35 Glu Thr Asp Gly Ser Val Val Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Gln Ala
65 70 75 80

40 Thr Ala Pro Ala Ser Gly Thr Thr Thr Leu Thr Ser Ser Trp Arg
85 90 95

45
<210> 35
<211> 87
<212> PRT
<213> Bacillus flavothermus

50 <400> 35
Thr Val Trp Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn Ile Ser Gln Leu
1 5 10 15

Gly Asn Trp Asp Pro Val His Ala Val Gln Met Thr Pro Ser Ser Tyr
20 25 30

ES 2 729 385 T3

5 Pro Thr Trp Thr Val Thr Ile Pro Leu Leu Gln Gly Gln Asn Ile Gln
 35 40 45
 Phe Lys Phe Ile Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val Ile Trp Glu Asp
 50 55 60
 10 Ile Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ala Ala Ser Gly Ala Tyr
 65 70 75 80
 15 Thr Ala Ser Trp Asn Val Pro
 85
 <210> 36
 20 <211> 97
 <212> PRT
 <213> Athelia rolfsii
 <400> 36
 25 Val Glu Val Thr Phe Asp Val Tyr Ala Thr Thr Val Tyr Gly Gln Asn
 1 5 10 15
 30 Ile Tyr Ile Thr Gly Asp Val Ser Glu Leu Gly Asn Trp Thr Pro Ala
 20 25 30
 35 Asn Gly Val Ala Leu Ser Ser Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ala Thr
 35 40 45
 40 Ile Ala Leu Pro Ala Asp Thr Thr Ile Gln Tyr Lys Tyr Val Asn Ile
 50 55 60
 Asp Gly Ser Thr Val Ile Trp Glu Asp Ala Ile Ser Asn Arg Glu Ile
 65 70 75 80
 45 Thr Thr Pro Ala Ser Gly Thr Tyr Thr Glu Lys Asp Thr Trp Asp Glu
 85 90 95
 50 Ser

ES 2 729 385 T3

<210> 37
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus kawachii*
 5
 <400> 37

 Cys Thr Ala Thr Ser Thr Thr Leu Pro Ile Thr Phe Glu Glu Leu Val
 1 5 10 15
 10
 Thr Thr Thr Tyr Gly Glu Glu Val Tyr Leu Ser Gly Ser Ile Ser Gln
 20 25 30
 15
 Leu Gly Glu Trp Asp Thr Ser Asp Ala Val Lys Leu Ser Ala Asp Asp
 35 40 45
 20
 Tyr Thr Ser Ser Asn Pro Glu Trp Ser Val Thr Val Ser Leu Pro Val
 50 55 60
 25
 Gly Thr Thr Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Lys Val Asp Glu Gly Gly Ser
 65 70 75 80
 30
 Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val Pro Glu Cys
 85 90 95
 35
 Gly Asn Gly Ser Gly Glu Thr Val Val Asp Thr Trp Arg
 100 105
 40
 <210> 38
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus niger*
 45
 <400> 38

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

ES 2 729 385 T3

Thr Ser Ser Asp Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Thr Leu Pro Ala Gly
 50 55 60
 5
 Glu Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Arg Ile Glu Ser Asp Asp Ser Val
 65 70 75 80
 10
 Glu Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val Pro Gln Ala Cys
 85 90 95
 15
 Gly Thr Ser Thr Ala Thr Val Thr Asp Thr Trp Arg
 100 105
 <210> 39
 <211> 99
 20 <212> PRT
 <213> Coniochaeta sp
 <400> 39
 25 Val Ala Ile Thr Phe Asn Glu Leu Val Ser Thr Ser Tyr Gly Asp Thr
 1 5 10 15
 30 Val Lys Leu Thr Gly Asn Ile Thr Ala Leu Gly Ser Trp Asn Thr Ala
 20 25 30
 35 Asn Ala Val Ser Leu Ser Ala Ser Gln Tyr Thr Ser Gly Ser Pro Leu
 35 40 45
 40 Trp Ser Gly Thr Val Ser Leu Pro Pro Gly Val Gly Val Gln Tyr Lys
 50 55 60
 40 Phe Val Arg Val Gly Ser Ser Gly Ser Val Thr Trp Glu Ala Asp Pro
 65 70 75 80
 45 Asn His Thr Tyr Ser Val Pro Cys Ala Ala Ala Thr Val Gly Gly Ser
 85 90 95
 50 Trp Gln Ser
 <210> 40

