



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 294 846**

51 Int. Cl.:  
**C12N 9/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99931029 .5**

86 Fecha de presentación : **09.07.1999**

87 Número de publicación de la solicitud: **1097196**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **09.05.2001**

54 Título: **Variantes de glucoamilasa.**

30 Prioridad: **15.07.1998 WO PCT/DK98/00937**  
**17.12.1998 WO PCT/DK98/01667**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2008**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2008**

73 Titular/es: **Novozymes A/S**  
**Krogshøjvej 36**  
**2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es: **Nielsen, Bjarne, Ronfeldt;**  
**Svendsen, Allan;**  
**Pedersen, Henrik;**  
**Vind, Jesper;**  
**Hendriksen, Hanne, Vang y**  
**Frandsen, Torben, Peter**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 294 846 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Variantes de glucoamilasa.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a variantes de glucoamilasa nuevas (mutantes) de AMG progenitor, en particular con termoestabilidad mejorada adecuada para, p. ej., la conversión de almidón, p. ej., para producir glucosa de almidón. Más específicamente, la presente invención se refiere a variantes de enzima de glucoamilasa y el uso de tales variantes de enzimas.

10 **Antecedentes de la invención**

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

Comercialmente, la enzima glucoamilasa se utiliza para convertir almidón de maíz que ya está parcialmente hidrolizado por una  $\alpha$ -amilasa a glucosa. La glucosa es posteriormente convertida por glucosa isomerasa a una mezcla compuesta casi igualmente de glucosa y fructosa. Esta mezcla, o la mezcla adicional enriquecida con fructosa, es el jarabe de maíz rico en fructosa comúnmente usado comercializado en todas partes del mundo. Este jarabe es el producto que se produce con mayor tonelaje por un proceso enzimático. Las tres enzimas implicadas en la conversión del almidón en fructosa se encuentran entre las enzimas industriales producidas más importantes.

Uno de los principales problemas que existen con el uso comercial de la glucoamilasa en la producción de jarabe de maíz rico en fructosa es la termoestabilidad relativamente baja de la glucoamilasa. La glucoamilasa no es térmicamente tan estable como la  $\alpha$ -amilasa o glucosa isomerasa y es más activa y estable a un pH inferior que la  $\alpha$ -amilasa o la glucosa isomerasa. Por consiguiente, debe ser usada en un recipiente separado a una temperatura y pH inferiores.

La glucoamilasa de *Aspergillus niger* tiene un dominio catalítico (aa 1-440) y de enlace de almidón (aa 509-616) separado por un enlazador largo y altamente O-glicosilado (Svensson *et al.* (1983), Carlsberg Res. Commun. 48, 529-544, 1983 y (1986), Eur. J. Biochem. 154, 497-502). El dominio catalítico (aa 1-471) de glucoamilasa de *A. awamori* var. *X100* adopta un pliegue ( $\alpha \rightarrow \alpha$ )<sub>6</sub> donde seis segmentos del bucle  $\alpha \rightarrow \alpha$  conservados conectan los cilindros externo e interno (Aleshin *et al.* (1992), J. Biol. Chem. 267, 19291-19298). Las estructuras cristalinas de la glucoamilasa en un complejo con 1-deoxinojirimicina (Harris *et al.* (1993), Biochemistry; 32, 1618-1626) y los inhibidores de pseudotetrasacáridos acarbosa y D-gluco-dihidrocarbosa (Aleshin *et al.* (1996), Biochemistry 35, 8319-8328) son además compatibles con los ácidos glutámicos 179 y 400 que actúan generalmente como ácido y base, respectivamente. El papel crucial de estos residuos durante la catálisis también ha sido estudiado usando ingeniería de proteínas (Sierks *et al.* (1990), Protein Engng. 3, 193-198; Frandsen *et al.* (1994), Biochemistry, 33, 13808-13816). Las interacciones glucoamilasa-carbohidratos en cuatro subsitios de enlace de residuos glicosílicos, -1, +1, +2 y +3 son destacadas en las estructuras de los complejos de glucoamilasa (Aleshin *et al.* (1996), Biochemistry 35, 8319-8328) y los residuos importantes para el enlace y la catálisis han sido extensamente investigados usando mutantes dirigidos acoplados con análisis cinético (Sierks *et al.* (1989), Protein Engng. 2, 621-625; Sierks *et al.* (1990), Protein Engng. 3, 193-198; Berland *et al.* (1995), Biochemistry, 34, 10153-10161; Frandsen *et al.* (1995), Biochemistry, 34, 10162-10169).

Se han descrito diferentes sustituciones en la glucoamilasa de *A. niger* para mejorar la termoestabilidad: i) sustitución de glicinas  $\alpha$ -helicoidales: G137A y G139A (Chen *et al.* (1996), Prot. Engng. 9, 499-505); ii) eliminación de los enlaces peptídicos Asp-X frágiles, D257E y D293E/Q (Chen *et al.* (1995), Prot. Engng. 8, 575-582); prevención de desamidación en N182 (Chen *et al.* (1994), Biochem. J. 301, 275-281); iv) ingeniería de enlace de bisulfuro adicional, A246C (Fierobe *et al.* (1996), Biochemistry; 35, 8698-8704; y v) introducción de residuos Pro en la posición A435 y S436 (Li *et al.* (1997), Protein Engng. 10, 1199-1204. Además Clark Ford presentó un ensayo el 17 de octubre de 1997, ENZYME ENGINEERING 14, Beijing/China Oct 12-17, 97 Número de resumen: Libro de resumen p. 0-61. El resumen sugiere mutaciones en las posiciones G137A, N20C/A27C, y S30P en una (no descrita) glucoamilasa de *Aspergillus awamori* para mejorar la termoestabilidad.

Se puede encontrar más información sobre la glucoamilasa en una página de internet (<http://www.public.iastate.edu/~pedro/glase/glase.html>).

La página "Glucoamylase WWW page" (actualizada el 08/10/97) de Pedro M. Coutinho expone informaciones referente a las glucoamilasas, incluyendo glucoamilasas derivables de cepas de *Aspergillus*. Se relacionan las modificaciones químicas y dirigidas al sitio en la glucoamilasa de *Aspergillus niger*.

65 **Descripción breve de la invención**

El objetivo de la presente invención es proveer variantes de glucoamilasa mejoradas con mejor termoestabilidad adecuada para el uso en, p.j., la fase de sacarificación en los procesos de conversión de almidón.

## ES 2 294 846 T3

El término “una variante de glucoamilasa con mejor termoestabilidad” en el contexto de la presente invención significa una variante de glucoamilasa que tiene un  $T_{1/2}$  superior (duración media) que la glucoamilasa progenitora correspondiente. La determinación de  $T_{1/2}$  (Método I y Método II) es descrita abajo en el apartado de “Materiales y Métodos”. La actividad específica es determinada como  $K_{cat}$  o AGU/mg (medido como se describe abajo en el apartado “Materiales y Métodos”).

Los inventores de la presente invención han provisto un número de variantes mejoradas de una glucoamilasa progenitora con mejor termoestabilidad en comparación con la enzima progenitora correspondiente. La termoestabilidad mejorada es obtenida substituyendo posiciones seleccionadas en una glucoamilasa progenitora. Esto se describirá con detalle abajo.

### *Nomenclatura*

En la presente descripción y reivindicaciones, se usan los códigos convencionales de una y tres letras para residuos aminoácidos. Para facilitar la referencia, las variantes de glucoamilasa de la invención son descritas usando la nomenclatura siguiente:

Aminoácido(s) original(es):posición(es):aminoácido(s) sustituido(s)

Según esta nomenclatura, por ejemplo la sustitución de alanina por asparraguina en la posición 30 es mostrada como:

Ala30Asn o A30N

una deleción de alanina en la misma posición es mostrada como:

Ala30\* o A30\*

y la inserción de un residuo aminoácido adicional, tal como lisina, es mostrada como:

Ala30AlaLys o A30AK

Una deleción de una extensión consecutiva de residuos aminoácidos, tales como residuos aminoácidos 30-33, es indicada como (33)\* 30 o (A30-N33).

Cuando una glucoamilasa específica contiene una “deleción” en comparación con otras glucoamilasas y se hace una inserción en esa posición esto es indicado como:

\*36Asp o \*36D

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

Las mutaciones múltiples son separadas por signos de más, es decir:

Ala30Asp + Glu34Ser ó A30N+E34S

representando mutaciones en las posiciones 30 y 34 substituyendo alanina y ácido glutámico por asparraguina y serina, respectivamente.

Una mutación múltiple también puede ser separada como sigue, es decir, significando lo mismo que el signo de más:

Ala30Asp/Glu34Ser o A30N/E34S

Cuando uno o más residuos aminoácidos alternativos pueden ser insertados en una posición esto es indicado como

A30N,E o A30N/E, o A30N o A30E

Además, cuando se identifica una posición adecuada para la modificación sin sugerir una modificación específica, debe entenderse que cualquier residuo aminoácido puede ser substituido por el residuo aminoácido presente en la posición.

## ES 2 294 846 T3

Así, por ejemplo, cuando se menciona una modificación de una alanina en la posición 30, pero no se especifica, debe entenderse que la alanina puede ser eliminada o sustituida por cualquier otro aminoácido, es decir, cualquiera de:

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

5

### Breve descripción del dibujo

La Figura 1 muestra el plásmido pCAMG91 conteniendo el gen de glucoamilasa de *Aspergillus niger* G1.

10

### Descripción detallada de la invención

Un objetivo del trabajo base de la presente invención fue mejorar la termoestabilidad de glucoamilasas particulares que son obtenibles de organismos fúngicos, en particular cepas del género de *Aspergillus* y que ellas mismas han sido seleccionadas en base a sus propiedades adecuadas para la conversión de almidón o fermentación de alcohol.

15

#### *Posiciones y/o regiones de identificación que deben ser mutadas para obtener mejor termoestabilidad*

Las simulaciones de Dinámica Molecular (DM) indican la movilidad de los aminoácidos en la estructura de la proteína (ver McCammon, JA y Harvey SC., (1987), "Dynamics of proteins and nucleic acids". Cambridge University Press.). Tales dinámicas de la proteína son frecuentemente comparadas con los B-factores cristalográficos (ver Stout, GH and Jensen, LH, (1989), "X-ray structure determination", Wiley). Al ejecutar la simulación DM en diferentes estados de protonación de los residuos titulables, se simula la movilidad relacionada con el pH de residuos. Las regiones que tienen la máxima movilidad o flexibilidad (aquí fluctuaciones isotrópicas) son seleccionadas para la mutagénesis aleatoria. Aquí se entiende que la alta movilidad encontrada en áreas determinadas de la proteína, puede ser térmicamente mejorada substituyendo residuos en estos residuos. Las substituciones son dirigidas contra residuos que cambiarán el comportamiento dinámico de los residuos a p. ej. cadenas laterales mayores y/o residuos que tienen capacidad de formar mejores contactos para residuos en el entorno cercano. Se usó el AMG de *Aspergillus niger* para la simulación DM. (En el apartado de Materiales y Métodos abajo se describe cómo llevar a cabo la simulación DM.)

20

25

30

Las regiones encontradas por simulaciones de dinámica molecular (DM) adecuadas para la mutación cuando se quiere obtener mejor i:ermoestabilidad son las siguientes:

35

Región: 1-18,

Región: 19-35,

Región: 73-80,

40

Región: 200-212,

Región: 234-246,

Región: 334-341,

45

Región: 353-374,

Región: 407-411,

50

Región: 445-470,

Las regiones encontradas de interés para aumentar la termoestabilidad son las regiones cercanas al centro activo. Las regiones situadas entre las  $\alpha$ -hélices, y que pueden incluir posiciones en cada lado del N- y C-terminal de las  $\alpha$ -hélices, en el sitio de enlace del sustrato son importantes para la actividad de la enzima. Estas regiones constituyen las regiones siguientes:

55

Región: 40-62,

Región: 93-127,

60

Región: 170-184,

Región: 234-246,

65

Región: 287-319,

Región: 388-414.

## ES 2 294 846 T3

*Rhizopus*, *Talaromyces*, tales como *Talaromyces emersonii* (descrito en WO 99/28448), y *Thielavia* tienen alta actividad específica hacia las maltodextrinas, incluyendo maltosa y maltohepatosa. En consecuencia, las regiones que son de interés especial respecto a (transferir) mayor actividad específica son:

5 Región: 200-212,

Región: 287-300,

10 Región: 305-319.

Los presentes inventores han encontrado que de hecho es posible mejorar la termoestabilidad de una glucoamilasa progenitora modificando uno o más residuos aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la glucoamilasa progenitora. La presente invención se basa en este hallazgo.

15 Por consiguiente, en un primer aspecto la presente invención se refiere a una variante mejorada de una glucoamilasa progenitora comprendiendo una o más mutaciones en las regiones y posiciones descritas con más detalle abajo.

### *Glucoamilasas progenitoras*

20 La glucoamilasa progenitora contemplada según la presente invención incluye glucoamilasas fúngicas, en particular glucoamilasas fúngicas obtenibles de una cepa de *Aspergillus*, tal como un *Aspergillus niger* o glucoamilasas de *Aspergillus awamori* y variantes o mutantes de los mismos, glucoamilasas homólogas y otras glucoamilasas que son estructuralmente y/o funcionalmente similares a la SEC ID NO: 2. Se contemplan específicamente las glucoamilasas de *Aspergillus niger* G1 y G2 descritas en Boel *et al.* (1984), "Glucoamylases G1 and G2 from *Aspergillus niger* are synthesized from two different but closely related mRNAs", EMBO J. 3 (5), p. 1097-1102. La glucoamilasa G2 está descrita en la SEC ID NO: 2. La glucoamilasa G1 está descrita en la SEC ID NO: 13. Otra base principal de AMG contemplada es *Talaromyces emersonii*, especialmente *Talaromyces emersonii* DSM descrito en WO 99/28448 (Novo Nordisk).

30 *Glucoamilasas progenitoras comercialmente disponibles*

Las glucoamilasas progenitoras comercialmente disponibles incluyen AMG de Novo Nordisk, y también glucoamilasa de las compañías Genencor, Inc. EEUU, y Gist-Brocades, Delft, Holanda.

35 *Variantes de glucoamilasa*

La invención se refiere a una variante de una glucoamilasa progenitora comprendiendo una o más mutación(es) en la(s) siguiente(s) posición(es) en la secuencia de aminoácidos mostrada en NO: 2:

40 E408R+A425T+S465P+T494A, E408R-S386N,T2Q+A11 P+S394R, A11E+E408R, T2M+N9A+T390R+D406N+L410R, A393R, T2R+S386R+A393R, A393R+L410R, A1V+L66R+7402F+N427S+S486G, T2E+T379A+S386K+A393R, A1V+L66R+Y402F+N427S+S486G, T2R+S386R+A393R, Y402F, extensión del N-terminal de PLASD + V59A+ A393R+T490A, Y402F+S411V, S119P+Y402F+3411V, S119P+Y312Q+Y402F+T416H, y/o en una posición o región correspondiente en una glucoamilasa homóloga que muestra un grado de identidad de al menos un 60% con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 2.

45 *Homología (identidad)*

50 La homología a la que se hace referencia arriba de la glucoamilasa progenitora es determinada como el grado de identidad entre, dos secuencias proteínicas que indican una derivación de la primera secuencia a partir de la segunda. La homología puede ser determinada apropiadamente mediante programas informáticos conocidos en la técnica tales como GAP proporcionado en el paquete informático GCG (Manual del Programa para el paquete Wisconsin, versión 8; Agosto 1994; Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, p. 443-453). Usando GAP con los ajustes siguientes para comparar las secuencia polipeptídicas: penalización de creación Gap de 3,0 y penalización de extensión Gap de 0,1, la parte madura de un polipéptido codificado por una secuencia de ADN análoga de la invención exhibe un grado de identidad preferiblemente de al menos un 60%, tal como un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, más preferiblemente al menos un 95%, más preferiblemente al menos un 97%, y más preferiblemente al menos un 99% con la parte madura de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 2.

60 Preferiblemente, la glucoamilasa progenitora comprende las secuencias de aminoácidos de la SEC ID NO: 2; o variantes alélicas de las mismas; o fragmentos de las mismas con actividad glucoamilasa.

65 Un fragmento de la SEC ID NO: 2 es un polipéptido que tiene uno o más aminoácidos cancelados del terminal amino y/o carboxilo de esa secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, el AMG G2 (SEC ID NO: 2) es un fragmento de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* G1 (Boel *et al.* (1984), EMBO J. 3 (5), p. 1097-1102) que tiene actividad glucoamilasa. Una variante alélica denota cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo lugar cromosómico. La variación alélica surge naturalmente por mutación, y puede producir polimorfismo dentro de

## ES 2 294 846 T3

poblaciones. Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tengan secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

5 Las secuencias de aminoácidos de glucoamilasas progenitoras homólogas pueden diferir de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 por una inserción o delección de uno o más residuos aminoácidos y/o la sustitución de uno o más residuos aminoácidos por residuos aminoácidos diferentes. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos son de una naturaleza menor, es decir las sustituciones de aminoácido conservadoras que no afectan significativamente el pliegue y/o actividad de la proteína; pequeñas delecciones, normalmente de una a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones de terminales amino o carboxílicos, tales como un residuo de metionina de terminal amino; un pequeño enlace péptido de hasta aproximadamente 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilite la purificación cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de enlace.

15 En otra forma de realización, la glucoamilasa progenitora aislada es codificada por una secuencia de ácidos nucleicos que hibrida bajo condiciones de astringencia muy bajas, preferiblemente condiciones de astringencia bajas, más preferiblemente condiciones de astringencia media, más preferiblemente condiciones de astringencia medio-altas, incluso más preferiblemente condiciones de astringencia altas, y más preferiblemente condiciones de astringencia muy altas con una sonda de ácido nucleico que hibrida según las mismas condiciones con (i) la secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID NO: 1, (ii) la secuencia de ADNc de la SEC ID NO:1, (iii) una subsecuencia de (i) o (ii), o (iv) una cadena complementaria de (i), (ii), o (iii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatus; 1989; Clonación Molecular, Manual de Laboratorio, 2ª Edición, Cold Spring Harbor, Nueva York). La subsecuencia de la SEC ID NO: 1 puede ser de al menos 100 nucleótidos o preferiblemente al menos 200 nucleótidos. Además, la subsecuencia puede codificar un fragmento de polipéptido con actividad glucoamilasa. Los polipéptidos progenitores también pueden ser variantes o fragmentos alélicos de los polipéptidos que tienen actividad glucoamilasa.

Se puede usar la secuencia de ácidos nucleicos de la SEC ID NO: 1 o una subsecuencia de la misma, al igual que la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2, o un fragmento de la misma, para diseñar una sonda de ácido nucleico para identificar y clonar polipéptidos de codificación de ADN con actividad glucoamilasa, de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, las sondas de este tipo pueden ser usadas para la hibridación con el ADN genómico o ADNc del género o especie de interés, según los procedimientos estándares de transferencia de Southern, para identificar y aislar su gen correspondiente. Las sondas de este tipo pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían ser de al menos 15, preferiblemente al menos 25, y más preferiblemente al menos 35 nucleótidos de longitud. También se pueden usar sondas más largas. Se pueden usar sondas de AIJN y ARN. Las sondas son normalmente marcadas para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con 32 P; 3 H; 35S, biotina, o avidina). Tales sondas están contempladas por la presente invención.

Así, una biblioteca de ADN genómico o ADNc obtenida a partir de tales otros organismos puede ser seleccionada para el ADN que hibrida con las sondas anteriormente descritas y que codifica un polipéptido que tiene glucoamilasa. Un ADN genómico u otro de tales otros organismos puede ser separado por electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida u otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado puede ser transferido a e inmovilizado en nitrocelulosa u otro material de soporte adecuado. Para identificar un clon o ADN que sea homólogo a la SEC ID NO: 1, o sus subsecuencias, el material de soporte es usado en una transferencia Southern. Para los objetivos de la presente invención, la hibridación indica que la secuencia de ácidos nucleicos hibrida a una sonda de ácido nucleico correspondiente a la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en la SEC ID NO: 1, su cadena complementaria, o una subsecuencia de la misma, bajo condiciones de astringencia desde muy bajas a muy altas. Las moléculas a las que la sonda de ácido nucleico hibrida bajo estas condiciones son detectadas usando película de rayos X.

Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material de soporte es finalmente lavado tres veces, cada una durante 15 minutos, usando 2 x SSC, 0,2% SDS preferiblemente al menos a 45°C (astringencia muy baja), más preferiblemente al menos a 50°C (astringencia baja), más preferiblemente al menos a 55°C (astringencia media), más preferiblemente al menos a 60°C (astringencia medio-alta), incluso más preferiblemente al menos a 65°C (astringencia alta), y más preferiblemente al menos a 70°C (astringencia muy alta).

Para sondas cortas que son de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia son definidas como prehibridación, hibridación, y post-hibridación con lavado a de 5°C a 10°C por debajo del  $T_m$  calculado usando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962; Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390) en 0,9 M de NaCl; 0,09 M de tris-HCl pH 7,6, 6 M de EDTA, 0,5% NP-40, solución IX Denhardt, 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 según los procedimientos de transferencia de Southern estándares.

Para sondas cortas que son de aproximadamente 15 nucleótidos hasta aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, el material de soporte es lavado una vez en 6x SCC más 0,1% SDS durante 15 minutos y dos veces cada una durante 15 minutos usando 6x SSC a de 5°C a 10°C por debajo del  $T_m$  calculado.

La presente invención también se refiere a secuencias de ácidos nucleicos aisladas producidas por a) hibridación de ADN bajo condiciones de astringencia muy bajas, bajas, medias, medio-altas, altas o muy altas con la secuencia

## ES 2 294 846 T3

de la SEC ID NO:1, o su cadena complementaria, o una subsecuencia de la misma; y (b) aislamiento de la secuencia de ácidos nucleicos. La subsecuencia es preferiblemente una secuencia de al menos 100 nucleótidos tal como una secuencia que codifica un fragmento de polipéptido con actividad glucoamilasa.

5 Las glucoamilasas progenitoras contempladas tienen al menos un 20%, preferiblemente al menos un 40%, más preferiblemente al menos un 60%, incluso más preferiblemente al menos un 80%, incluso más preferiblemente al menos un 90%, y más preferiblemente al menos el 100% de la actividad glucoamilasa del polipéptido maduro de la SEC ID NO: 2.

10 En una forma de realización preferida la variante de la invención tiene mejor termoestabilidad, preferiblemente dentro del intervalo de temperatura de aproximadamente 60-80°C, preferiblemente 63-75°C, preferiblemente a un pH de 4-5, en particular 4,2-4,7, usando maltodextrina como sustrato.

15 En otra forma de realización preferida se usa una variante de la invención para, p. ej., la fermentación de alcohol.

En una forma de realización preferida, la glucoamilasa progenitora es la glucoamilasa de *Aspergillus niger* G1 (Boel *et al.* (1984), EMBO J. 3 (5), p. 1097-1102. La glucoamilasa progenitora puede ser una glucoamilasa truncada, p. ej., la glucoamilasa AMG G2.

20 *Clonación de una secuencia de ADN que codifica una glucoamilasa progenitora*

La secuencia de ADN que codifica una glucoamilasa progenitora puede ser aislada de cualquier célula o microorganismo que produzca la glucoamilasa en cuestión, usando varios métodos bien conocidos en la técnica. En primer lugar se debería construir un ADN genómico y/o biblioteca de ADNc usando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la glucoamilasa que debe ser estudiada. Luego, si se conoce la secuencia de aminoácidos de la glucoamilasa, se puede sintetizar sondas de oligonucleótidos marcadas y usarlas para identificar clones de codificación de glucoamilasa de una genoteca obtenida a partir del organismo en cuestión. Alternativamente se podría utilizar una sonda de oligonucleótidos marcada conteniendo homólogos de secuencias para otro gen de glucoamilasa conocido como una sonda para identificar clones de codificación de glucoamilasa, usando condiciones de hibridación y lavado de astringencia desde muy bajas a muy altas. Esto está descrito arriba.

Aún otro método para identificar clones de codificación de glucoamilasa implicaría insertar fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformar las bacterias glucoamilasa-negativas con la biblioteca de ADN genómico resultante, y luego depositar en placas las bacterias transformadas sobre agar conteniendo un sustrato para glucoamilasa (es decir, maltosa), permitiendo de ese modo identificar los clones que expresan la glucoamilasa.

Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la enzima puede ser preparada sintéticamente por métodos estándares establecidos, p. ej. el método de la fosforamidita descrito por S.L. Beaucage y M.H. Caruthers, (1981), Tetrahedron Letters 22, p. 1859-1869, o el método descrito por Matthes *et al.*, (1984), EMBO J. 3, p. 801-805. En el método de la fosforamidita, los oligonucleótidos son sintetizados, p. ej., en un sintetizador de ADN automático, purificados, anelados, ligados y donados en vectores apropiados.

Finalmente, la secuencia de ADN puede ser de origen mixto genómico y sintético, mixto de origen sintético y ADNc o mixto de origen genómico y ADNc, preparado ligando fragmentos de origen sintético, genómico o ADNc (como sea apropiado, los fragmentos correspondiendo a varias partes de toda la secuencia de ADN), según técnicas estándares. La secuencia de ADN también puede ser preparada por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4,683,202 o R.K. Saiki *et al.*, (1988), Science 239, 1988, pp. 487-491.

50 *Mutagénesis sitio dirigida*

Una vez que una secuencia de ADN de codificación de glucoamilasa ha sido aislada, y los sitios deseables para la mutación identificados, se pueden introducir mutaciones usando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos flanqueando los sitios de mutación deseada. En un método específico, un espacio vacío monocatenario de ADN, la secuencia de codificación de glucoamilasa, es creada en un vector llevando el gen de glucoamilasa. Luego el nucleótido sintético, llevando la mutación deseada, es anelado a una porción homóloga del ADN monocatenario. El espacio restante es luego llenado con ADN polimerasa I (fragmento Klenow) y el constructo es ligado usando ligasa T4. Un ejemplo específico de este método está descrito en Morinaga *et al.*, (1984), Biotechnology 2, p. 646-639. US 4,760,025 expone la introducción de oligonucleótidos de codificación de mutaciones múltiples realizando alteraciones menores del casete. No obstante, se puede introducir una variedad incluso superior de mutaciones en cualquier momento por el Método de Morinaga, ya que se puede introducir una multitud de oligonucleótidos de varias longitudes.

Otro método para introducir mutaciones en secuencias de ADN de codificación de glucoamilasa está descrito en Nelson y Long, (1989), Analytical Biochemistry 180, p. 147-151. Este implica la generación en 3 fases de un fragmento de PCR conteniendo la mutación deseada introducida usando una cadena de ADN químicamente sintetizada como uno de los cebadores en las reacciones PCR. Del fragmento generado por reacción en cadena de polimerasa,

## ES 2 294 846 T3

un fragmento de ADN llevando la mutación puede ser aislado por seccionamiento con endonucleasas de restricción y reinsertado en un plásmido de expresión.

Además, Sierks. *et al.*, (1989), *Protein Eng.*, 2, 621-625; Sierks *et al.*, (1990), *Protein Eng.* vol. 3, 193-198; también describe la mutagénesis dirigida en una glucoamilasa de *Aspergillus*.

### *Mutagénesis aleatoria*

La mutagénesis aleatoria es realizada de manera adecuada bien como mutagénesis aleatoria localizada o específica de la región en al menos tres partes del gen que traduce a la secuencia de aminoácidos mostrada en cuestión, o en todo el gen.

La mutagénesis aleatoria de una secuencia de ADN que codifica una glucoamilasa progenitora puede ser convenientemente realizada usando cualquier método conocido en la técnica.

En relación con lo anterior, otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para generar una variante de una glucoamilasa progenitora donde la variante exhibe una mayor termoestabilidad con respecto a la progenitora, el método comprendiendo:

- (a) someter una secuencia de ADN que codifica la glucoamilasa progenitora a mutagénesis aleatoria,
- (b) expresar la secuencia de ADN mutada obtenida en la fase (a) en una célula huésped, y
- (c) seleccionar las células huéspedes de expresión de una variante de glucoamilasa con una propiedad alterada (es decir termoestabilidad) con respecto a la glucoamilasa progenitora.

La fase (a) del método indicado arriba de la invención es preferiblemente realizado usando cebadores dopados, como se describe en los ejemplos de trabajo (véase abajo).

Por ejemplo, la mutagénesis aleatoria puede ser realizada usando un agente mutagenizante físico o químico adecuado, usando un oligonucleótido adecuado, o sometiendo la secuencia de ADN a mutagénesis generada por PCR. Además, la mutagénesis aleatoria puede ser realizada usando cualquier combinación de estos agentes mutagenizantes. El agente mutagenizante puede, p. ej., ser uno que induzca transiciones, transversiones, inversiones, aleatorizaciones, deleciones, y/o inserciones.

Los ejemplos de un agente mutagenizante físico o químico adecuado para el presente objetivo incluyen irradiación ultravioleta (UV), hidroxilamina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), O-metilhidroxilamina, ácido nitroso, etilmetano sulfonato (EMS), bisulfito de sodio, ácido fórmico, y análogos de nucleótidos. Cuando se usan tales agentes, la mutagénesis es normalmente realizada incubando la secuencia de ADN que codifica la enzima progenitora que debe ser mutagenizada en presencia del agente mutagenizante seleccionado bajo condiciones adecuadas para que ocurra la mutagénesis, y seleccionar el ADN mutado teniendo las propiedades deseadas.

Cuando la mutagénesis es realizada usando un oligonucleótido, el oligonucleótido puede ser dopado o adicionado con los tres nucleótidos no progenitores durante la síntesis del oligonucleótido en las posiciones que deben ser cambiadas. Se puede hacer el dopaje o adición de modo que se eviten los codones para aminoácidos indeseados. El oligonucleótido dopado o adicionado puede ser incorporado en el ADN de codificación de la enzima glucoamilasa por cualquier técnica publicada, usando, p. ej., PCR, LCR o cualquier ADN polimerasa y ligasa que se considere apropiado.

Preferiblemente, el dopaje se realiza usando "dopaje aleatorio constante", donde el porcentaje de tipo salvaje y mutación en cada posición es predefinida. Además, el dopaje puede dirigirse a una preferencia para la introducción de ciertos nucleótidos, y de ese modo una preferencia para la introducción de uno o más residuos aminoácidos específicos. Se puede hacer el dopaje, p. ej., de tal manera que permita la introducción del 90% de tipo salvaje y 10% de mutaciones en cada posición. Una consideración adicional en la elección de un esquema de dopaje se basa en las limitaciones genéticas así como estructurales de la proteína. Se puede hacer el esquema de dopaje usando el programa DOPE que, entre otras cosas, asegura que se evite la introducción de codones de parada.

Cuando se usa la mutagénesis generada por reacción en cadena de polimerasa un gen de codificación de una glucoamilasa progenitora tratado o no tratado químicamente es sometido a PCR bajo condiciones que aumentan la desincorporación de nucleótidos (Deshler 1992; Leung *et al.*, *Technique*, Vol. 1, 1989; págs. 11-15).

Se puede usar una cepa mutágena de *E. coli* (Fowler *et al.*, *Molec. Gen. Genet.*; 133, 1974; págs. 179-191), *S. cerevisiae* o cualquier otro organismo microbiano para la mutagénesis aleatoria del ADN de codificación de la glucoamilasa, p. ej., transformando un plásmido conteniendo la glicosilasa progenitora en la cepa mutágena, haciendo crecer la cepa mutágena con el plásmido y aislando el plásmido mutado de la cepa mutágena. El plásmido mutado puede ser posteriormente transformado en el organismo de expresión.

## ES 2 294 846 T3

La secuencia de ADN que debe ser mutagenizada puede estar convenientemente presente en una biblioteca de ADNc o genómica obtenida a partir de un organismo que exprese la glucoamilasa progenitora. Alternativamente, la secuencia de ADN puede estar presente en un vector adecuado tal como un plásmido o un bacteriófago, que como tal puede ser incubado con o expuesto de otro modo al agente mutagenizante. El ADN que debe ser mutagenizado puede estar también presente en una célula huésped bien estando integrado en el genoma de dicha célula o estando presente en un vector hospedado en la célula. Finalmente, el ADN que debe ser mutagenizado puede estar en forma aislada. Se sobreentiende que la secuencia de ADN que debe ser sometida a mutagénesis aleatoria es preferiblemente una secuencia de ADNc o de ADN genómico.

En algunos casos puede ser conveniente amplificar la secuencia de ADN mutada antes de realizar la fase de expresión b) o la fase de selección c). Tal amplificación puede ser realizada según métodos conocidos en la técnica, el método actualmente preferido es la amplificación generada por reacción en cadena de polimerasa usando cebadores oligonucleótidos preparados en base a la secuencia de ADN o de aminoácidos de la enzima progenitora.

Después de la incubación con o exposición al agente mutagenizante, el ADN mutado es expresado cultivando una célula huésped adecuada llevando la secuencia de ADN bajo condiciones que permitan que ocurra la expresión. La célula huésped usada para este propósito puede ser una que haya sido transformada con la secuencia de ADN mutada, opcionalmente presente en un vector, o una que lleve la secuencia de ADN que codifica la enzima progenitora durante el tratamiento de mutagénesis. Los ejemplos de células huéspedes adecuadas son las siguientes: bacterias gram positivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus Ore vis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagularas*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megsterium*, *Bacillus thuringiensis*, *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; y bacterias gram-negativas tales como *E. coli*.

La secuencia de ADN mutada puede comprender además una secuencia de ADN que codifique las funciones que permitan la expresión de la secuencia de ADN mutada.

### *Mutagénesis aleatoria localizada*

La mutagénesis aleatoria puede ser ventajosamente localizada para una parte de la glucoamilasa progenitora en cuestión. Esta puede, p. ej., ser ventajosa cuando ciertas regiones de la enzima han sido identificadas de particular importancia para una propiedad dada de la enzima, y cuando son modificadas se espera que produzcan una variante con propiedades mejoradas. Las regiones de este tipo pueden normalmente ser identificadas cuando la estructura terciaria de la enzima progenitora ha sido dilucidada y relacionada con la función de la enzima.

La mutagénesis aleatoria localizada o específica de la región es convenientemente realizada usando técnicas de mutagénesis generadas por PCR del modo descrito anteriormente o cualquier otra técnica adecuada conocida en la técnica. Alternativamente, la secuencia de ADN que codifica la parte de la secuencia de ADN que debe ser modificada puede ser aislada, p. ej., por inserción en un vector adecuado, y dicha parte puede ser posteriormente sometida a mutagénesis usando cualquiera de los métodos de mutagénesis mencionados anteriormente.

Métodos alternativo para proveer variantes de la invención incluyen transposición de genes p. ej. como se describe en WO 95/22325 (de Affymax Technologies N.V.) o en WO 96/00343 (de Novo Nordisk NS).

### *Expresión de Variantes de Glucoamilasa*

Según la invención, una secuencia de ADN que codifica la variante producida por los métodos anteriormente descritos, o por cualquier método alternativo conocido en la técnica, puede ser expresada, en forma de enzima, usando un vector de expresión que normalmente incluye secuencias de control que codifican un promotor, operador, sitio de enlace de ribosoma, señal de iniciación de traducción, y, opcionalmente, un gen represor o varios genes activadores.

### *Vector de expresión*

El vector de expresión recombinante que lleva la secuencia de ADN que codifica una variante de glucoamilasa de la invención puede ser cualquier vector que pueda ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector frecuentemente dependerá de la célula huésped en la que debe ser introducido. El vector puede ser uno que, cuando es introducido en una célula huésped, se integre en el genoma de la célula huésped y se replique con el (los) cromosoma(s) en el (los) que ha sido integrado. Ejemplos de vectores de expresión adecuados incluyen pMT838.

### *Promotor*

En el vector, la secuencia de ADN debería ser operativamente conectada a una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección y puede derivar de genes de codificación de proteínas bien homólogos o heterólogos a la célula huésped.

Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN que codifica una variante de glucoamilasa de la invención, especialmente en un huésped bacteriano, son el promotor del operón lac de *E. coli*, los

promotores del gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* dagA, los promotores del gen de la  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus licheniformis* (amiL), los promotores del gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM), los promotores de  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), los promotores de los genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis*, etc. Para la transcripción en un huésped fúngico, ejemplos de promotores útiles son aquellos derivados del gen que codifica la amilasa TAKA de *A. oryzae*, el promotor de TPI (triosa fosfato isomerasa) de *S. cerevisiae* (Alber *et al.* (1982), J. Mol. Appl. Genet 1, p. 419-434, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*,  $\alpha$ -amilasa neutra de *A. niger*,  $\alpha$ -amilasa estable al ácido de *A. niger*, glucoamilasa de *A. niger*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *A. oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae* o acetamidasa de *A. nidulans*.

#### 10 Vector de expresión

El vector de expresión de la invención puede también comprender un terminador de transcripción adecuada y, en eucariotas, secuencias de poliadenilación operativamente conectadas a la secuencia de ADN que codifica la variante de  $\alpha$ -amilasa de la invención. Las secuencias de terminación y de poliadenilación pueden derivar apropiadamente de las mismas fuentes que el promotor.

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

El vector también puede comprender un marcador seleccionable, p. ej. un gen cuyo producto complemente una falta en la célula huésped, tales como los genes dal de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, o uno que confiera resistencia antibiótica tal como ampicilina, canamicina, cloranfenicol o resistencia a la tetraciclina. Además, el vector puede comprender marcadores de selección de *Aspergillus* tales como amdS, argB, niaD y sC, un marcador que de lugar a resistencia a la higromicina, o la selección puede ser realizada por cotransformación, p. ej. como se describe en WO 91/17243.

Los procedimientos usados para enlazar el constructo de ADN de la invención que codifica una variante de glucoamilasa, el promotor, terminador y otros elementos, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados conteniendo la información necesaria para la replicación, son conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, Clonación Molecular: Manual de Laboratorio; 2nd Ed., Cold Spring Harbor; 1989).

#### Células Huéspedes

La célula de la invención, comprendiendo bien un constructo de ADN o un vector de expresión de la invención tal como se ha definido anteriormente, es ventajosamente usada como una célula huésped en la producción recombinante de una variante de glucoamilasa de la invención. La célula puede ser transformada con el constructo de ADN de la invención codificando la variante, convenientemente integrando el constructo de ADN (en una o más copias) en el cromosoma huésped. Esta integración es generalmente considerada una ventaja pues es muy probable que la secuencia de ADN sea mantenida de forma estable en la célula. La integración de los constructos de ADN en el cromosoma huésped puede ser realizada según métodos convencionales, p. ej. por recombinación homóloga o heteróloga. Alternativamente, la célula puede ser transformada con un vector de expresión del modo descrito anteriormente en relación con los diferentes, tipos de células huéspedes.

La célula de la invención puede ser una célula de un organismo superior tal como un mamífero o un insecto, pero es preferiblemente una célula microbiana, p. ej., una célula bacteriana o fúngica (incluyendo levadura).

Ejemplos de bacterias adecuadas son bacterias gram positivas tales como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis*, o *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas tales como *E. coli*. La transformación de las bacterias puede, por ejemplo, ser efectuada por transformación de protoplasto o usando células competentes conocidas *per se*.

El organismo de levadura puede favorablemente ser seleccionado de una especie de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, p. ej. *Saccharomyces cerevisiae*.