ES 2 729 385 T3

<211> 128
 <212> PRT
 <213> Zea mays

5 <400> 40

Val Arg Val Arg Phe Val Leu Lys Arg Gln Cys Thr Phe Gly Gln Ser
 1 5 10 15

10

Val Cys Leu Val Gly Asp Asp Pro Ala Leu Gly Leu Trp Asp Leu Ser
 20 25 30

15

Asn Ala Phe Pro Leu Lys Trp Ala Glu Ser His Asp Trp Thr Leu Glu
 35 40 45

20

Lys Asp Leu Pro Ala Asn Lys Leu Ile Glu Phe Lys Phe Leu Leu Gln
 50 55 60

25

Asp Ser Thr Gly Lys Leu His Trp Gln Gly Gly Pro Asn Arg Ser Phe
 65 70 75 80

Gln Thr Gly Glu Thr Ala Ala Asn Thr Leu Val Val Phe Glu Asp Trp
 85 90 95

30

Gly Asp Val Lys Asn Gln Lys Ile Val Glu Glu Gly Gly Val Ala Ser
 100 105 110

35

Ala Gly Ile Glu Gln Thr Val Val Ser Asn Asp Ser Glu Ser Arg Lys
 115 120 125

40

<210> 41
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Coniochaeta sp

45

Val Ala Ile Thr Phe Asn Glu Leu Val Ser Thr Ala Tyr Gly Asp Thr
 1 5 10 15

50

Ile Lys Leu Ser Gly Asn Ile Thr Ala Leu Gly Ser Trp Asn Ala Ala
 20 25 30

ES 2 729 385 T3

Asn Ala Val Ser Leu Ser Ala Ser Gly Tyr Thr Ala Ala Asn Pro Leu
 35 40 45

5 Trp Ser Gly Thr Val Asn Leu Ala Pro Gly Thr Gly Val Gln Tyr Lys
 50 55 60

10 Phe Val Lys Val Gly Ser Ser Gly Ser Val Thr Trp Glu Ala Asp Pro
 65 70 75 80

Asn His Thr Tyr Ala Val Pro Cys Ala Gly Ala Thr Val Ser Gly Ser
 85 90 95

15 Trp Gln Ser

20 <210> 42
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Trametes corrugata