La célula huésped puede ser también un hongo filamentoso p. ej. una cepa de una especie de *Aspergillus*, más preferiblemente *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*, o una cepa de *Fusarium*, tal como una cepa de *Fusarium oxysporium*, *Fusarium graminearum* (en el estado perfecto denominado *Gibberella zea*, previamente *Sphaeria zea*, sinónimo de *Gibberella roseum* y *Gibberella roseum* f. esp. *cerealis*), o *Fusarium sulphureum* (en el estado perfecto denominado *Gibberella puricaris*, sinónimo de *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium sambucium*, *Fusarium roseum*, y *Fusarium roseum* var. *graminearum*), *Fusarium cerealis* (sinónimo de *Fusarium crokwellense*), o *Fusarium venenatum*.

En una forma de realización preferida de la invención la célula huésped es una cepa deficitaria de proteasa o cepa negativa de proteasa.

## ES 2 294 846 T3

Esta puede por ejemplo ser la cepa deficitaria de *Aspergillus oryzae* JaL 125 teniendo el gen de proteasa alcalina llamado "alp" cancelado. Esta cepa está descrita en WO 97/35956 (Novo Nordisk).

5 Las células de hongos filamentosos pueden ser trans-Formadas por un proceso que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguida de regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. El uso de *Aspergillus* como microorganismo huésped está descrito en EP 238 023 (Novo Nordisk NS),

### Método para Producir una Variante de Glucoamilasa

10 En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un método para producir una variante de glucoamilasa de la invención, cuyo método comprende cultivar una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción de la variante y recuperación de la variante de las células y/o medio de cultivo.

15 El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para hacer crecer la célula huésped en cuestión y obtener expresión de la variante de glucoamilasa de la invención. Los medios adecuados se encuentran disponibles en los proveedores comerciales o pueden ser preparados según recetas publicadas (p. ej. como se describe en los catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo).

20 La variante de glucoamilasa segregada de las células huéspedes puede convenientemente ser recuperada del medio de cultivo por procedimientos bien conocidos, incluyendo la separación de las células del medio por centrifugado o filtración, y la precipitación de los componentes proteínicos del medio mediante una sal tal como sulfato de amonio, seguido del uso de procedimientos cromatográficos tal como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, o similar.

### 25 Conversión de almidón

La presente invención provee un método para usar variantes de glucoamilasa de la invención para producir glucosa y similares de almidón. Generalmente, el método incluye las fases de hidrolizar parcialmente almidón precursor en presencia de  $\alpha$ -amilasa e hidrolizar luego adicionalmente la liberación de D-glucosa de los extremos no reductores del almidón o moléculas oligo- o polisacáridas relacionadas en presencia de glucoamilasa dividiendo los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1  $\times$  4) y  $\alpha$ -(1  $\times$  6).

30 La hidrólisis parcial del almidón precursor utilizando  $\alpha$ -amilasa provee una descomposición inicial de las moléculas de almidón al hidrolizar los enlaces internos  $\alpha$ -(1  $\times$  4). En aplicaciones comerciales, la hidrólisis inicial usando  $\alpha$ -amilasa se realiza a una temperatura de aproximadamente 105°C. Se procesa una concentración de almidón muy alta, normalmente sólidos al 30% a 40%. La hidrólisis inicial es normalmente realizada durante cinco minutos a esta temperatura elevada. El almidón parcialmente hidrolizado puede después ser transferido a un segundo tanque e incubado durante aproximadamente 1-2 horas a una temperatura de 85° a 98°C para obtener un equivalente de dextrosa (D.E.) de 10 a 15.

40 La fase de hidrolizar adicionalmente la liberación de D-glucosa de los extremos no reductores del almidón o moléculas de oligo- y polisacáridos relacionadas en presencia de glucoamilasa se realiza normalmente en un tanque separado a una temperatura reducida entre 30° y 62°C. Preferiblemente la temperatura del líquido de sustrato es bajada a entre 55° y 60°C. El pH de la solución es bajada de aproximadamente 5,5 a 6,5 a un rango entre 3 y 5,5. Preferiblemente, el pH de la solución es 4 a 4,5. La glucoamilasa se añade a la solución y la reacción se realiza durante 24-72 horas, preferiblemente 36-48 horas.

50 Al usar una variante de glucoamilasa termoestable de la invención se pueden realizar procesos de sacarificación a una temperatura más alta que los procesos de sacarificación por lotes tradicionales. Según la invención la sacarificación puede ser realizada a temperaturas en el rango sobre 60-80°C, preferiblemente 63-75°C. Esto se aplica tanto a los procesos por lotes tradicionales (anteriormente descritos) como a los procesos de sacarificación continuos.

55 En realidad, los procesos de sacarificación continuos incluyendo una o más fases de separación por membrana, es decir fases de filtración, deben ser realizados a temperaturas por encima de 60°C para poder mantener un flujo razonablemente alto sobre la membrana o para minimizar la contaminación microbiana. En consecuencia, las variantes termoestables de la invención proporcionan la posibilidad de realizar procesos de sacarificación continuos a gran escala a un precio justo y/o con una dosificación de proteína enzimática inferior dentro de un periodo de tiempo aceptable para los procesos de sacarificación industriales. Según la invención el tiempo de sacarificación puede incluso ser acortado.

60 La actividad de la variante de glucoamilasa (p. ej. variante AMG) de la invención es generalmente sustancialmente superior a temperaturas entre 60°C-80°C que a la temperatura generalmente usada entre 30-60°C. En consecuencia, al aumentar la temperatura en la que opera la glucoamilasa el proceso de sacarificación puede ser realizado dentro de un periodo de tiempo más corto.

65 Además, al mejorar la termoestabilidad se mejora el  $T_{1/2}$  (duración media, tal y como se define en el apartado de "Materiales y Métodos"). Como la termoestabilidad de las variantes de glucoamilasa de la invención es mejorada se necesita añadir una cantidad menor de glucoamilasa para reemplazar la glucoamilasa que es inactivada durante el proceso de sacarificación. Durante el proceso de sacarificación según la presente invención se mantiene más glucoamilasa

activa. Además, se reduce también el riesgo de contaminación microbiana cuando se lleva el proceso de sacarificación a una temperatura por encima de 63°C.

5 El rendimiento de glucosa de una prueba de sacarificación típica con glucoamilasa, amilasa ácida y pululanasa es 95,5-96,5%. Los carbohidratos restantes normalmente consisten en 1% de maltosa; 1,5-2% de isomaltosa y 1-1,5% de oligosacáridos superiores. Se producen disacáridos puesto que la glucoamilasa a concentraciones altas de glucosa y altos niveles de materia seca tiende a formar productos de reversión.

10 Una glucoamilasa con una actividad específica aumentada hacia los sacáridos presentes en la solución después de licuefacción y los sacáridos formados durante la sacarificación serían una ventaja pues se podría utilizar una menor dosificación de proteína enzimática o un tiempo de proceso más corto. En general, la glucoamilasa tiene preferencia por los sustratos que consisten en sacáridos más largos en comparación con los sacáridos de cadena corta y la actividad específica hacia p. ej. maltoheptaosa es en consecuencia aproximadamente 6 veces superior que hacia maltosa. Una mayor actividad específica hacia los sacáridos de cadena corta tales como maltosa (sin reducir la actividad hacia los oligosacáridos) en consecuencia también permitiría usar una dosificación de enzima inferior y/o tiempo de proceso más corto.

20 Además, se puede obtener un rendimiento de glucosa superior con una variante de glucoamilasa con una actividad hidrolítica alfa-1,4 (si la actividad alfa-1,6 es invariada o incluso disminuida), puesto que una cantidad reducida de proteína enzimática está siendo usada, y en consecuencia se disminuye la formación de producto de reversión alfa-1,6 (menos isomaltosa).

25 La actividad específica puede ser medida usando el método descrito en el apartado "Materiales y Métodos" a 37°C o 60°C.

Los ejemplos de proceso de sacarificación donde las variantes de glucoamilasa de la invención pueden ser usadas incluyen los procesos descritos en JP 3-224493; JP 1-191693; JP 62-272987; EP 452,238, y WO 99/27124.

30 En otro aspecto la invención se refiere a un método de sacarificación de una solución de almidón licuado, incluyendo las siguientes fases

- (i) una fase de sacarificación durante la cual se desarrollan uno o más estadios de sacarificación enzimática, y la fase posterior de
- 35 (ii) una o más fases de separación por membrana a alta temperatura donde la sacarificación enzimática se realiza usando una variante de glucoamilasa termoestable de la invención.

40 La(s) variante(s) de glucoamilasa de la invención pueden ser usadas en el presente proceso inventivo en combinación con una enzima que hidroliza sólo enlaces  $\alpha$ -(1  $\times$  16). glucosídicos en moléculas con al menos cuatro residuos glucosilicos. Preferentemente, la variante de glucoamilasa de la invención puede ser usada en combinación con pululanasa o isoamilasa. El uso de isoamilasa y pululanasa para desramificar las propiedades moleculares de las enzimas, y el uso potencial de las enzimas con glucoamilasa está indicado en G.M.A. van Beynum *et al.*, Starch Conversion Technology, Marcel Dekker, Nueva York, 1985, 101-142.

45 En otro aspecto la invención se refiere al uso de una variante de glucoamilasa de la invención en un proceso de conversión de almidón.

Además, la variante de glucoamilasa de la invención puede ser usada en un proceso de conversión de almidón continuo incluyendo una fase de sacarificación continua.

50 Las variantes de glucoamilasa de la invención pueden también ser usadas en forma inmovilizada. Esto es conveniente y frecuentemente usado para producir jarabes especiales, tales como jarabes de maltosa, y otros para la corriente refinada de oligosacáridos en relación con la producción de jarabes de fructosa.

55 La glucoamilasa de la invención también puede ser usada en un proceso para producir etanol para combustible o bebidas o puede ser usado en un proceso de fermentación para producir compuestos orgánicos, tales como ácido cítrico, ácido ascórbico, lisina, ácido glutámico.

## Materiales y métodos

### 60 *Materiales*

#### *Enzimas*

65 AMG G1: glucoamilasa de *Aspergillus niger* G1 descrita en Boel *et al.* (1984), EMBO J. 3 (5), 1097-1102, y la SEC ID NO: 13; disponible en Novo Nordisk.

AMG G2: glucoamilasa de *Aspergillus niger* G1 truncada mostrada en la SEC ID NO: 2, disponible en Novo Nordisk)

## ES 2 294 846 T3

### Soluciones

Tampón: 0,05M de acetato sódico (6,8 g en 1 l de agua purificada en un sistema milli-Q), pH 4,5

5 Solución de detención: 0,4M de NaOH

GOD-perid, 124036, Boehringer Mannheim

### 10 Sustrato

Maltosa: 29 mM (1 g maltosa en 100 ml 50 mM de acetato sódico, pH 4,5) (Sigma)

15 Maltoheptaosa: 10 mM, 115 mg/10 ml (Sigma)

### Célula huésped

20 *A. oryzae* JaL 125: *Aspergillus oryzae* IFO 4177 disponible en Institute for Fermentation, Osaka; 17-25 Juso Ham-machi 2-Chome Yodogawa-ku, Osaka, Japón, que tiene el gen de proteasa alcalina denominado “alp” (descrito por Murakami K *et al.*, (1991), *Agric. Biol. Chem.* 55, p. 2807-2811) cancelado por un método de sustitución de gen de una fase (descrito por G. May en “Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi” (1992), p. 1-25. Eds. J. R. Kinghorn y G. Turner; Blackie Academic and Professional), usando el gen de *A. oryzae* pyrG como marcador. La cepa JaL 125 está descrita con más detalle en WO 97/35956 (Novo Nordisk).

25

### Microorganismos

Cepa: *Saccharomyces cerevisiae* YNG318: MAT $\alpha$ leu2- $\Delta$ 2 ura3-52 his4-539 pep4- $\Delta$ 1 [cir+]

30

### Plásmidos

35 pCAMG91: ver Figura 1. Plásmido comprendiendo la glucoamilasa de *Aspergillus niger* G1 (AMG GI). La construcción de pCAMG91 está descrita en Boel *et al.* (1984), *EMBO J.* 3 (7) p.1581-1585.

pMT838: plásmido que codifica la glucoamilasa de *Aspergillus niger* truncada G2 (SEC ID NO: 2).

40 pJS0026 (plásmido de expresión de *S. cerevisiae*) (J.S. Okkels, (1996) “A URA3-promoter deletion in a pYES vector increases the expression level of a fungal lipase in *Saccharomyces cerevisiae*. Recombinant DNA Biotechnology III: The Integration of Biological and Engineering Sciences, vol. 782 de los Anales de la Academia de Ciencias de Nueva York). Más específicamente, el plásmido de expresión pJSO37, es derivado de pYES 2,0 reemplazando el promotor inducible GAL1 de pYES 2,0 con el promotor constitutivamente expresado de TPI (triosa fosfato isomerasa) de *Saccharomyces cerevisiae* (Albert y Karwasaki, (1982), *J. Mol. Appl Genet.*, 1, 419-434), y cancelando una parte del promotor URA3.

45

### Métodos

50 *Transformación de Saccharomyces cerevisiae* YNG318

Los fragmentos de ADN y los vectores abiertos son mezclados y transformados en la levadura de *Saccharomyces cerevisiae* YNG318 por métodos estándares.

55

*Determinación de la Actividad Específica As  $K_{cat}$  (sec.<sup>-1</sup>)*

Se incuban 750 microL de sustrato (1% maltosa; 50 mM de acetato sódico, pH 4,3) 5 minutos a temperatura seleccionada, tal como 37°C ó 60°C.

60

Se añade 50 microL de enzima diluida en acetato sódico. Se retiran partes alícuotas de 100 microL después de 0, 3, 6, 9 y 12 minutos y se transfieren a 100 microL 0,4 M de hidróxido de sodio para parar la reacción. Se incluye un blanco. Se transfiere 20 microL a placas de Microtitulación y se añaden 200 microL de solución GOLD-Perid. La absorbencia es medida a 650 nm después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente. Se usa glucosa como estándar y la actividad específica es calculada como  $K_{cat}$  (sec.<sup>-1</sup>).

65

## ES 2 294 846 T3

### Determinación de la actividad AGU y As AGU/mg

Una unidad de amiloglucosidasa Novo (AGU) es definida como la cantidad de enzima que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto a 37°C y pH 4,3. Una descripción detallada del método analítico (AEL-SM-0131) está disponible a petición en Novo Nordisk.

La actividad es determinada como AGU/ml por un método modificado después de (AEL-SM-0131) usando el kit de glucosa GOD-Perid de Boehringer Mannheim; 124036. Estándar: lote estándar de AMG, lote 7-1195, 195 AGU/ml.

Se incuban 375 microL de sustrato (1% maltosa en 50 mM de acetato sódico, pH 4,3) 5 minutos a 37°C. Se añaden 25 microL de enzima diluida en acetato sódico. La reacción es detenida después de 10 minutos añadiendo 100 microL 0,25 M de NaOH. Se transfieren 20 microL a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se añaden 200 microL de solución GOD-Perid. Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la absorbencia es medida a 650 nm y la actividad calculada en AGU/ml del AMG estándar.

La actividad específica en AGU/mg es luego calculada de la actividad (AGU/ml) dividida por la concentración de proteína (mg/ml).

### Transformación de *Aspergillus oryzae* (procedimiento general)

Se inoculan 100 ml de YPD (Sherman *et al.*, (1981), Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory) con esporas de *A. oryzae* y se incuban con agitación durante aproximadamente 24 horas. El micelio es cosechado por filtración a través de miracloth y lavado con 200 ml de 0.6 M de MgSO<sub>4</sub>. El micelio es suspendido en 15 ml de 1,2 M de MgSO<sub>4</sub>, 10 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 5,8. La suspensión es enfriada en hielo y se añade 1 ml de tampón conteniendo 120 mg de Novozym™ 234. Después de 5 min. se añade 1 ml de 12 mg/ml BSA (Sigma tipo H25) y se continúa la incubación con agitación suave durante 1,5-2,5 horas a 37°C hasta que un gran número de protoplastos es visible en una muestra inspeccionada bajo el microscopio.

La suspensión es filtrada por miracloth, el filtrado transferido a un tubo estéril y cubierto con 5 ml de 0,6 M de sorbitol, 100 mM de tris-HCl, pH 7,0. Se realiza el centrifugado durante 15 min. a 1000 g y los protoplastos son recogidos de la parte superior del lecho de MgSO<sub>4</sub>. 2 volúmenes de STC (1,2 M de sorbitol, 10 mM de tris-HCl, pH 7,5, 10 mM de CaCl<sub>2</sub>) son agregados a la suspensión de protoplastos y la mezcla es centrifugada durante 5 min. a 1000 g. El granulado de protoplastos es resuspendido en 3 ml de STC y regranulado. Esto se repite. Finalmente, los protoplastos son resuspendidos en 0,2-1 ml de STC.

Se mezclan 100 µl de suspensión de protoplastos con 5-25 µg de p3SR2 (un plásmido que lleva el gen amdS de *A. nidulans* descrito en Hynes *et al.*, Mol. y Cel. Biol., Vol. 3; n°. 8, 1430-1439; Aug. 1983) en 10 µl de STC. La mezcla es dejada a temperatura ambiente durante 25 min. Se añade 0,2 ml de 60% PEG 4000 (BDH 29576), 10 mM de CaCl<sub>2</sub> y 10 mM de tris-HCl, pH 7,5 y se mezcla cuidadosamente (dos veces) y finalmente se añade y mezcla cuidadosamente 0,85 ml de la misma solución. La mezcla es dejada a temperatura ambiente durante 25 min., centrifugada a 2.500 g durante 15 min. y el granulado es resuspendido en 2 ml de 1,2M de sorbitol. Después de una sedimentación más los protoplastos son extendidos en placas mínimas (Cove, (1966), Biochem. Biophys. Acta 113, 51-56) conteniendo 1,0 M de sacarosa, pH 7,0, 10 mM de acetamida como fuente de nitrógeno y 20 mM de CsCl para inhibir el crecimiento residual. Tras la incubación durante 4-7 días a 37°C las esporas son recogidas, suspendidas en agua estéril y extendidas en colonias individuales. Este procedimiento es repetido y las esporas de una colonia individual después del segundo reaislamiento son almacenadas como un transformante definido.

### Fermentación con Alimentación por Lotes

La fermentación con alimentación por lotes es realizada en un medio comprendiendo maltodextrina como fuente de carbono, urea como fuente de nitrógeno y extracto de levadura. La fermentación con alimentación por lotes es realizada inoculando un cultivo en un frasco de agitación de las células huéspedes de *A. oryzae* en cuestión en un medio comprendiendo 3,5% de la fuente de carbono y 0,5% de la fuente de nitrógeno. Después de 24 horas de cultivo a pH 5,0 y 34°C se inicia la alimentación continua de fuentes de nitrógeno y carbono adicionales. La fuente de carbono es mantenida como el factor de limitación y se asegura que el oxígeno esté presente en exceso. Se continúa el cultivo con alimentación por lotes durante 4 días, después de los cuales las enzimas pueden ser recuperadas por centrifugado, ultrafiltración, filtración clara y filtración de gérmenes.

### Purificación

El caldo de cultivo es filtrado y se le añade amoniosulfato (AMS) en una concentración de 1,7 M AMS y el pH es ajustado a pH 5. El material de precipitado es retirado por centrifugado y la solución que contiene actividad glucoamilasa es aplicada en una columna Toyo Pearl Butyl previamente equilibrada en 1,7 M de AMS, 20 mM de acetato sódico, pH 5. El material no enlazado es lavado con el tampón de equilibrado. Las proteínas enlazadas son eluidas con 10 mM de acetato sódico, pH 4,5 usando un gradiente lineal de 1,7-0 M AMS sobre 10 volúmenes de

## ES 2 294 846 T3

columna. Las fracciones conteniendo glucoamilasa son recogidas y dializadas contra 20 mM de acetato sódico, pH 4,5. La solución fue luego aplicada en una columna de sefarosa Q, previamente equilibrada en 10 mM de Piperazina, Sigma, pH 5,5. El material no enlazado es lavado con el tampón de equilibrado. Las proteínas enlazadas son eluidas con un gradiente lineal de 0-0,3 M de cloruro sódico en 10 mM de Piperazina, pH 5,5 sobre 10 volúmenes de columna.

5 Las fracciones conteniendo glucoamilasa son recogidas y la pureza fue confirmada por SDS-PAGE.

### *T<sub>1/2</sub> (vida media) Método I*

10 La termoestabilidad de las variantes es determinada como T<sub>1/2</sub> usando el método siguiente: Se incuban 950 microlitros de 50 mM de tampón de acetato sódico (pH 4,3) (NaOAc) durante 5 minutos a 68°C ó 70°C. Se añaden 50 microlitros de enzima en tampón (4 AGU/ml). Se toman muestras de 2 x 40 microlitros a 0, 5, 10, 20, 30 y 40 minutos y se enfría en hielo. Se usa la actividad (AGU/ml) medida antes de la incubación (0 minutos) como referencia (100%). El descenso de la estabilidad (en porcentaje) es calculado en función del período de incubación. La actividad  
15 de glucoamilasa residual en % es determinada en tiempos diferentes. T<sub>1/2</sub> es el periodo de tiempo hasta que el % de actividad relativa ha disminuido un 50%.

### *T<sub>1/2</sub> (vida media) Método II*

20 El T<sub>1/2</sub> es medido incubando la enzima (aprox 0,2 AGU/ml) en cuestión en 30% de glucosa; 50 mM de acetato sódico a pH 4,5 a la temperatura en cuestión (p. ej.: 70°C). Se retiran muestras a intervalos de tiempo establecidos y se enfrían en hielo y se mide la actividad enzimática residual por el método pNPG (como se describe abajo).

25 El % de actividad de glucoamilasa residual es determinada en tiempos diferentes. T<sub>1/2</sub> es el periodo de tiempo hasta que el % de actividad relativa ha disminuido un 50%.

### *Actividad Enzimática Residual (Método pNPG) reactivo pNPG*

30 Se disuelve 0,2 g de pNPG (p-nitrofenilglucopiranosido) en 0,1 M de tampón de acetato (pH 4,3) y se completa a 100 ml.

### *Solución de borato*

Se disuelven 3,8 g de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10 H<sub>2</sub>O en agua purificada en un sistema Milli-Q y se completa hasta 100 ml.

40 Se añaden muestras de 25 microL a 50 microL de sustrato y se incuban 2 hr a 50°C. La reacción es detenida añadiendo 150 microL ml de solución de borato. Se mide la densidad óptica a 405 nm y se calcula la actividad residual.

### *Construcción de pAMGY*

45 El vector pAMGY fue construido como sigue: el gen de lipasa en pJSO026 fue sustituido por el gen AMG, que fue amplificado por PCR con el cebador directo: FG2: 5'-CAT CCC GAT CCT TAC TCA GCA ATG-3' y el cebador inverso: RG2: 5'-CTC AAA CGA CTC ACC AGC CTC TAG AGT-3' usando el plásmido patrón pLAC103 conteniendo el gen AMG. El plásmido pJSO026 fue digerido con XbaI y SmaI a 37°C durante 2 horas y el amplicon PCR fue hecho como usando el fragmento Klenow y luego digerido con XbaI. El fragmento del vector y el amplicon  
50 PCR fueron ligados y transformados en *E. coli* por electrotransformación. El vector resultante es designado pAMGY.

### *Construcción de pLaC103*

55 Se usa el clon de ADNc AMGII de *A. Niger* (Boel *et al.*, (1984), *supra*) como fuente para la construcción de pLaC103 dirigido a la expresión de *S. cerevisiae* de la forma GII de AMG.

La construcción se desarrolla en diferentes fases indicadas abajo.

60 Se divide pT7-212 (EP37856/Patente estadounidense n°. 5162498) con XbaI, con extremos romos con ADN polimerasa de Klenow y dNTP. Después de dividir con EcoRI, el fragmento del vector resultante es purificado por una electroforesis de gel de agarosa y ligado con el fragmento EcoRI-EcoRV de 2,05 kb de pBoel53, recreando de ese modo el sitio de XbaI en el extremo EcoRV del fragmento de codificación AMG en el plásmido resultante pG2x.

65 Para eliminar el ADN corriente arriba de los cds AMG, y proveer el ADN de codificación de AMG con un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción apropiada, se hizo el siguiente constructo:

## ES 2 294 846 T3

El fragmento EcoRI-PstI de 930 pares de bases de p53 fue aislado y sometido a seccionamiento de AluI, el fragmento resultante Alu-PstI de 771 bp fue ligado en pBR322 con el sitio de EcoRI romo (ver arriba) y dividido con PstI en el plásmido resultante pBR-AMG', el sitio EcoRI fue recreado justo 34 bp del codón iniciador de los cds de AMG.

5 De pBR-AMG' se aisló el fragmento EcoRI-PstI de 775 bp y se unió con el fragmento PstI-XbaI de 1151 pb de pG2x en una reacción de ligadura incluyendo el fragmento del vector XbaI-EcoRI de pT7-212.

10 El plásmido resultante pT7GII fue sometido a un seccionamiento de BamHI en presencia de fosfatasa alcalina seguido de seccionamiento parcial SphI después de la inactivación de la fosfatasa. De esta reacción el fragmento SphI-BamHI de 2489 bp, abarcando el promotor de TPI de *S.c.* fue enlazado a los cds de AMGII. El fragmento anterior junto con el fragmenta BamHI de 1052 bp de pT7GII fue ligado con el fragmento del vector trataclo con fosfatasa alcalina de pMT743 (EP37856 /US 5162498), produciendo la digestión de SphI-BamHI. El plásmido resultante es pLaC103.

15 *Selección de Variantes Termoestables de AMG*

Las bibliotecas son seleccionadas en el ensayo de filtro termoestable descrito abajo.

20 *Ensayo de filtro para la termoestabilidad*

Se colocan ibliotecas de levadura en placas en un sándwich de acetato de celulosa (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) - y filtros de nitrocelulosa (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania) sobre placas de CFura- agar con 100 µg/ml de ampicilina a 30°C durante al menos 72 hrs. Las colonias son colocadas en réplicas en filtros PVDF (Immobilon-P, Millipore, Bedford) activados con metanol durante 1 min o alternativamente un filtro Protran (sin activación) y posteriormente lavado en 0,1 M cle NaAc y luego incubadas a temperatura ambiente durante 2 horas. Las colonias son lavadas de los filtros PVDF/Protran con agua corriente. Cada sandwich de filtros y los filtros PVDF/Protran son específicamente marcados con una aguja antes de la incubación con el objetivo de poder localizar variantes positivas en los filtros después de la selección. Los filtros PVDF con variantes enlazadas son transferidos a un contenedor con 0,1 M de NaAc, pH 4,5 e incubados a 47°C o alternativamente 67-69°C en caso de filtros Protran durante 15 minutos. El sándwich de acetato de celulosa y los filtros de nitrocelulosa sobre placas de SC ura-agar son almacenados a temperatura ambiente hasta su uso. Tras la incubación, las actividades residuales son detectadas en placas que contienen un 5% de maltosa; 1% de agarosa; 50 mM de NaAc, pH 4,5. Las placas de ensayo con filtros PVDF son marcadas de la misma manera que los sandwich de filtros e incubadas durante 2 hrs. a 50°C. Después de retirar los filtros PVDF, las placas de ensayo son coloreadas con glucosa/GOD-perid (Boehringer Mannheim GmbH, Alemania). Las variantes con actividad residual son detectadas en las placas de ensayo como manchas verde oscuro sobre fondo blanco. Las variantes mejoradas son localizadas en las placas de almacenamiento. Las variantes mejoradas son refiltradas dos veces según las mismas condiciones que la primera selección.

40

*Método General de Mutagénesis Aleatoria Usando el Programa DOPE*

La mutagénesis aleatoria puede ser realizada por las fases siguientes:

45

1. Seleccionar regiones de interés para modificar la enzima progenitora,
2. Decidir sitios de mutación y sitios no mutados en la región seleccionada,
- 50 3. Decidir qué tipo de mutación debería realizarse, p. ej., con respecto a la estabilidad deseada y/o rendimiento de la variante a construir,
4. Seleccionar mutaciones estructuralmente razonables,
- 55 5. Ajustar los residuos seleccionados en la fase 3 con respecto a la fase 4.
6. Analizar, usando un algoritmo DOPE adecuado, la distribución de nucleótidos.
- 60 7. Si es necesario, ajustar los residuos deseados al realismo del código genético, p. ej. teniendo en cuenta las limitaciones que resultan del código genético, p. ej. para evitar la introducción de codones de parada; el experto en la materia sabrá que algunas combinaciones de codón no pueden ser usadas en la práctica y necesitan ser adaptadas
8. Hacer cebadores
- 65 9. Realizar la mutagénesis aleatoria usando los cebadores
10. Seleccionar las variantes de glucoamilasa resultantes seleccionando las propiedades deseadas mejoradas.

## ES 2 294 846 T3

### *Algoritmo DOPE*

Los algoritmos DOPE adecuados para el uso en la fase 6 son muy conocidos en la técnica. Tal algoritmo está descrito por Tomandl, D. *et al.*; 1997; Journal of Computer-Aided Molecular Design 11:29-38. Otro algoritmo es DOPE (Jensen, LJ, Andersen, KV, Svendsen, A, and Kretzschmar, T (1998) Nucleic Acids Research 26:697-702).

### *Método de Extracción de Regiones Importantes para la Actividad Según la Temperatura Usando Simulación Molecular*

La estructura de rayos X y/o la estructura modelo de construcción de la enzima de interés, aquí AMG, es sometida a simulaciones de dinámica molecular. Las simulaciones de dinámica molecular se hicieron usando el programa CHARMM (de simulaciones moleculares (MSI) u otros programas adecuados, p. ej., DISCOVER (de MSI). Las dinámicas son hechas en vacío, o incluyendo aguas de cristalización, o con la enzima en cuestión introducida en aguas adecuadas, p. ej., una esfera o una caja. Las simulaciones son realizadas durante 300 picosegundos (ps) o más, p. ej.; 300-1200 ps. Las fluctuaciones isotrópicas son extraídas para los carbonos CA de las estructuras y se hace la comparación entre las estructuras. Se pueden encontrar más detalles de cómo obtener las fluctuaciones isotrópicas en el manual CHARMM (disponible en MSI).

La simulación de dinámica molecular puede llevarse a cabo usando cargas estándares en los aminoácidos cargables. Por ejemplo, Asp y Glu son cargados negativamente y Lys y Arg son cargados positivamente. Esta condición se asemeja al pH del medio de aproximadamente 7,0. Para analizar un pH inferior, se puede hacer la titulación de la molécula para obtener el pKa's alterado de los residuos titulables normales dentro de pH 2-10; Lys, Arg, Asp, Glu, Tyr y His. También Ser, Thr y Cys son titulables pero no son tenidos en cuenta aquí. Aquí se han descrito las cargas alteradas debido al pH como todos Arg, Lys negativos a pH alto, y todos Asp, Glu sin carga. Esto imita un pH de alrededor de 4 a 5 donde normalmente tiene lugar la titulación de Asp y Glu.

El modelo de construcción de la enzima de interés puede ser obtenido usando el modelo HOMOLOGY del paquete informático MSI La estructura cristalina de la variante de *Aspergillus awamori* x100 puede ser encontrada en, p. ej.; 3GLY y 1 DOG en la base de datos Brookhaven.

### **Ejemplos**

Ejemplo 1

#### *Construcción de variantes de AMG G2*

##### *Mutagénesis sitio-dirigida*

Para la construcción de variantes de AMG G2 (SEC ID NO: 2) se usó el kit comercial de mutagénesis dirigida bicatenaria Chameleon según las instrucciones del fabricante.

El gen que codifica la enzima AMG G2 en cuestión está localizado en pMT838 preparado cancelando el ADN entre G2 nt. 1362 y G2 nt. 1530 en el plásmido pCAMG91 (ver Figura 1) comprendiendo la forma AMO G1.

Según las instrucciones del fabricante el sitio Scal del gen de Ampicilina de pMT838 fue cambiado a un sitio MluI usando el cebador siguiente:

7258: 5'p gaa tga ctt ggt tga cgc gtc acc agt cac 3' (SEC ID NO: 3).

(Cambiando así el sitio Scal encontrado en el gen de resistencia a la ampicilina y usado para cortar a un sitio MluI). El vector pMT838 comprendiendo el gen AMG en cuestión fue luego usado como un molde para ADN polimerasa y oligo 7258 (SEC ID NO: 3) y 21401 (SEC ID NO: 4).

Se usó el cebador n°. 21401 (SEC ID NO: 4) como el cebador de selección.

21401: 5'p gg gga tca tga tag gac tag cca tat taa tga agg gca tat acc acg cct tgg acc tgc gtt ata gcc 3'

(Cambia el sitio Scal encontrado en el gen AMG sin cambiar la secuencia de aminoácidos).

La mutación deseada (p. ej., la introducción de un residuo de cisteína) es introducida en el gen AMG en cuestión por adición de oligos apropiados comprendiendo la mutación deseada.

## ES 2 294 846 T3

Se usó el cebador 107581 para introducir T12P

107581: 5' pgc aac gaa gcg ccc gtg gct cgt ac 3'(SEC ID NO: 5)

5

Las mutaciones son verificadas secuenciando todo el gen. El plásmido fue transformado en *A. oryzae* usando el método anteriormente descrito en el apartado "Materiales y Métodos". La variante fue fermentada y purificada del modo descrito anteriormente en el apartado "Materiales y Métodos".

10

### Ejemplo 2

*Construcción, por mutagénesis dopada aleatoria localizada, de las variantes de AMG de A. niger con termoestabilidad mejorada en comparación con la enzima progenitora*

15

Para mejorar la termoestabilidad de AMG de *A. niger* se realizó la mutagénesis aleatoria en una región preseleccionada.

20

Residuo:

Región: L19-G35

Región: A353-V374

25

Se usó el software DOPE (ver Materiales y Métodos) para determinar los codones adicionados para cada cambio sugerido en las regiones indicadas arriba minimizando la cantidad de codones de parada (ver tabla 1). La distribución exacta de nucleótidos fue calculada en las tres posiciones del codón para dar la población sugerida de cambios de aminoácidos. Las regiones dopadas fueron dopadas específicamente en las posiciones indicadas para tener una alta probabilidad de conseguir los residuos deseados, pero permitir además otras posibilidades.

30

La primera columna es el aminoácido que se debe mutar, la segunda columna es el porcentaje de tipo salvaje y la tercera columna define el (los) nuevo(s) aminoácido(s).

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

TABLA 1

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50

Dopaje en L19-G35		
L19	90%	N
N20	95%	T
N21	Constante	
I22	Constante	
G23	95%	A
A24	90%	S,T
D25	93%	S,T,R
G26	95%	A
A27	90%	S,T
W28	<80%	R,Y
V29	Constante	
S30	93%	T,N
G31	95%	A
A32	95%	V
D33	80%	R,K,H
S34	90%	N
G35	Constante	

55 La cadena de oligonucleótidos dopada resultante es mostrada en la tabla 2 como hebra codificante: con la secuencia de cebador, la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje, la secuencia de aminoácidos progenitores y la distribución de nucleótidos para cada posición dopada.

60  
65

## ES 2 294 846 T3

TABLA 2

	<b>Posición:</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>21</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>24</b>	<b>25</b>	<b>26</b>	<b>27</b>
5	<b>sec. A.a.:</b>	L	N	N	I	G	A	D	G	A
	<b>cebador:</b>	12T	A3T	AAC	ATC	G4G	5CG	67C	G4T	8CT
10	<b>sec. t.</b>	CTG	AAT	AAC	ATC	GGG	GCG	GAC	GGT	GCT
	<b>salvaje:</b>									
15	<b>Pos.</b>									
	<b>(cont.):</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>31</b>	<b>32</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>35</b>	
	<b>A.a. (cont):</b>	W	V	S	G	A	D	S	G	
20	<b>cebador</b>	91010	GTG	1112C	G4C	G13G	141516	1718T	GGC	
	<b>sec. t.</b>									
25	<b>salvaje:</b>	TGG	GTG	TCG	GGC	GCG	GAC	TCT	GGC	

Distribución de nucleótidos para cada posición dopada.

- 30 1: A10, C90
- 2: A6; T94
- 35 3: A95, C5
- 4: G95, C5
- 5: G91, A3, T3, C3
- 40 6: G95, A3, C2
- 7: G3; A95, C2
- 45 8: G92, A4, T4
- 9: A3, T97
- 10: G95, T5
- 50 11: G3; A97
- 12: G95, A2, C3
- 55 13: T5, C95
- 14: G88, A8, C4
- 15: G7, A93
- 60 16: G4, C96
- 17: G4, A96
- 65 18: G95, A2, C3

ES 2 294 846 T3

Cebador directo (SEC ID NO: 6):

[0158] FAMGII '5-C GAA GCG ACC GTG GCT CGT ACT GCC ATC 12T A3T  
AAC ATC G4G 5CG 67C G4T 8CT 91010 GTG 1112C G4C G13G 141516  
1718T GGC ATT GTC GTT GCT AGT CCC AGC ACG GAT AAC-3'

Cebador inverso (SEC ID NO: 7):

[0159] RAMG1: 5'-GAT GGC AGT ACG AGC CAC GGT CGC TTC G-3'

TABLA 3

Dopaje en región A353-V374 :		
A353	<80%	D, E, Q, N, Y
L354	90%	Q, E
Y355	90%	N, Q
S356	90%	T, D, N
G357	80%	P, A, S, T
A358	93%	S
A359	90%	S, T, N
T360	90%	R, K
G361	85%	A, S, T
T362	90%	S
Y363	Constante	
S364	93%	D
S365	93%	N, Q, K
S366	93%	P, D
S367	Constante	
S368	93%	D, N, T
T369	93%	Q, E
Y370	Constante	
S371	93%	N
S372	93%	N, T
I373	Constant	
V374	93%	N, Y, H

## ES 2 294 846 T3

La cadena de oligonucleótidos dopada resultante es mostrada en la tabla 4 como hebra codificante: con la secuencia de cebador, secuencia de nucleótidos de tipo salvaje, la secuencia de aminoácidos progenitores y la distribución de nucleótidos para cada posición dopada.