25 <400> 42

30 Val Ala Val Ser Phe Thr His Ser Ile Thr Thr Val Pro Gly Asp Thr
 1 5 10 15

Ile Lys Ile Ala Gly Asn Thr Thr Gln Leu Gly Ser Trp Thr Val Ala
 20 25 30

35 Ser Ala Pro Ala Leu Ser Ala Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Asn Pro Val
 35 40 45

40 Trp Thr Ile Thr Leu Ser Met Pro Ala Lys Gln Ala Val Gln Tyr Lys
 50 55 60

45 Phe Val Lys Val Ala Ser Gly Gly Ala Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro
 65 70 75 80

Asn Arg Ser Tyr Ser Val Pro Ala Cys Gln Ala Ser Ala Ala Val Ser
 85 90 95

50 Ser Ser Trp Gln
 100

ES 2 729 385 T3

<210> 43
 <211> 101
 5 <212> PRT
 <213> Valsario spartii

 <400> 43

 10 Val Ser Val Thr Phe Thr Asn Leu Val Thr Thr Gln Val Gly Asp Thr
 1 5 10 15

 15 Ile Lys Val Thr Gly Asn Val Ser Gln Leu Gly Asn Trp Asn Pro Ser
 20 25 30

 20 Ser Ala Pro Ala Leu Ser Ala Thr Gly Tyr Thr Ala Ser Asn Pro Lys
 35 40 45

 Trp Ser Gly Thr Val Lys Leu Pro Ala Gly Ser Thr Val Gln Tyr Lys
 50 55 60

 25 Phe Val Lys Val Ala Ser Gly Gly Gly Ala Val Thr Trp Glu Ser Asp
 65 70 75 80

 30 Pro Asn Arg Ser Tyr Ser Val Pro Ser Cys Gln Ala Ser Ala Thr Val
 85 90 95

 35 Asp Ser Ser Trp Lys
 100

 <210> 44
 <211> 103
 40 <212> PRT
 <213> Penicillium sp

 <400> 44

 45 Leu Pro Val Leu Phe Lys Glu Ile Val Thr Thr Ser Tyr Gly Gln Ser
 1 5 10 15

 50 Ile Tyr Ile Ser Gly Ser Ile Ser Gln Leu Gly Ser Trp Asp Thr Ser
 20 25 30

 Ser Ala Val Ala Leu Ser Ala Asp Gln Tyr Thr Ser Ser Ser His Leu

ES 2 729 385 T3

	35	40	45	
5	Trp Tyr Val Val Val Thr Ile Pro Val Gly Thr Ser Phe Gln Tyr Lys			
	50	55	60	
10	Phe Ile Glu Glu Thr Ser Gly Ser Ser Thr Ile Thr Trp Glu Ser Asp			
	65	70	75	80
15	Pro Asn Arg Ser Tyr Thr Val Pro Thr Gly Cys Ala Gly Ser Thr Ala			
		85	90	95
20	Thr Val Thr Ala Thr Trp Arg			
		100		
20	<210> 45			
	<211> 20			
	<212> ADN			
	<213> Artificial			
25	<220>			
	<223> Cebador de PCR			
30	<400> 45			
	taggagttta gtgaacttgc			20
35	<210> 46			
	<211> 18			
	<212> ADN			
	<213> Artificial			
40	<220>			
	<223> Cebador de PCR			
40	<400> 46			
	ttcgagcgtc ccaaaacc			18
45	<210> 47			
	<211> 38			
	<212> ADN			
	<213> Artificial			
50	<220>			
	<223> Cebador de PCR			
	<400> 47			
	cggctatctt cacctctgct actggcggca ccactacg			38

<210> 48
<211> 47
5 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
10 <223> Cebador de PCR

<400> 48
ctaattacat gatgcggccc gcggccgcct accgccaggt gtcagtc 47

REIVINDICACIONES

1. Variante de alfa-amilasa o fragmento de la misma que tiene una termoestabilidad mejorada, medida como la actividad de amilasa residual después de la incubación durante 1 hora a 65°C a pH 3,5, en comparación con una alfa-amilasa parental divulgada como SEQ ID NO: 3, que comprende una sustitución en una posición correspondiente a la posición 143, y que comprende además una o más sustituciones en las posiciones correspondientes a las posiciones 128, 141, 192, 20, 76, 123, 136, 142, 165, 219, 224, 265, 383 y 410 del polipéptido de la SEQ ID NO: 3, donde la alfa-amilasa variante o un fragmento de la misma tiene al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia con el polipéptido de la SEQ ID NO: 3, y donde la alfa-amilasa variante o un fragmento de la misma comprende al menos una de las siguientes sustituciones o combinaciones de sustituciones:
- 5
- 10
- 15
- 20
- G128D + D143N; o
 N142D + D143N; o
 Y141W + D143N; o
 Y141W + N142D + D143N; o
 G128D + Y141W + D143N; o
 Y141W + D143N + P219C; o
 Y141W + D143N + K192R; o
 G128D + D143N + K192R; o
 Y141W + D143N + K192R + P219C; o
 G128D + Y141W + D143N + K192R; o
 G128D + Y141W + D143N + K192R + P219C.
2. Variante según la reivindicación 1, donde la variante comprende además un conector y un módulo de unión a carbohidratos.
- 25
3. Variante según la reivindicación 2, donde el módulo de unión a carbohidratos es un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60% de identidad con una secuencia seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 27, la SEQ ID NO: 28, la SEQ ID NO: 29, la SEQ ID NO: 30, la SEQ ID NO: 31, la SEQ ID NO: 32, la SEQ ID NO: 33, la SEQ ID NO: 34, la SEQ ID NO: 35, la SEQ ID NO: 36, la SEQ ID NO: 37, la SEQ ID NO: 38, la SEQ ID NO: 39, la SEQ ID NO: 40, la SEQ ID NO: 41, la SEQ ID NO: 42, la SEQ ID NO: 43 y la SEQ ID NO: 44.
- 30
4. Variante según la reivindicación 3, donde el conector y el CBM son de *Athelia rolfsii*, por ejemplo, la SEQ ID NO: 19 y la SEQ ID NO: 36 o una secuencia con un 60% de identidad con las mismas.
5. Variante según la reivindicación 3, donde el conector y el CBM son de *Aspergillus niger*, por ejemplo, la SEQ ID NO: 21 y la SEQ ID NO: 38 o una secuencia con un 60% de identidad con las mismas.
6. Polinucleótido aislado que codifica la variante según cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
7. Construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido según la reivindicación 6.
- 35
8. Vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 6.
9. Célula huésped que comprende el polinucleótido según la reivindicación 6.
10. Método de producción de una variante de alfa-amilasa, que comprende:
- 40
- a) el cultivo de la célula huésped según la reivindicación 9 bajo condiciones adecuadas para la expresión de la variante; y
 b) la recuperación de la variante.
11. Método para la producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que comprende los pasos de:

- (a) licuefacción de material que contiene almidón usando una variante de alfa-amilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-5;
- (b) sacarificación del material licuado obtenido en el paso (a) usando una glucoamilasa; y
- (c) fermentación del material sacarificado usando un organismo fermentador.

5 12. Método para la producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que comprende:

- (a) la sacarificación de material que contiene almidón con una variante de alfa-amilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y una glucoamilasa a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho material que contiene almidón,
- (b) la fermentación usando un organismo fermentador.

10 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11-12, donde el producto de fermentación es un alcohol, particularmente etanol.

14. Método para la producción de un derivado de almidón modificado enzimáticamente, que comprende el uso de una variante con actividad de alfa-amilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para licuar y/o sacarificar almidón.