TABLA 4

5											
10	<b>Posición:</b>	<b>353</b>	<b>354</b>	<b>355</b>	<b>356</b>	<b>357</b>	<b>358</b>	<b>359</b>	<b>360</b>	<b>361</b>	<b>362</b>
	<b>sec.</b>	<b>A</b>	<b>L</b>	<b>Y</b>	<b>S</b>	<b>D</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>T</b>
	<b>A.a.:</b>										
15	<b>cebador:</b>	<b>123</b>	<b>45A</b>	<b>6AC</b>	<b>78C</b>	<b>310T</b>	<b>11CT</b>	<b>1213T</b>	<b>1415A</b>	<b>1617C</b>	<b>18CC</b>
	<b>sec. t.</b>	<b>GCA</b>	<b>CTG</b>	<b>TAC</b>	<b>AGC</b>	<b>GAT</b>	<b>GCT</b>	<b>GCT</b>	<b>ACT</b>	<b>GGC</b>	<b>ACC</b>
	<b>salvaje:</b>										
20											
	<b>Pos.</b>										
25	<b>(cont.):</b>	<b>363</b>	<b>364</b>	<b>365</b>	<b>366</b>	<b>367</b>	<b>368</b>	<b>369</b>	<b>370</b>		
	<b>A.a.</b>										
	<b>(cont.):</b>	<b>Y</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>T</b>	<b>Y</b>		
30	<b>cebador:</b>	<b>TAC</b>	<b>1920T</b>	<b>A2122</b>	<b>2324C</b>	<b>AGT</b>	<b>1425C</b>	<b>2627G</b>	<b>T28T</b>		
	<b>sec. t.</b>	<b>TAC</b>	<b>TCT</b>	<b>TCG</b>	<b>TCC</b>	<b>AGT</b>	<b>TCG</b>	<b>ACT</b>	<b>TAT</b>		
	<b>salvaje:</b>										
35	<b>Pos. (cont.):</b>		<b>371</b>		<b>372</b>	<b>373</b>		<b>374</b>			
	<b>A.a. (cont.):</b>		<b>S</b>		<b>S</b>	<b>I</b>		<b>V</b>			
40	<b>cebador (cont.):</b>		<b>A16T</b>		<b>2930T</b>	<b>ATT</b>		<b>313233</b>			
	<b>sec. t. salvaje</b>		<b>AGT</b>		<b>AGC</b>	<b>ATT</b>		<b>GTA</b>			
	<b>(cont.):</b>										

45 Distribución de nucleótidos para cada posición dopada.

- 1: G91, A3, T3, C3
- 50 2: A13, C87
- 3: A40, T60
- 55 4: G3, A3, C94
- 5: A6, T94
- 6: G4, A4; T92
- 60 7: G2, A96, C2
- 8: G93, A3.5, C3.5
- 65 9: G87, A8, C5
- 10: A84; C16

## ES 2 294 846 T3

11: G93, T7  
12: G92, A5, T3  
5 13: A3, C97  
14: G3, A97  
15: G2, A2, T4, C92  
10 16: G93, A7  
17: G93, C7  
15 18: A90, T10  
19: G4, A96  
20: G95, A5  
20 21: G96, A4  
22: G3, C97  
25 23: G2, A1, T95, C2  
24: A3, C97  
25: G95, A3, C2  
30 26: G2, A96, C2  
27: A5, C95  
35 28: A95, T5  
29: G2, A98  
30: G94, A4, C2  
40 31: G94, A3, T1, C2  
32: A4, T96  
45 33: A20, C80

Cebador: FAMGIV (SEC ID NO: 8)

50

[0162]

55 5'-GTG TCG CTG GAC TTC TTC AAG 123 45A 6AC 78C 910T 11CT 1213T  
1415A 1617C 18CC TAC 1920T A2122 2324C AGT 1425C 2627G T28T A16T  
2930C ATT 313233 GAT GCC GTG AAG ACT TTC GCC GA-3'

60 Cebador RAMGVI (SEC ID NO: 9)

[0163] 5'-ctt gaa gaa gtc cag cga cac-3'

65

## ES 2 294 846 T3

### *Mutagénesis aleatoria*

Los oligonucleótidos adicionados que aparecen en la Tabla 2 y 3 (que por término común es designado FAMG) y los cebadores inversos RAMG para la región L19-G35 y los cebadores específicos de la SEC ID NO: 2 que cubren el terminal N (FG2: 5'-CAT CCC CAG GAT CCT TAC TCA GCA ATG-3' (SEC ID NO: 10) y el terminal C (RG2: 5'-CTC AAA CGA CTC ACC AGC CTC TAG AGT (SEC ID NO: 11) se utilizan para generar fragmentos de biblioteca de PCR por el método de extensión de superposición (Horton *et al.*, Gene, 77 (1989), págs. 61-68) con una superposición de 21 pares de bases. El plásmido pAMGY es un patrón para la reacción en cadena de la polimerasa. Los fragmentos de la PCR son clonados por recombinación homóloga en el vector transportador pAMGY de *E. coli*/levadura (ver Materiales y Métodos).

### *Selección*

La biblioteca fue seleccionada en los ensayos de filtro de termoestabilidad usando un filtro Protran e incubando a 67-69°C, como se describe en el apartado de "Materiales y Métodos" arriba

### Ejemplo 3

*Construcción, por redistribución de PCR adicionada con oligos de ADN, de variantes de AMG de A. niger con termoestabilidad mejorada en comparación con la enzima progenitora*

El método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue usado para preparar fragmentos de ADN llevando el gen AMG y las regiones flanqueantes. Aproximadamente 10 ug de ADN fue digerido con ADNsa, y realizado sobre un 2% de gel de agarosa. Se purificaron fragmentos de 50-150 bp del gel. Aproximadamente 1 ug de fragmentos purificados fueron mezclados con un exceso molar de 5-15 veces de oligos llevando las mutaciones deseadas. Los oligos fueron del siguiente tipo (para la construcción de Hklib1, Hklib2, Hklib3 etc., respectivamente):

(Secuencia pasa a página siguiente)

**Hklib1:**

**Hk1-T2X:**

[0167] 5'-ATGTGATTTCCAAGCGCGGVNNTTGGATTCATGGTTGAGCAA

5

**Hk1-N9X:**

[0168] 5'-CCTTGGATTCATGGTTGAGCVNNGAAGCGACCGTGGCTCGTAC

**Hk1-A11X:**

10

[0169] 5'-ATTCATGGTTGAGCAACGAAVNNACCGTGGCTCGTACTGCCAT

**Hk1-L66X:**

15

[0170] 5'-TCCTCAAGACCCTCGTCGATVNNTTCCGAAATGGAGATACCAG

**Hk1-S386X:**

[0171] 5'-CTTTCGCCGATGGCTTCGTCVNNATTGTGGAAACTCACGCCGC

20

**Hk1-E389X:**

[0172] 5'-ATGGCTTCGTCTCTATTGTGVNNACTCACGCCGCAAGCAACGG

**Hk1-T390X:**

25

[0173] 5'-GCTTCGTCTCTATTGTGGAAVNNCACGCCGCAAGCAACGGCTC

**Hk1-A393X:**

30

[0174] 5'-CTATTGTGGAAACTCACGCCVNNAGCAACGGCTCCATGTCCGA

**Hk1-S394X:**

[0175] 5'-TTGTGGAAACTCACGCCGCAVNNAACGGCTCCATGTCCGAGCA

35

**Hk1-N395X:**

[0176] 5'-TGGAAACTCACGCCGCAAGCVNNGGCTCCATGTCCGAGCAATA

**Hk1-G396X:**

40

[0177] 5'-AAACTCACGCCGCAAGCAACVNNTCCATGTCCGAGCAATACGA

**Hk1-K404X:**

45

[0178] 5'-CCATGTCCGAGCAATACGACVNNTCTGATGGCGAGCAGCTTTC

**Hk1-D406X:**

[0179] 5'-CCGAGCAATACGACAAGTCTVNNGGCGAGCAGCTTTCGCTCG

50

**Hk1-E408X:**

[0180] 5'-AATACGACAAGTCTGATGGCVNNCAGCTTTCGCTCGCGACCT

**Hk1-L410X:**

55

[0181] 5'-ACAAGTCTGATGGCGAGCAGVNNTCCGCTCGCGACCTGACCT

**Hk1-L423X:**

60

[0182] 5'-CCTGGTCTTATGCTGCTCTGVNNACCGCCAACAACCGTCGTAA

**Hk1-N426X:**

[0183] 5'-ATGCTGCTCTGCTGACCGCCVNNAACCGTCGTAACCTCCGTCGTG

**Hk1-N427X:**

65

[0184] 5'-CTGCTCTGCTGACCGCCAACVNNCGTGTAACCTCCGTCGTGCCT

**Hk1-Y402X:**

[0185]

5 5'-ACGGCTCCATGTCCGAGCAANNCGACAAGTCTGATGGCGAGCAGCT

**Hklib2:**

10

**Hk2-L234X-SENTIDO:**

[0186] 5'-CTGGACCGGCAGCTTCATTNNKGCCAACTTCGATAGCAGCC

15

**Hk2-A235S-ANTISENTIDO:**

[0187] 5'-GAACGGCTGCTATCGAAGTTAGACAGAATGAAGCTGCCGGTC

20

**Hk2-F237X-SENTIDO:**

[0188] 5'-CAGCTTCATTCTGGCCAACNATGATAGCAGCCGTTCCGGCA

25

**Hk2-D238T-ANTISENTIDO:**

[0189] 5'-CCTTGCCGGAACGGCTGCTAGTGAAGTTGGCCAGAATGAAGC

30

**Hk2-D238S-ANTISENTIDO:**

[0190] 5'-CCTTGCCGGAACGGCTGCTAGAGAAGTTGGCCAGAATGAAGC

35

**Hk2-S239X-SENTIDO:**

[0191] 5'-TCATTCTGGCCAACTTCGATNNCAGCCGTTCCGGCAAGGACG

40

**Hk2-S240G-ANTISENTIDO:**

[0192] 5'-TTGCGTCCTTGCCGGAACGACCGCTATCGAAGTTGGCCAGAA

45

**Hk2-S242X-ANTISENTIDO:**

[0193] 5'-GGGTGTTTGCCTTCCAKNACGGCTGCTATCGAAGTTG

**Hk2-G243X-ANTISENTIDO:**

[0194] 5'-GGAGGGTGTGTTGCGTCCTTAKNGGAACGGCTGCTATCGAA

50

**Hk2-K244R-SENTIDO:**

[0195] 5'-CGATAGCAGCCGTTCCGGCAGAGACGCAAACACCCTCCTGG

55

**Hk2-T310V-ANTISENTIDO:**

[0196] 5'-ACGGGTTGCCGTTGTAGTAAACGTCCTCAGGGTACCGACCC

60

**Hk2-T310S-ANTISENTIDO:**

[0197] 5'-ACGGGTTGCCGTTGTAGTAAAGAGTCCTCAGGGTACCGACCC

65

**Hk2-Y311N-SENTIDO:**

[0198] 5'-TCGGTACCCTGAGGACACGAATTACAACGGCAACCCGTGGT

**Hk2-Y312Q-ANTISENTIDO:**

[0199] 5'-GGAACCACGGGTTGCCGTTTTGGTACGTGTCCTCAGGGTAC

**Hk2-Y312N-ANTISENTIDO:**

[0200] 5'-GGAACCACGGGTTGCCGTTATTGTACGTGTCCTCAGGGTAC

**Hk2-N313T-SENTIDO:**

[0201] 5'-CCCTGAGGACACGTACTACACTGGCAACCCGTGGTTCCTGT

**Hk2-N313S-SENTIDO:**

[0202] 5'-CCCTGAGGACACGTACTACTCTGGCAACCCGTGGTTCCTGT

**Hk2-N313G-SENTIDO:**

[0203] 5'-CCCTGAGGACACGTACTACGGTGGCAACCCGTGGTTCCTGT

**Hk2-N315Q-ANTISENTIDO:**

[0204] 5'-AGGTGCACAGGAACCACGGTTGGCCGTTGTAGTACGTGTCC

**Hk2-N315E-ANTISENTIDO:**

[0205] 5'-AGGTGCACAGGAACCACGGTTCGCCGTTGTAGTACGTGTCC

**Hk2-N315R-ANTISENTIDO:**

[0206] 5'-AGGTGCACAGGAACCACGGTCTGCCGTTGTAGTACGTGTCC

**Hk2-F318Y-ANTISENTIDO:**

[0207] 5'-CGGCAGCCAAGGTGCACAGATACCACGGGTTGCCGTTGTAG

**Hk2-Q409P-SENTIDO:**

[0208] 5'-CGACAAGTCTGATGGCGAGCCACTTCCGCTCGCGACCTGA

**Hklib3:**

**Hk3-D336X-SENTIDO:**

[0209] 5'-CGATGCTCTATACCAGTGGNNKAAGCAGGGGTCGTTGGAGG

**Hk3-K337X-SENTIDO:**

[0210] 5'-TGCTCTATACCAGTGGGACNNKCAGGGGTCGTTGGAGGTCA

**Hk3-Q338X-ANTISENTIDO :**

[0211] 5'-CTGTGACCTCCAACGACCCGNNCTTGTCCCACTGGTATAGA

**Hk3-G339X-SENTIDO:**

[0212] 5'-ATACCAGTGGGACAAGCAGNCUTCGTTGGAGGTCACAGATG

**Hk3-S340X'-ANTISENTIDO:**

[0213] 5'-ACACATCTGTGACCTCCAAANTCCCCTGCTTGTCCCACTGG

**Hk3-S340X''-ANTISENTIDO:**

[0214] 5'-ACACATCTGTGACCTCCAAANCCCCCTGCTTGTCCCACTGG

**Hk3-L341X-SENTIDO:**

[0215] 5'-GTGGGACAAGCAGGGGTCGNUUGAGGTCACAGATGTGTCCG

5

**Hk3-K352Q-SENTIDO:**

[0216] 5'-TGTGTCGCTGGACTTCTTCCAAGCACTGTACAGCGATGCTG

10

**Hk3-K352R-SENTIDO:**

[0217] 5'-TGTGTCGCTGGACTTCTTCAAGCACTGTACAGCGATGCTG

15

**Hk3-A353D-ANTISENTIDO:**

[0218] 5'-TAGCAGCATCGCTGTACAGATCCTTGAAGAAGTCCAGCGAC

20

**Hk3-A353S-ANTISENTIDO:**

[0219] 5'-TAGCAGCATCGCTGTACAGAGACTTGAAGAAGTCCAGCGAC

25

**Hk3-S356P-SENTIDO:**

[0220] 5'-ACTTCTTCAAGGCACTGTACCCAGATGCTGCTACTGGCACCT

30

**Hk3-S356N-SENTIDO:**

[0221] 5'-ACTTCTTCAAGGCACTGTACAAUGATGCTGCTACTGGCACCTA

35

**Hk3-S356D-SENTIDO:**

[0222] 5'-ACTTCTTCAAGGCACTGTACGAUGATGCTGCTACTGGCACCTA

40

**Hk3-D357S-ANTISENTIDO:**

[0223] 5'-GAGTAGGTGCCAGTAGCAGCAGAGCTGTACAGTGCCTTGAAGA

45

**Hk3-A359S-SENTIDO:**

[0224] 5'-GGCACTGTACAGCGATGCTTCTACTGGCACCTACTCTTCGT

50

**Hk3-T360V-ANTISENTIDO:**

[0225] 5'-TGGACGAAGAGTAGGTGCCAACAGCAGCATCGCTGTACAGT

55

**Hk3-G361X-SENTIDO:**

[0226] 5'-TGTACAGCGATGCTGCTACTNCTACCTACTCTTCGTCCAGTTC

60

**Hk3-T362R-ANTISENTIDO:**

[0227] 5'-GTCGAACTGGACGAAGAGTATCTGCCAGTAGCAGCATCGCTG

65

**Hk3-S364X-SENTIDO:**

[0228] 5'-TGCTGCTACTGGCACCTACNNKTCGTCCAGTTCGACTTATAG

70

**Hk3-S65X-SENTIDO:**

[0229] 5'-TGCTACTGGCACCTACTCTNNKTCAGTTCGACTTATAGTAG

75

**Hk3-S366T-ANTISENTIDO:**

[0230] 5'-ATGCTACTATAAGTCGAACTAGTCGAAGAGTAGGTGCCAGTA

**Hk3-S368X-ANTISENTIDO:**

[0231] 5'-TCTACAATGCTACTATAAGTAGNACTGGACGAAGAGTAGGTG

**Hk3-T369X-SENTIDO:**

[0232] 5'-CTACTCTTCGTCCAGTTCGNNKTATAGTAGCATTGTAGATGCC

**Hk3-S371X-ANTISENTIDO:**

[0233] 5'-TTCACGGCATCTACAATGCTATNATAAGTCGAACTGGACGAAG

**Hk3-S372X-SENTIDO:**

[0234] 5'-CGTCCAGTTCGACTTATAGTNNTATTGTAGATGCCGTGAAGAC

A la mezcla de ADN tratado con ADNsa y óligos se añadió nucleótidos, tampón PCR y polimerasa Taq/Pwo. Se realizó una reacción de ensamblaje PCR usando primero 94°C durante 2 min., luego 35-40 ciclos con los siguientes tiempos de incubación: 94°C; 30 seg.; 45°C; 30 seg.; 72°C; 60 seg; luego finalmente 72°C durante 5 min. Se realizó una reacción de amplificación PCR con 1 uL de la reacción de ensamblaje como patrón y añadiendo cebadores que anclan para las regiones flanqueantes del gen AMG. Parámetros: primero 94°C durante 2 min., luego 35-40 ciclos con los siguientes tiempos de incubación: 94°C; 30 seg.; 55°C; 30 seg.; 72°C; 90 seg; luego finalmente 72°C durante 10 min.

El producto resultante de la PCR fue purificado de un 1% de gel de agarosa, mezclado con vector linealizado y transformado en células de levadura competentes del modo descrito anteriormente.

## Ejemplo 4

*Actividad específica*

Se construyeron variantes de AMG G2 del modo descrito anteriormente en el ejemplo 1. Se midió la actividad específica como  $K_{cat}$  sobre muestras purificadas a pH 4,3, 37°C, usando maltosa y maltoheptosa como sustrato como se describe en el apartado de "Materiales y Métodos" arriba. También se midió la actividad específica como AGU/mg a pH 4,3, 37°C, usando maltosa como sustrato como se describe en el apartado de "Materiales y Métodos" arriba.

Variante	Kcat (sec.-1)	
	Maltosa	Maltoheptosa
AMG G2 (tipo salvaje)	6,0	38
N110T	9,7	27,8
V111P	12,0	43,2
S119P	6,2	44,0
G127A	21,0	40,0
G207N	30,5	36,3

ES 2 294 846 T3

Variante	AGU/mg
AMG G2 (tipo salvaje)	1,8
N110T	3,5
V111P	3,1
S119P	2,1
G127A	5,8
G207N	5,7
L3N	2,3
S56A	2,6
A102*	2,5
D403S	2,2
I18V+T51S+S56A+V59T+L60A	3,3
S119P+Y402F	2,7
S119P+I189T+Y223F+F227Y+Y402F	3,0

Ejemplo 5

Termoestabilidad a 70°C

Se construyó una variante de AMG G2 S119P usando el procedimiento descrito en el ejemplo 1.

La termoestabilidad fue determinada como  $T_{1/2}$  usando el Método I, y como % de actividad residual tras la incubación durante 30 minutos en 50 mM de NaOAc, pH 4,5, 70°C; 0,2 AGU/ml, como se describe en el apartado de "Materiales y Métodos" arriba. El resultado de las pruebas está relacionado en la tabla abajo y en comparación con AMG G2 de *A. niger* de tipo salvaje.

<i>A. niger</i> AMG (Enzima)	Actividad Residual (%)	$T_{1/2}$ (min.)
variante S119P	22	17
tipo salvaje (SEQ ID NO: 2)	13	8

## ES 2 294 846 T3

### Ejemplo 6

#### Termoestabilidad a 68°C

5 Se construyeron variantes de AMG G2 usando el procedimiento descrito en el ejemplo 3, salvo las variantes nos. 1 y 2 en la tabla abajo, que fueron preparadas por redistribución como se describe en WO 95/22625 (de Affymax Technologies N.V.). La termoestabilidad fue determinada como  $T_{1/2}$  usando el método I a 68°C como se describe en el apartado de "Materiales y Métodos" y en comparación con AMG G2 de *A. niger* de tipo salvaje según las mismas condiciones. Se realizó la evaluación de las variantes en el caldo de cultivo después de filtrar los sobrenadantes.

10

	Variante	$T_{1/2}$ (min)	$T_{1/2}$ <i>A. niger</i> AMG G2 (tipo salvaje) (min)
15	1 A246T+T72I	11,3	8,5
	2 G447S+S119P	11,4	7,9
20	3 E408R+A425T+S465P+T494A	8,6	8,1
	4 E408R+S386N	12,6	8,9
	5 T2P	9,3	8,5
25	6 T2Q+A11P+S394R	10,7	8,5
	7 T2H	9,5	8,9
	8 A11E+E408R	12,7	9,3
30	9 T2M+N9A+T390R+D406N+L410R	10,7	8,5
	10 A393R	17,7	8,4
	11 T2R+S386R+A393R	14,1	8,4
35	12 A393R+L410R	14,7	7,9
	13 A1V+L66R+Y402F+N427S+S486G	11,7	8,5
40	14 T2K+S30P+N427M+S444G+V470M	11,4	8,4

45

Termoestabilidad a 70°C en muestras purificadas.		
	Enzima	$T_{1/2}$ (min)
15	AMG G2 (wild type)	7,4
50	16 T2E+T379A+S386K+A393R	11,6
	17 E408R+S386N	10,2
	18 T2Q+A11P+S394R	9,8
55	19 A1V+L66R+Y402F+N427S+S486G	14,1
	20 A393R	14,6
	21 T2R+S386R+A393R	14,1
60	22 A393R+L410R	12,9
	23 Y402F	10,1

65

## ES 2 294 846 T3

### Ejemplo 7

#### Termoestabilidad a 68°C

5 Se construyeron variantes de AMG G2 por redistribución usando el procedimiento descrito en el ejemplo 3 seguido de redistribución de variantes positivas.

10 La termoestabilidad fue determinada como  $T_{1/2}$  usando el Método I a 68°C como se describe en el apartado de "Materiales y Métodos" y en comparación con el AMG G2 de *A. niger* de tipo salvaje bajo las mismas condiciones. Se realizó la evaluación de las variantes en el caldo de cultivo después de filtrar los sobrenadantes.

	Variante	$T_{1/2}$ (min)	$T_{1/2}$ <i>A. niger</i> AMG G2 (tipo salvaje) (min)	
15				
20	24	PLASD <sup>i</sup> +V59A+A393R+T490A	27,2	6,8

**i = Extensión del N-terminal**

### 25 Ejemplo 8

#### Termoestabilidad a 68°C

30 Se construyeron variantes de AMG G2 usando el procedimiento descrito en el ejemplo 3. La termoestabilidad fue determinada como  $T_{1/2}$  usando el Método I a 68°C como se describe en el apartado de "Materiales y Métodos" y en comparación con el AMG G2 de *A. niger* de tipo salvaje bajo las mismas condiciones. Se realizó la evaluación de las variantes en el caldo de cultivo después de filtrar los sobrenadantes.

	Variante	$T_{1/2}$ (min)	$T_{1/2}$ <i>A. niger</i> AMG G2 tipo salvaje (min)	
35				
40	25	D357S+T360V+S371H	6,6	5,9
45	26	N313G+F318Y	8,9	5,9
50	27	S356P+S366T	7,3	5,8
	28	S340G+D357S+T360V+S386P	7,2	5,8

### Ejemplo 9

#### 55 Termoestabilidad a 70°C

Se construyeron las variantes de AMG G2 usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1 y se evaluó como muestras semipurificadas (filtración de caldo de cultivo seguido de desalación en un columna G-25).

60 La termoestabilidad fue determinada como % de actividad residual usando el Método I en 50 mM de NaOAc, pH 4,5, 70°C, como se describe en el apartado de "Materiales y Métodos" arriba. El resultado de la prueba está relacionado en la tabla abajo y en comparación con el AMG G2 de *A. niger* de tipo salvaje.

65

## ES 2 294 846 T3

	Enzima	T <sub>1/2</sub> (min)
29	AMG G2 (tipo salvaje)	7
30	Y402F+S411V	60
31	S119P+Y402F+S411V	115
32	S119P+Y312Q+Y402F+T416H	50

### Ejemplo 10

*Termoestabilidad a 70°C en presencia de 30% glucosa*

Se construyeron variantes de AMG G2 usando el procedimiento descrito en el ejemplo 3.

La termoestabilidad fue determinada como T<sub>1/2</sub> usando el Método II a 70°C como se describe en el apartado de "Materiales y Métodos" y en comparación con el AMG G2 de *A. niger* de tipo salvaje bajo las mismas condiciones.

	Enzima	T <sub>1/2</sub> (hr)
33	AMG G2 (tipo salvaje)	1,5
34	Y402F	2,5
35	A393R	4,0
36	T2R+S386R+A393R	2,0
37	PLASD(N-terminal)+V59A+A393R+T490A	16,0

### Ejemplo 11

*Rendimiento de sacarificación de variantes de AMG S119P+Y402F+S411V y PLASD(N-terminal)+V59A+A393R+T490A, respectivamente*

Se evaluó el rendimiento de sacarificación de las variantes de AMG S119P+Y402F+S411V y PLASD(N-terminal)+V59A+A393R+T490A, respectivamente, ambos teniendo termoestabilidad mejorada a 70°C como se describe abajo.

La enzima de referencia es el AMG G2 de *A. niger* de tipo salvaje. La sacarificación es realizada bajo las condiciones siguientes:

Substrato	10 DE Maltodextrina, aprox. 30% DS (p/p)
Temperatura	70°C
pH inicial	4,3 (a 70°C)
Dosificación de Enzima	0,24 AGU/g DS

### *Sacarificación*

Se hace el sustrato para la sacarificación disolviendo maltodextrina (obtenida de maíz común) en agua purificada con un sistema Milli-Q en ebullición y ajustando la materia seca a aproximadamente 30% (p/p). El pH es ajustado a 4,3. Partes alícuotas del sustrato correspondiente a 15 g de materia seca son transferidas a frascos de vidrio con tapón azul de 50 ml y colocados en un baño de agua con agitación. Se añaden las enzimas y se reajusta el pH si es necesario. El experimento es realizado por duplicado. Se toman muestras periódicamente y se analizan en HPLC para determinar la composición del carbohidrato.

**Referencias citadas en la descripción**

Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

**Documentos de patente citados en la descripción**

10 WO 9928448 A [0024] [0027]  
 US 4683202 A [0048]  
 US 4760025 A [0049]  
 15 WO 9522625 A [0068] [0240]  
 WO 9600343 A [0068]  
 WO 9117243 A [0075]  
 20 WO 9735956 A [0083] [0109]  
 EP 238023 A [0084]  
 25 JP 3224493 A [0099]  
 JP 1191693 A [0099]  
 JP 62272987 A [0099]  
 30 EP 452238 A [0099]  
 WO 9927124 A [0099]  
 35 EP 37856 A [0135] [0138]  
 US 5162498 A [0135] [0138]

**Literatura que no forma parte de patentes citada en la descripción**

40 **SVENSSON** *et al. Carlsberg Res. Commun*, 1983, vol. 48, 529.-544 [0005]  
*Eur. J. Biochem.*, 1986, vol. 154, 497-502 [0005]  
 45 **ALESHIN** *et al. J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 19291-19298 [0005]  
**HARRIS** *et al. Biochemistry*, 1993, vol. 32, 1618-1626 [0005]  
**ALESHIN** *et al. Biochemistry*, 1996, vol. 35, 8319-8328 [0005] [0005]  
 50 **SIERKS** *et al. Protein Engng*, 1990, vol. 3, 193-198 [0005] [0005]  
**FRANSEN** *et al. Biochemistry*, 1994, vol. 33, 13808-13816 [0005]  
 55 **SIERKS** *et al. Protein Engng*, 1989, vol. 2, 621-625 [0005]  
**BERLAND** *et al. Biochemistry*, 1995, vol. 34, 10153-10161 [0005]  
**FRANSEN** *et al. Biochemistry*, 1995, vol. 34, 10162-10169 [0005]  
 60 **CHEN** *et al. Prot. Engng*, 1996, vol. 9, 499-505 [0006]  
**CHEN** *et al. Prot. Engng*, 1995, vol. 8, 575-582 [0006]  
 65 **CHEN** *et al. Biochem. J.*, 1994, vol. 301, 275-281 [0006]  
**FIEROBE** *et al. Biochemistry*, 1996, vol. 35, 8698-8704 [0006]

## ES 2 294 846 T3

- LI et al.** *Protein Engng*, 1997, vol. 10, 1199-1204 [0006]
- MCCAMMON, JA HARVEY, SC** Dynamics of proteins and nucleic acids Cambridge University Press 1987. [0021]
- 5 **STOUT, GH JENSEN, LH** X-ray structure determination Wiley 1989. [0021]
- EMBO J.*, vol. 3, no. 5. 1097-1102 [0027]
- 10 **NEEDLEMAN, S.B WUNSCH, C.D** *Journal of Molecular Biology*, 1970, vol. 48, 443-453 [0030]
- BOEL et al.** *EMBO J.*, 1984, vol. 3, no. 5. 1097-1102 [0032] [0044] [0106]
- 15 **J. SAMBROOK E.F. FRITSCH T. MANIATUS** Molecular Cloning, A Laboratory Manual Cold Spring Harbor 1989. [0034]
- BOLTON MCCARTHY** *Proceedings of the National Academy o Sciences USA*, 1962, vol. 48, 1390- [0038]
- S.L. BEAUCAGE M.H. CARUTHERS** *Tetrahedron Letters*, 1981, vol. 22, 1859-1869 [0047]
- 20 **MATTHES et al.** *EMBO J.*, 1984, vol. 3, 801-805 [0047]
- R.K. SAIKI et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 487-491 [0048]
- 25 **MORINAGA et al.** *Biotechnology*, 1984, vol. 2, 646-639 [0049]
- NELSON LONG** *Analytical Biochemistry*, 1989, vol. 180, 147-151 [0050]
- SIERKS et al.** *Protein Eng.*, 1989, vol. 2, 621-625 [0051]
- 30 **SIERKS et al.** *Protein Eng.*, 1990, vol. 3, 193-198 [0051]
- LEUNG et al.** *Technique*, 1989, vol. 1, 11-15 [0060]
- 35 **FOWLER et al.** *Molec. Gen. Genet.*, 1974, vol. 133, 179-191 [0061]
- ALBER et al.** *J. Mol. Appl. Genet.*, 1982, vol. 1, 419-434 [0072]
- SAMBROOK et al.** Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harborl 1989. [0076]
- 40 **G.M.A. VAN BEYNUM et al.** Starch Conversion Technology Marcel Dekker 1985. 101-142 [0101]
- MURAKAMI K et al.** *Agric. Biol. Chem.*, 1991, vol. 55, 2807-2811 [0109]
- 45 **G. MAY** Applied Molecular Genetics of Filamentous Fungi 1992. 1-25 [0109]
- EMBO J.*, 1984, vol. 3, no. 7. 1581-1585 [0111]
- 50 **J.S.OKKELS** A URA3-promoter deletion in a pYES vector increases the expression level of a fungal lipase in *Saccharomyces cerevisiae*. Recombinant DNA Biotechnology *The Integration of Biological and Engineering Sciences*, 1996, vol. 782, [0113]
- ALBERT KARWASAKI** *J. Mol. Appl Genet.*, 1982, vol. 1, 419-434 [0113]
- 55 **SHERMAN et al.** Methods in Yeast Genetics Cold Spring Harbor Laboratory 1981. [0121]
- HYNES et al.** *Mol. and Cel. Biol.*, 1983, vol. 3, no. 8. 1430-1439 [0123]
- COVE** *Biochem. Biophys. Acta*, 1966, vol. 113, 51-56 [0123]
- 60 **TOMANDL, D et al.** *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 1997, vol. 11, 29-38 [0142]
- JENSEN, LJ ANDERSEN, KV SVENDSEN, A KRETZSCHMAR, T** *Nucleic Acids Research*, 1998, vol. 26, 697-702 [0142]
- 65 **HORTON et al.** *Gene*, 1989, vol. 77, 61-68 [0164]

REIVINDICACIONES

- 5 1. Variante de una glucoamilasa progenitora que tiene mejor termoestabilidad con respecto a la glucoamilasa progenitora comprendiendo una o más mutaciones en la(s) siguiente(s) posición(es) en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO:2 E408R+A425T+S465P+T494A, E408R+S386N, T2Q+A11P+S394R, A11E+E408R, T2M+N9A+T390R+0406N+L410R, A393R, T2R+S386R+A393R, A393R+L410R, A1V+L66R+Y402F+N427S+S486G, T2E+T379A+S386K+A393R, T2R+S386R+A393R, Y402F, V59A+A393R+T490A, y una extensión del N-terminal que consiste en PLASD Y402F+S411V, S119P+Y402F+S411V, S119P+Y312Q+Y402F+T416H, y/o en una posición correspondiente en una glucoamilasa homóloga que exhibe un grado de identidad de al menos un 60% con las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEC ID NO: 2.
- 10 2. Variante según cualquiera de la reivindicación 1, donde la glucoamilasa homóloga progenitora es la glucoamilasa de *Aspergillus niger* G1.
- 15 3. Variante según cualquiera de la reivindicaciones 1-2, donde la glucoamilasa es una glucoamilasa truncada, en particular en el C-terminal.
- 20 4. Constructo de ADN comprendiendo una secuencia de ADN que codifica una variante de glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Vector de expresión recombinante que lleva un constructo de ADN según la reivindicación 4.
- 25 6. Célula que es transformada con un constructo de ADN según la reivindicación 4 o un vector según la reivindicación 5.
7. Célula según la reivindicación 6, que es un microorganismo, tal como una bacteria o un hongo.
8. Célula según la reivindicación 7, que es un *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger* deficiente en proteasa.
- 30 9. Proceso para convertir almidón de almidón parcialmente hidrolizado en un jarabe conteniendo dextrosa, dicho proceso incluyendo la fase de sacarificar el almidón hidrolizado en presencia de una variante de glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
- 35 10. Proceso según la reivindicación 9, donde la dosificación de glucoamilasa está presente en el rango de 0,05 a 0,5 AGU por gramo de materia seca.
- 40 11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, comprendiendo la sacarificación de un almidón hidrolizado de al menos 30 por ciento en peso de materia seca.
- 45 12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 9-11, donde la sacarificación es conducida en presencia de una enzima desramificante seleccionada del grupo de pululanasa e isoamilasa, preferiblemente una pululanasa derivada de *Bacillus acidopullulyticus* o *acillus deramificans* o una isoamilasa derivada de *Pseudomonas amyloclavata*.
- 50 13. Proceso de cualquiera de las reivindicaciones 9-12, donde la sacarificación es conducida a un pH de 3 a 5,5 y a una temperatura de 60-80°C. preferiblemente 63-75°C, durante 24 a 72 horas, preferiblemente durante 36-48 horas a un pH de 4 a 4,5.
- 55 14. Método de sacarificación de una solución de almidón licuado, cuyo método comprende
- (i) una fase de sacarificación durante cuya fase se realiza uno o más estadios de sacarificación enzimática, y la fase posterior de
- (ii) una o más fases de separación por membrana a alta temperatura donde la sacarificación enzimática se realiza usando una variante de glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 60 15. Uso de una variante de glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en un proceso de conversión de almidón.
- 65 16. Uso de una variante de glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en un proceso de conversión de almidón continuo.
17. Uso según la reivindicación 16, donde el proceso de conversión de almidón continuo incluye un proceso de sacarificación continuo según la reivindicación 14.
18. Uso de una variante de glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en un proceso para producir oligosacáridos.

## ES 2 294 846 T3

19. Uso de una variante de glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en un proceso para producir jarabes especializados.

5 20. Uso de una variante de glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en un proceso para producir etanol para combustible.

21. Uso de una variante de glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en un proceso para producir una bebida.

10 22. Uso de una variante de glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en un proceso de fermentación para producir compuestos orgánicos, tales como ácido cítrico, ácido ascórbico, lisina, ácido glutámico.

15 23. Método para mejorar la termoestabilidad de una glucoamilasa progenitora haciendo una mutación en una o más de la(s) siguiente(s) posición(es) en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO:2: E408R+A425T+S465P+T494A, E408R+S386N, T2Q+A11P+S394R, A11E+E408R, T2M+N9A+T390R+D408N+L410R, A393R, T2R+S386R+A393R, A393R+L410R, A1V+L66R+Y402F+N427S+S486G, T2E+T379A+S386K+A393R.

20 T2R+S386R+A393R, Y402F, V59A+A393R+T490A, y una extensión del N-terminal que consiste en PLASD, Y402F+S411V, S119P+Y402F+S411V, S119P+Y312Q+Y402F+T416H.

y/o en una posición correspondiente en una glucoamilasa homóloga que exhibe un grado de identidad de al menos un 60% con las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEC ID NO: 2.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

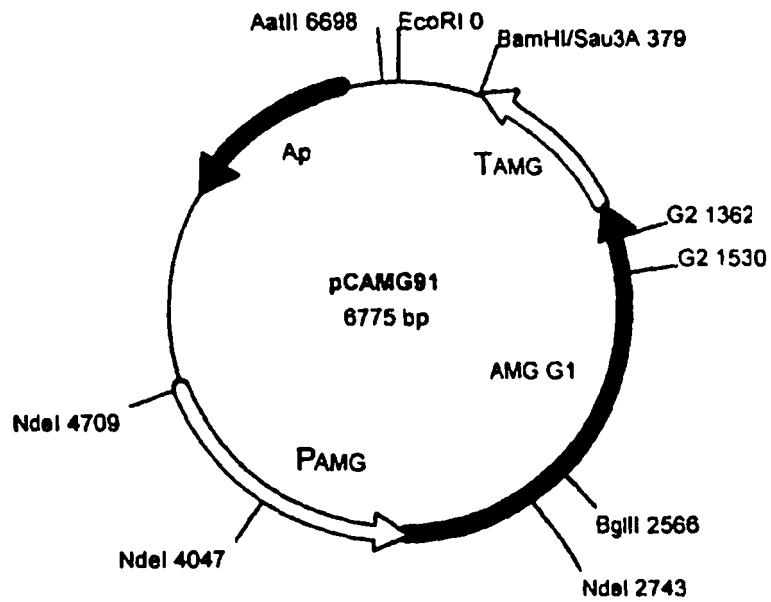


FIG. 1

# ES 2 294 846 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

### (1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE:
- (A) NOMBRE: NOVO NORDISK A/S
  - (B) CALLE: Novo Allé
  - (C) CIUDAD: DK-2880 Bagsvaerd
  - 10 (E) PAÍS: Dinamarca
  - (F) CÓDIGO POSTAL (Identificación de Zona Postal): DK-2880
  - (G) TELÉFONO: +45 4444 8888
  - 15 (H) TELEFAX: +45 4449 3256
- (ii) TÍTULO DE INVENCIÓN: Variantes de glucoamilasa
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 81
- 20 (iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: disquete
  - (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
  - 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.25 (EPO)

### (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 1:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 1605 pares de bases
  - (B) TIPO: ácido nucleico
  - 35 (C) TIPO DE CADENA: única
  - (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico
- 40 (A) DESCRIPCIÓN: /desc = "ADNc"
- (vi) FUENTE ORIGINAL:
- (B) CEPA: *Aspergillus Niger*
- 45 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: sig\_peptide
  - (B) UBICACIÓN: 1..72
- 50 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: mat\_peptide
  - (B) LOCALIZACIÓN: 73..1602
- 55 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
  - (B) LOCALIZACIÓN: 1..1602
- 60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 1:
- 65

ES 2 294 846 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

ATG TCG TTC CGA TCT CTA CTC GCC CTG AGC GGC CTC GTC TGC ACA GGG 48  
 Met Ser Phe Arg Ser Leu Leu Ala Leu Ser Gly Leu Val Cys Thr Gly  
 -24 -20 -15 -10

TTG GCA AAT GTG ATT TCC AAG CGC GCG ACC TTG GAT TCA TGG TTT AGC 96  
 Leu Ala Asn Val Ile Ser Lys Arg Ala Thr Leu Asp Ser Trp Leu Ser  
 -5 1 5

AAC GAA GCG ACC GTG GCT GGT ACT GCC ATC CTC AAT AAC ATC GGC GCG 144  
 Asn Glu Ala Thr Val Ala Arg Thr Ala Ile Leu Asn Asn Ile Gly Ala  
 10 15 20

GAC GGT GCT TGG GTG TCG GGC GCG GAC TCT GGC ATT GTC GTT GCT AGT 192  
 Asp Gly Ala Trp Val Ser Gly Ala Asp Ser Gly Ile Val Val Ala Ser  
 25 30 35 40

CCC AOC ACG GAT AAC CCG GAC TAC TTC TAC ACC TGG ACT CCG GAC TCT 240  
 Pro Ser Thr Asp Asn Pro Asp Tyr Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser  
 45 50 55

GGT CTC GTC CTC AAG ACC CTC GTC GAT CTC TTC CGA AAT GGA GAT ACC 288  
 Gly Leu Val Leu Lys Thr Leu Val Asp Leu Phe Arg Asn Gly Asp Thr  
 60 65 70

AGT CTC CTC TCC ACC ATT GAG AAC TAC ATC TCC GCC CAG GCA ATT GTC 336  
 Ser Leu Leu Ser Thr Ile Glu Asn Tyr Ile Ser Ala Gln Ala Ile Val  
 75 80 85

CAG GGT ATC AGT AAC CCC TCT GGT GAT CTG TCC AGC GGC GCT GGT CTC 384  
 Gln Gly Ile Ser Asn Pro Ser Gly Asp Leu Ser Ser Gly Ala Gly Leu  
 90 95 100

GGT GAA CCC AAG TTC AAT GTC GAT GAG ACT GCC TAC ACT GGT TCT TGG 432  
 Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asp Glu Thr Ala Tyr Thr Gly Ser Trp  
 105 110 115 120

ES 2 294 846 T3

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

GGA CGG CCG CAG CGA GAT GGT CCG GCT CTG AGA GCA ACT GCT ATG ATC 480  
 Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile  
 125 130 135

GGC TTC GGG CAG TGG CTG CTT GAC AAT GGC TAC ACC AOC ACC GCA ACC 528  
 Gly Phe Gly Gln Trp Leu Leu Asp Asn Gly Tyr Thr Ser Thr Ala Thr  
 140 145 150

GAC ATT GTT TGG CCC CTC GTT AGG AAC GAC CTG TCG TAT GTG GCT CAA 576  
 Asp Ile Val Trp Pro Leu Val Arg Asn Asp Leu Ser Tyr Val Ala Gln  
 155 160 165

TAC TGG AAC CAG ACA GGA TAT GAT CTC TGG GAA GAA GTC AAT GGC TCG 624  
 Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Leu Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser  
 170 175 180

TCT TTC TTT ACG ATT GCT GTG CAA CAC CCG GCC CTT GTC GAA GGT AGT 672  
 Ser Phe Phe Thr Ile Ala Val Gln His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser  
 185 190 195 200

GCC TTC GCG ACG GCC GTC GGC TCG TCC TGC TCC TGG TGT GAT TCT CAG 720  
 Ala Phe Ala Thr Ala Val Gly Ser Ser Cys Ser Trp Cys Asp Ser Gln  
 205 210 215

GCA CCC GAA ATT CTC TGC TAC CTG CAG TCC TTC TGG ACC GGC AGC TTC 768  
 Ala Pro Glu Ile Leu Cys Tyr Leu Gln Ser Phe Trp Thr Gly Ser Phe  
 220 225 230

ATT CTG GCC AAC TTC GAT AGC AGC CGT TCC GGC AAG GAC GCA AAC ACC 816  
 Ile Leu Ala Asn Phe Asp Ser Ser Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr  
 235 240 245

CTC CTG GGA AGC ATC CAC ACC TTT GAT CCT GAG GGC GCA TGC GAC GAC 864  
 Leu Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp  
 250 255 260

ES 2 294 846 T3

5 TCC ACC TTC CAG CCC TGC TCC CCG CGC GCG CTC GCC AAC CAC AAG GAG 912  
 Ser Thr Phe Gln Pro Cys Ser Pro Arg Ala Leu Ala Asn His Iys Glu  
 265 270 275 280

10 GTT GTA GAC TCT TTC CCG TCA ATC TAT ACC CTC AAC GAT GGT CTC AGT 960  
 Val Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr Thr Leu Asn Asp Gly Ieu Ser  
 285 290 295

15 GAC AGC GAG GCT GTT CCG GTG GGT CGG TAC CCT GAG GAC ACG IAC TAC 1000  
 Asp Ser Glu Ala Val Ala Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Thr Tyr Tyr  
 300 305 310

20 AAC GGC AAC CCG TGG TTC CTG TGC ACC TTC GCT CCC GCA GAG CAG TTG 1056  
 Asn Gly Asn Pro Trp Phe Leu Cys Thr Leu Ala Ala Ala Glu Gln Leu  
 315 320 325

25 TAC GAT GCT CTA TAC CAG TGG GAC AAG CAG GGG TCG TTG GAG GTC ACA 1104  
 Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp Lys Gln Gly Ser Leu Glu Val Thr  
 330 335 340

30 GAT GTG TCG CTG GAC TTC TTC AAG GCA CTG TAC AGC GAT GCT GGT ACT 1152  
 Asp Val Ser Leu Asp Phe Phe Lys Ala Leu Tyr Ser Asp Ala Ala Thr  
 345 350 355 360

35 GGC ACC TAC TCT TCG TCC AGT TCG ACT TAT AGT ACC ATT GTA GAT GCC 1200  
 Gly Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ser Ser Ile Val Asp Ala  
 365 370 375

40 GTG AAG ACT TTC CCC GAT GGC TTC GTC TCT ATT GTG GAA ACT CAC GCC 1248  
 Val Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe Val Ser Ile Val Glu Thr His Ala  
 380 385 390

45 GCA AGC AAC GGC TCC ATG TCC GAG CAA TAC GAC AAG TCT GAT GGC GAG 1296  
 Ala Ser Asn Gly Ser Met Ser Glu Gln Tyr Asp Lys Ser Asp Gly Glu  
 395 400 405

50 CAG CTT TCC GCT CGC GAC CTG ACC TGG TCT TAT GCT GCT CTG CTG ACC 1344  
 Gln Leu Ser Ala Arg Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr  
 410 415 420

55

60

65

ES 2 294 846 T3

5           GCC AAC AAC CGT CGT AAC TCC GTC GTG CCT GCT TCT TGG GGC GAG ACC           1392  
 Ala Asn Asn Arg Arg Asn Ser Val Val Pro Ala Ser Trp Gly Glu Thr  
 425                           430                           435                           440

10           TCT GCC AGC AGC GTG CCC GGC ACC TGT GCG GCC ACA TCT GCC ATT GGT           1440  
 Ser Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr Cys Ala Ala Thr Ser Ala Ile Gly  
                                  445                           450                           455

15           ACC TAC AGC AGT GTG ACT CTC ACC TCG TGG CCG AGT ATC GTG GCT ACT           1488  
 Thr Tyr Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Trp Pro Ser Ile Val Ala Thr  
                                  460                           465                           470

20           GGC GGC ACC ACT ACG ACG GCT ACC CCC ACT GGA TCC GGC AGC GTG ACC           1536  
 Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr  
                                  475                           480                           485

25           TCG ACC AGC AAG ACC ACC GCG ACT GCT AGC AAG ACC AGC ACC ACG ACC           1584  
 Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala Ser Lys Thr Ser Thr Thr Thr  
                                  490                           495                           500

30           GGC TCT GGT ATG TCA CTG TGA   1605  
 Arg Ser Gly Met Ser Leu  
 505   510

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID Nº: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 534 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 2:

Met Ser Phe Arg Ser Leu Leu Ala Leu Ser Gly Leu Val Cys Thr Gly  
 -24                           -20                           -15                           -10

Leu Ala Asn Val Ile Ser Lys Arg Ala Thr Leu Asp Ser Trp Leu Ser  
                                  -5                           1                           5

ES 2 294 846 T3

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

ES 2 294 846 T3

Ala Pro Glu Ile Leu Cys Tyr Leu Gln Ser Phe Trp Thr Gly Ser Phe  
 220 225 230

5

Ile Leu Ala Asn Phe Asp Ser Ser Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr  
 235 240 245

10

Leu Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp  
 250 255 260

15

Ser Thr Phe Gln Pro Cys Ser Pro Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Glu  
 265 270 275 280

20

Val Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr Thr Leu Asn Asp Gly Leu Ser  
 285 290 295

25

Asp Ser Glu Ala Val Ala Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Thr Tyr Tyr  
 300 305 310

30

Asn Gly Asn Pro Trp Phe Leu Cys Thr Leu Ala Ala Ala Glu Gln Leu  
 315 320 325

35

Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp Lys Gln Gly Ser Leu Glu Val Thr  
 330 335 340

40

Asp Val Ser Leu Asp Phe Phe Lys Ala Leu Tyr Ser Asp Ala Ala Thr  
 345 350 355 360

45

Gly Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ser Ser Ile Val Asp Ala  
 365 370 375

50

Val Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe Val Ser Ile Val Glu Thr His Ala  
 380 385 390

55

Ala Ser Asn Gly Ser Met Ser Glu Gln Tyr Asp Lys Ser Asp Gly Glu  
 395 400 405

60

Gln Leu Ser Ala Arg Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr  
 410 415 420

65

ES 2 294 846 T3

**Ala Asn Asn Arg Arg Asn Ser Val Val Pro Ala Ser Trp Gly Glu Thr**  
**425 430 435 440**

**Ser Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr Cys Ala Ala Thr Ser Ala Ile Gly**  
**445 450 455**

**Thr Tyr Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Trp Pro Ser Ile Val Ala Thr**  
**460 465 470**

**Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr**  
**475 480 485**

**Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala Ser Lys Thr Ser Thr Thr Thr**  
**490 495 500**

**Arg Ser Gly Met Ser Leu**  
**505 510**

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 20 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: misc-feature:
- (B) OTRAS INFORMACIONES: /desc = "Cebador 7258"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 3:

gaatgacttg gttgacgcgt caccagtcac

20

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 68 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: única
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: misc-feature:
- (B) OTRAS INFORMACIONES: /desc = "Cebador 21401"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 4:

## ES 2 294 846 T3

**ggggatcctg ataggactag ccatattaat gaagggcata taccacgcct**

**tggacctgcg ctatagcc**

**60**

5

### (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID Nº: 5:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 25 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: única

15

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc-feature:

20

(B) OTRAS INFORMACIONES: /desc = "Cebador 107581"

#### (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 5:

gcaacgaagc gccctggct cgtac

25

25

### (2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID Nº: 6:

#### (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30

(A) LONGITUD: 109 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: única

35

(D) TOPOLOGÍA: lineal

#### (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

#### (ix) CARACTERÍSTICA:

40

(A) NOMBRE/CLAVE: misc-feature:

(B) OTRAS INFORMACIONES: /desc = "Cebador FAMGII"

#### (ix) CARACTERÍSTICA:

45

(A) NOMBRE/CLAVE: misc-feature

(B) LOCALIZACIÓN: 30, 33, 42, 44, 47, 48, 51, 53, 56, 57, 58, 62, 63, 66, 69, 71, 72, 73, 74, 75

(D) OTRAS INFORMACIONES: /Note=

50

1: A10, C90

2: A6; T94

3: A95, C5

55

4: G95, C5

5: G91, A3, T3, C3

6: G95, A3, C2

7: G3, A95, C2

60

8: G92, A4, T4

9: A3, T97

10: G95, T5

65

11: G3, A97

12: G95, A2, C3

13: T5, C95

## ES 2 294 846 T3

14: G88, A8, C4

15: G7, A93

16: G4, C96

17: G4, A96

18: G95, A2, C3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 6:

**CGAAGCGACC GTGGCTCGTA CTGCCATC12 TA3TAACATC G4G5CG67CG**

**4T8CT91010GT G1112CG4CG13G 1415161718TGGCA TTGTCGTTGC**

**TAGTCCCAGC ACGGATAAC**

**109**

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc-feature:

(B) OTRAS INFORMACIONES: /desc = "Cebador RAMG1"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 7:

GATGGCAGTA CGAGCCACGG TCGCTTCG

28

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 110 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc-feature:

(B) OTRAS INFORMACIONES: /desc = "Cebador FAMGIV"

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc-feature

LOCALIZACIÓN: 22, 23, 24, 25, 26, 28, 31, 32, 34, 35; 37, 40, 41, 43, 44, 46, 47, 49, 55, 56, 59, 60; 61, 62, 67, 68, 70, 71, 74, 77, 79, 80, 85, 86, 87

(D) OTRAS INFORMACIONES: /Note=

1: G91, A3, T3, C3

2: A13, C87

3: A40, T60

4: G3, A3, C94

5: A6, T94

## ES 2 294 846 T3

5  
6: G4, A4, T92  
7: G2, A96, C2  
8: G93, A3.5, C3.5  
9: G87, A8, C5  
10  
10: A84, C16  
11: G93, T7  
12: G92, A5, T3  
13: A3, C97  
14: G3, A97  
15  
15: G2, A2, T4, C92  
16: G93, A7  
17: G93, C7  
18: A90, T10  
20  
19: G4, A96  
20: G95, A5  
21: G96, A4  
25  
22: G3, C97  
23: G2, A1, T95, C2  
24: A3, C97  
30  
25: G95, A3, C2  
26: G2, A96, C2  
27: A5, C95  
35  
28: A95, T5  
29: G2, A98  
30: G94, A4, C2  
40  
31: G94, A3, T1, C2  
32: A4, T96  
33: A20, C80

(xi) descripción de la secuencia: SEC ID NO: 8:

45  
**GTGTCGCTGG ACTTCTTCAA G12345A6AC 78C910T11CT12**  
**13T1415A1617C18C CTAC1920TA2122 2324CAGT1425C26**  
50  
**27GT18TA16T2930 CATT313233GAT GCCGTGAAGA CTTTCGCCGA 110**

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 9:

55 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
60 (C) TIPO DE CADENA: única  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

- 65 (A) NOMBRE/CLAVE: misc-feature:  
(B) OTRAS INFORMACIONES: /desc = "Cebador RAMGVI"

## ES 2 294 846 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 9:

CTTGAAGAAG TCCAGCGACA C

21

5

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

15

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc-feature

(B) OTRAS INFORMACIONES: /desc = "Cebador FG2"

20

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 10:

CATCCCCAGG ATCCTTACTC AGCAATG

27

25

(2) INFORMACIÓN DE LA SEC ID N°: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: única

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

35

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: misc-feature:

(B) OTRAS INFORMACIONES: /desc = "Cebador RG2"

40

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 11:

CTCAAACGAC TCACCAGCCT CTAGAGT

27

45

<210> 12

<211> 2602

<212> ADN

<213> *Aspergillus niger*

50

<220>

<221> sig\_peptide

<222> (270) ... (323)

55

<221> mat\_peptide

<222> (342) ... (2438)

60

<221> intrón

<222> (484) ... (558)

65

<221> intrón

<222> (846) ... (900)

ES 2 294 846 T3

<221> intrón  
<222> (998) ... (1058)

5 <221> intrón  
<222> (1697) ... (1754)

<400> 12

10	ttcgtcgcct aatgtotegt ccgttcocaa actgaagagc ttgaagtggc gagatgtctc	60
	tgcagggaatt caagctaget gctaagcgat attgcatggc aatctgtggt gatgcatgtg	120
	ctctctccctt cagcttccctt tcgtgcgagt gaggcttggc tataaatgga agtggctggc	180
15	cggggttccg tgaggggctg aagtgcctcc tcccttttag gcgcaactga gagcotgagc	240
	ttcatcccca gcabonttac aactongaan tgcctctccg atctctactc gccctgagcg	300
	gctcgtctg cacagggttg gcaaatgtga tttccnagcg cgcgacctg gattcatggt	360
20	tgagcaacga agcgacctg gctcgtactg ccctcctgaa taacatcggg gcggacggtg	420
	cttgggtgtc gggcgcggac tctggcattg tggttgctag tcccagcacg gataaccggg	480
	actgtatgtt tcgagctcag atttagtatg agtgbgtcat tgattgattg atgctgactg	540
25	ggtgtctggt tgtctgtagc ttctacaact ggactcggca ctctggcttc gccctcaaga	600
	ccctcgtcga tctctccga aatggagata ccagtctcct ctccaccatt gagnaactaca	660
	tctccgcccg ggcattgtc cagggtatca gtaacccttc tgggtgatctg tccagcggtc	720
	ctggctctcg tgaaccocag tcaaatgtcg atgagactgc ctacactggc tcttgggtac	780
30	ggcgcgagcg agatggctcg gctctgagag caactgctat gatcggcttc gggcagtgcc	840
	tgettgtatg tttcccaccg ccttgcctct gatctgtgac atctgtctgct gactggtcag	900
	gacaaatggt acaccagcac cgcacaggac atctgttggc cctcgtctag gaacgacctg	960
35	tcgtatgtgg ctcaactctg gaaccagaca ggtataggtg tgtttgtttt attttaattt	1020
	tcoaaagatg cgcocagcaga gtaaacocgc gatogcagat ctctgggaag aagtcacagg	1080
	ctcgtctttc tttaccgattg ctgtgcaaca ccgcgccctt gtcgaaggta gtcctctcgc	1140
40	gacggcogtc ggotcgtcct gctootggtg tgattctcag gcacccgaaa ttctctgcta	1200
	cctgcagttc ttctggtacc gcagcttcat tctggccaac ttcggtagca gccgttccgg	1260
	caaggagcga aacaccctcc tgggaagcat ccacacctt gatcctgagg ccgcatgcca	1320
	cgactccacc ttcocagcct gctcccgcg cygcctcgcg aaccacaagg aggttctaga	1380
45	ctcttccgce tcaatctata ccctcaaga tggctctcag gacagcgagg ctgttcgctg	1440
	gggtcggtao cctgaggaac cgtactaca cggcaaccoc tggctcctgt gcaccttggc	1500
	tgcocgagag cagtctgacg atgctctata ccagtgggac aagcaggggt cgttcggaggt	1560
50	cacagatgtg tcgctggact tcttcnaggc actgtacagc gatgctgcta ctggcactta	1620
	ctctctgctc agtccgaott atagtagcat tgtatgctgc gtgaagactt tcccgatgg	1680
	ctctctctct attgtggtaa gctctcctca gacnagcct catgttgaca gaggtgctgt	1740
55	actaacagaa gttagaact ccgcgcgcaa gcaacggctc catgtccgag caatacgaca	1800
	agtctgatgg cgaagcatt. tccgctcgcg acctgacctg gctttatgct gctctgctga	1860
	ccgccaucaa ccgtcgtaac tccgtcgtgc ctgcttcttg gggcgagacc tctgccagca	1920
	gctgccccgg cacctgtgct gccacatctg ccatttggac ctacagcagt gtcactgtca	1980
60	cctctgtggc gattatctg gctactggcg gcaacctac gacggctacc cccactggat	2040
	ccggcagcgt gacctcgacc agcaagacca ccgcgactgc tagcaagacc agcaccagta	2100
	cgtcatcaac ctctgtacc actcccaccg ccgtggctgt gactttcgat ctgacagcta	2160
65	ccaccacctc cggcgagaa atctacotgg tggatcgal ctctcagctg ggtgactggg	2220
	aaaccagcga cggcatagct ctgagtgctg acaagtaaac tccagcgac ccgctctggt	2280

ES 2 294 846 T3

```

atgtcaactgt gactctgccc gctgggtgagt cgcttgagta caagtttata cgcattgaga 2340
gcgatgactc cgtgggagtgg gagagtgate caaccgaga atacccggtt cctcaggcgt 2400
gcggaacgtc gaccgcgacg gtgactgaca cctggcggtg acaatcaatc catttcgcta 2460
tagttaaagg atggggatga gggcaattgg ttatatgate atgtatgtag tgggtgtgca 2520
taatagtagt gaaatggag ccaagtcatg tgattgtaat cgaccgacgg aattgaggtat 2580
atccggaat acagacaccg gg 2602

```

<210> SEC ID NO:13

<211> LONGITUD: 640

<212> TIPO: PRT

<213> ORGANISMO: *Aspergillus niger*

<400> SEC ID NO: 13

```

Met Ser Phe Arg Ser Leu Leu Ala Leu Ser Gly Leu Val Cys Thr Gly
  1          5          10          15
Leu Ala Asn Val Ile Ser Lys Arg Ala Thr Leu Asp Ser Trp Leu Ser
  20          25          30
Asn Glu Ala Thr Val Ala Arg Thr Ala Ile Leu Asn Asn Ile Gly Ala
  35          40          45
Asp Gly Ala Trp Val Ser Gly Ala Asp Ser Gly Ile Val Val Ala Ser
  50          55          60
Pro Ser Thr Asp Asn Pro Asp Tyr Phe Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser
  65          70          75          80
Gly Leu Val Leu Lys Thr Leu Val Asp Leu Phe Arg Asn Gly Asp Thr
  85          90          95
Ser Leu Leu Ser Thr Ile Glu Asn Tyr Ile Ser Ala Gln Ala Ile Val
  100         105         110
Gln Gly Ile Ser Asn Pro Ser Gly Asp Leu Ser Ser Gly Ala Gly Leu
  115         120         125
Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asp Glu Thr Ala Tyr Thr Gly Ser Trp
  130         135         140
Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile
  145         150         155         160
Gly Phe Gly Gln Trp Leu Leu Asp Asn Gly Tyr Thr Ser Thr Ala Thr
  165         170         175
Asp Ile Val Trp Pro Leu Val Arg Asn Asp Leu Ser Tyr Val Ala Gln
  180         185         190
Tyr Trp Asn Gln Thr Gly Tyr Asp Leu Trp Glu Glu Val Asn Gly Ser
  195         200         205

```

ES 2 294 846 T3

Ser Phe Phe Thr Ile Ala Val Gln His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser  
 210 215 220  
 5 Ala Phe Ala Thr Ala Val Gly Ser Ser Cys Ser Trp Cys Asp Ser Gln  
 225 230 235 240  
 Ala Pro Glu Ile Leu Cys Tyr Leu Gln Ser Phe Trp Thr Gly Ser Phe  
 10 245 250 255  
 Ile Leu Ala Asn Phe Asp Ser Ser Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr  
 260 265 270  
 15 Leu Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp  
 275 280 285  
 Ser Thr Phe Gln Pro Cys Ser Pro Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Glu  
 20 290 295 300  
 Val Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr Thr Leu Asn Asp Gly Leu Ser  
 305 310 315 320  
 25 Asp Ser Glu Ala Val Ala Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Thr Tyr Tyr  
 325 330 335  
 Asn Gly Asn Pro Trp Phe Leu Cys Thr Leu Ala Ala Ala Glu Gln Leu  
 30 340 345 350  
 Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp Lys Gln Gly Ser Leu Glu Val Thr  
 355 360 365  
 Asp Val Ser Leu Asp Phe Phe Lys Ala Leu Tyr Ser Asp Ala Ala Thr  
 35 370 375 380  
 Gly Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ser Ser Ile Val Asp Ala  
 385 390 395 400  
 40 Val Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe Val Ser Ile Val Glu Thr His Ala  
 405 410 415  
 Ala Ser Asn Gly Ser Met Ser Glu Gln Tyr Asp Lys Ser Asp Gly Glu  
 45 420 425 430  
 Gln Leu Ser Ala Arg Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Leu Leu Thr  
 435 440 445  
 50 Ala Asn Asn Arg Arg Asn Ser Val Val Pro Ala Ser Trp Gly Glu Thr  
 450 455 460  
 Ser Ala Ser Ser Val Pro Gly Thr Cys Ala Ala Thr Ser Ala Ile Gly  
 55 465 470 475 480  
 Thr Tyr Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Trp Pro Ser Ile Val Ala Thr  
 485 490 495  
 60 Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr  
 500 505 510

65

ES 2 294 846 T3

**Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala Ser Lys Thr Ser Thr Ser Thr**  
**515 520 525**  
**Ser Ser Thr Ser Cys Thr Thr Pro Thr Ala Val Ala Val Thr Phe Asp**  
**530 535 540**  
**Leu Thr Ala Thr Thr Thr Tyr Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser**  
**545 550 555 560**  
**Ile Ser Gln Leu Gly Asp Trp Glu Thr Ser Asp Gly Ile Ala Leu Ser**  
**565 570 575**  
**Ala Asp Lys Tyr Thr Ser Ser Asp Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Thr**  
**580 585 590**  
**Leu Pro Ala Gly Glu Ser Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Arg Ile Glu Ser**  
**595 600 605**  
**Asp Asp Ser Val Glu Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val**  
**610 615 620**  
**Pro Gln Ala Cys Gly Thr Ser Thr Ala Thr Val Thr Asp Thr Trp Arg**  
**625 630 635 640**

30 <210> SEC ID NO:14  
 <211> LONGITUD: 43  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial  
 35 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador HK1-T2X

40 <400> SEC ID NO:14  
 atggatttc caagcgcgcg vnnntggatt catggttgag caa

43

45 <210> SEC ID NO:15  
 <211> LONGITUD: 43  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial  
 50 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hkl-N9X

55 <400> SEC ID NO:15  
 ccttgattc atggttgagc vnngaagcga ccgtggctcg tac

43

60 <210> SEC ID NO:16  
 <211> LONGITUD: 43  
 <212> TIPO: ADN  
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial  
 65 <220> CARACTERÍSTICA:  
 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hkl-A1 IX

## ES 2 294 846 T3

<400> SEC ID NO:16  
attcatgggt gagcaacgaa vnnaccgtgg ctcgtactgc cat 43

5  
<210> SEC ID NO:17  
<211> LONGITUD: 43  
<212> TIPO: ADN  
10 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial  
  
<220> CARACTERISTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hkl-L66X  
15  
<400> SEC ID NO:17  
  
tctcaagac cctcgtcgat vnnctccgaa atggagatac cag 43

20  
<210> SEC ID NO:18  
<211> LONGITUD: 43  
<212> TIPO: ADN  
25 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial  
  
<220> CARACTERISTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hkl-S386X  
30  
<400> SEC ID NO:18  
  
ctttcgccga tggcttcgtc vnnattgtgg aaactcacgc cgc 43

35  
<210> SEC ID NO:19  
<211> LONGITUD: 43  
<212> TIPO: ADN  
40 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial  
  
<220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hkl-E389X  
45  
<400> SEC ID NO:19  
  
atggcttcgt ctctattgtg vnnactcacg ccgcaagcaa cgg 43

50  
<210> SEC ID NO:20  
<211> LONGITUD: 43  
<212> TIPO: ADN  
55 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial  
  
<220> CARACTERÍSTICA:  
60 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hkl-T390X  
  
<400> SEC ID NO:20  
  
65 GCTTCGTCTC TATTGTGGAA VNNCACGCCG CAAGCAACGG CTC 43

## ES 2 294 846 T3

<210> SEC ID NO:21  
<211> LONGITUD: 43  
<212> TIPO: ADN  
5 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
10 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk1-A393X

<400> SEC ID NO:21  
15 ctattgtgga aactcacgcc vnnagcaacg gtcctatgtc cga 43

<210> SEC ID NO:22  
<211> LONGITUD: 43  
<212> TIPO: ADN  
20 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
25 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk1-S394X

<400> SEC ID NO:22  
30 ttgtgaaac tcacgccga vnnaacggct ccatgtccga gca 43

<210> SEC ID NO:23  
<211> LONGITUD: 43  
35 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
40 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk1-N395X

<400> SEC ID NO:23  
45 tggaaactca cgccgcaagc vnnggctcca tgtccgagca ata 43

<210> SEC ID NO:24  
<211> LONGITUD: 43  
50 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
55 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk1-G296X

<400> SEC ID NO:24  
60 aaactcacgc cgcaagcaac vnttccatgt ccgagcaata cga 43

<210> SEC ID NO:25  
65 <211> LONGITUD: 43  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

## ES 2 294 846 T3

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk1-K404X

5 <400> SEC ID NO:25

ccatgtccga gcaatacgac vnnctgatg gcgagcagct ttc

43

10 <210> SEC ID NO:26

<211> LONGITUD: 43

<212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

15

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk1-D406X

20 <400> SEC ID NO:26

ccgagcaata cgacaagtct vnnggcgagc agctttccgc tcg

43

25 <210> SEC ID NO:27

<211> LONGITUD: 43

<212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

30

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk1-E408X

35

<400> SEC ID NO:27

aatacgacaa gtctgatggc vnnccagcttt ccgctcgcga cct

43

40

<210> SEC ID NO:28

<211> LONGITUD: 42

<212> TIPO: ADN

45 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk1-L410X

50

<400> SEC ID NO:28

acaagtctga tggcgagcag vnnccgctc gcgacctgac ct

42

55

<210> SEC ID NO:29

<211> LONGITUD: 43

<212> TIPO: ADN

60 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk1-L423X

65

## ES 2 294 846 T3

<400> SEC ID NO:29  
cctggtctta tgctgctctg vnnaccgcca acaaccgtcg taa 43

5 <210> SEC ID NO: 30  
<211> LONGITUD: 44  
<212> TIPO: ADN  
10 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial  
  
<220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk1-N426X  
15  
<400> SEC ID NO:30  
  
atgctgctct gctgaccgcc vnnaaccgtc gtaactccgt cgtg 44

20 <210> SEC ID NO:31  
<211> LONGITUD: 44  
<212> TIPO: ADN  
25 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial  
  
<220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk1-N427X  
30  
<400> SEC ID NO:31  
  
CTGCTCTGCT GACCGCCAAC VNNCGTCGTA ACTCCGTCGT GCCT 44

35 <210> SEC ID NO:32  
<211> LONGITUD: 46  
40 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial  
  
<220> CARACTERÍSTICA:  
45 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk1-Y402X  
  
<400> SEC ID NO:32  
  
50 ACGGCTCCAT GTCCGAGCAA NNCGACAAGT CTGATGGCGA GCAGCT 46  
  
<210> SEC ID NO:33  
<211> LONGITUD: 41  
55 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial  
  
<220> CARACTERÍSTICA:  
60 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-L234X sentido  
  
<400> SEC ID NO:33  
  
65 ctggaccggc agcttcattn nkgccaactt cgatagcage c 41



## ES 2 294 846 T3

<220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-S239X sentido

5 <400> SEC ID NO:38  
tcattctggc caacttcgat nncagccgtt ccggcaagga cg 42

10 <210> SEC ID NO:39  
<211> LONGITUD: 42  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

15 <220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-S240G antisentido

20 <400> SEC ID NO:39  
ttgcgtcctt gccggaacga ccgctatcga agttggccag aa 42

25 <210> SEC ID NO: 40  
<211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

30 <220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-S242X antisentido

35 <400> SEC ID NO:40  
gggtgttgc gtccttgcca knacggctgc tatcgaagt g 41

40 <210> SEC ID NO:41  
<211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

45 <220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-G243X antisentido

50 <400> SEC ID NO:41  
ggagggtgtt tgcgtcctta knngaacggc tgctatcgaa g 41

55 <210> SEC ID NO:42  
<211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

60 <220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-K244R sentido

65

## ES 2 294 846 T3

<400> SEC ID NO:42  
cgatagcagc cgttccggca gagacgcaaa cacctcctg g 41

5  
<210> SEC ID NO:43  
<211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
10 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-T310V antisentido  
15

<400> SEC ID NO:43  
acgggttgcc gttgtagtaa acgtcctcag ggtaccgacc c 41

20  
<210> SEC ID NO:44  
<211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
25 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-T310S antisentido  
30

<400> SEC ID NO:44  
acgggttgcc gttgtagtaa gagtcctcag ggtaccgacc c 41

35  
<210> SEC ID NO:45  
<211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
40 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-Y311N sentido  
45

<400> SEC ID NO:45  
tcgtaccct gaggacacga attacaacgg caaccctgg t 41

50  
<210> SEC ID NO:46  
<211> LONGITUD: 41  
55 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-Y312Q antisentido  
60

<400> SEC ID NO:46  
65 ggaaccacgg gttgccgttt tggtagctgt cctcaggga c 41

## ES 2 294 846 T3

<210> SEC ID NO:47.  
<211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
5 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
10 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-Y312N antisentido  
<400> SEC ID NO:47

15 ggaaccacgg gttgccgta ttgtacgtgt cctcaggta c 41

<210> SEC ID NO:48  
<211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
20 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
25 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-N313T sentido  
<400> SEC ID NO:48

30 ccctgaggac acgtactaca ctggcaacce gtggttctg t 41

<210> SEC ID NO:49  
<211> LONGITUD: 41  
35 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
40 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-N313S sentido  
<400> SEC ID NO:49

45 ccctgaggac acgtactact ctggcaacce gtggttctg t 41

<210> SEC ID NO:50  
<211> LONGITUD: 41  
50 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
55 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-N313G sentido  
<400> SEC ID NO:50

60 ccctgaggac acgtactacg gtggcaacce gtggttctg t 41

<210> SEC ID NO:51  
65 <211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

## ES 2 294 846 T3

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-N315Q antisentido

5 <400> SEC ID NO: 51

aggtgcacag gaaccacggt tggccgttgt agtacgtgc c

41

10 <210> SEC ID NO:52

<211> LONGITUD: 41

<212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

15

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-N315E antisentido

20 <400> SEC ID NO: 52

aggtgcacag gaaccacggt tcgccgttgt agtacgtgc c

41

25 <210> SEC ID NO:53

<211> LONGITUD: 41

<212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

30

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-N315R antisentido

35

<400> SEC ID NO:53

aggtgcacag gaaccacggt ctgccgttgt agtacgtgc c

41

40 <210> SEC ID NO:54

<211> LONGITUD: 41

<212> TIPO: ADN

45 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-F318Y antisentido

50

<400> SEC ID NO:54

cggcagccaa ggtgcacaga taccacgggt tgccgttga g

41

55

<210> SEC ID NO:55

<211> LONGITUD: 41

<212> TIPO: ADN

60 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

65 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk2-Q409P sentido

## ES 2 294 846 T3

<400> SEC ID NO:55  
cgacaagtct gatggcgagc cactttccgc tcgacactg a 41

5  
<210> SEC ID NO:56  
<211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
10 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial  
  
<220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-D336X sentido  
15  
<400> SEC ID NO:56  
cgatgctcta taccagtgg nkaagcaggg gtcgttgag g 41

20  
<210> SEC ID NO:57  
<211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
25 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial  
  
<220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-K337X sentido  
30  
<400> SEC ID NO:57  
tgctctatac cagtgggacn nkcaggggtc gttggagtc a 41

35  
<210> SEC ID NO:58  
<211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
40 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial  
  
<220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-Q338X antisentido  
45  
<400> SEC ID NO:58  
ctgtgacctc caacgacctg nncctgtccc actggtatag a 41

50  
<210> SEC ID NO:59  
<211> LONGITUD: 41  
55 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial  
  
<220> CARACTERÍSTICA:  
60 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-G339X sentido  
  
<400> SEC ID NO:59  
65 ataccagtgg gacaagcagn cutcgttga ggtcacagat g 41

## ES 2 294 846 T3

<210> SEC ID NO:60  
<211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
5 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
10 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-S340X antisentido

<400> SEC ID NO:60  
15 acacatctgt gacctcaaaa ntcccctgct tgtcccactg g 41

<210> SEC ID NO:61  
<211> LONGITUD: 41  
20 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
25 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-S340C antisentido

<400> SEC ID NO:61  
30 acacatctgt gacctcaaaa nccccctgct tgtcccactg g 41

<210> SEC ID NO:62  
<211> LONGITUD: 41  
35 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
40 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-L341X sentido

<400> SEC ID NO:62  
45 gtgggacaag caggggtcgn uugaggtcac agatgtgtcg c 41

<210> SEC ID NO:63  
<211> LONGITUD: 41  
50 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
55 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-K352Q sentido

<400> SEC ID NO:63  
60 tgtgtcgctg gacttcttc aagcactgta cagcgatgct g 41

<210> SEC ID NO:64  
65 <211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

## ES 2 294 846 T3

<220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-K352R sentido

5 <400> SEC ID NO:64  
tggtgctg gactttca gagcactgta cagcagct g 41

10 <210> SEC ID NO:65  
<211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

15 <220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-A352D antisentido

20 <400> SEC ID NO:65  
tagcagcatc gctgtacaga tcctgaaga agtccagcga c 41

25 <210> SEC ID NO:66  
<211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

30 <220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-A353S antisentido

35 <400> SEC ID NO:66  
tagcagcatc gctgtacaga gactgaaga agtccagcga c 41

40 <210> SEC ID NO:67  
<211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

45 <220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-S356P sentido

50 <400> SEC ID NO:67  
actttcaag gactgtacc cagatgctgc tactggcacc t 41

55 <210> SEC ID NO:68  
<211> LONGITUD: 43  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

60 <220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-S356N sentido

65

## ES 2 294 846 T3

<400> SEC ID NO:68  
acttctcaa ggcactgtac aaugatgctg ctactggcac cta 43

5  
<210> SEC ID NO:69  
<211> LONGITUD: 43  
<212> TIPO: ADN  
10 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-S356X sentido  
15  
<400> SEC ID NO:69

acttctcaa ggcactgtac gaugatgctg ctactggcac cta 43

20  
<210> SEC ID NO:70  
<211> LONGITUD: 43  
<212> TIPO: ADN  
25 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-D357S antisentido  
30  
<400> SEC ID NO:70

gagtaggtgc cagtagcagc agagctgtac agtgcctga aga 43

35  
<210> SEC ID NO:71  
<211> LONGITUD: 41  
<212> TIPO: ADN  
40 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-A359S sentido  
45  
<400> SEC ID NO: 71

ggcactgtac agcgatgctt ctactggcac ctactctcg t 41

50  
<210> SEC ID NO:72  
<211> LONGITUD: 41  
55 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
60 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-T360V antisentido

<400> SEC ID NO:72

65  
tggacgaaga gtaggtgccca acagcagcat cgctgtacag t 41

## ES 2 294 846 T3

<210> SEC ID NO:73  
<211> LONGITUD: 43  
<212> TIPO: ADN  
5 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
10 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-G361X sentido

<400> SEC ID NO:73

15 tgtacagcga tgetgtact nctacctact ctctgtccag ttc 43

<210> SEC ID NO:74  
<211> LONGITUD: 42  
<212> TIPO: ADN  
20 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
25 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-T362R antiseritido

<400> SEC ID NO:74

30 gtccaactgg acgaagagta tctgccagta gcagcatcgc tg 42

<210> SEC ID NO:75  
<211> LONGITUD: 42  
35 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
40 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-S364X sentido

<400> SEC ID NO:75

45 tgctgtact ggcactacn nktctccag ttcgacttat ag 42

<210> SEC ID NO:76  
<211> LONGITUD: 42  
50 <212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:  
55 <223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-S365X sentido

<400> SEC ID NO:76

60 tgctactggc acctactctn nktccagttc gacttatagt ag 42

<210> SEC ID NO:77  
65 <211> LONGITUD: 42  
<212> TIPO: ADN  
<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

## ES 2 294 846 T3

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-S366T antisentido

5 <400> SEC ID NO: 77

atgctactat aagtegaact agtccaagag taggtgccag ta

42

10 <210> SEC ID NO:78

<211> LONGITUD: 42

<212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

15

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-S368X antisentido

20 <400> SEC ID NO:78

tctacaatgc tactataagt agnactggac gaagagtagg tg

42

25 <210> SEC ID NO:79

<211> LONGITUD: 43

<212> TIPO: ADN

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

30

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-T369X sentido

35

<400> SEC ID NO:79

ctactcttcg tccagttcgn nktatagtag cattgtagat gcc

43

40

<210> SEC ID NO:80

<211> LONGITUD: 43

<212> TIPO: ADN

45

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-S371X antisentido

50

<400> SEC ID NO:80

ttcacggcat ctacaatgct atnataagtc gaactggacg aag

43

55

<210> SEC ID NO:81

<211> LONGITUD: 43

<212> TIPO: ADN

60

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERÍSTICA:

65

<223> OTRAS INFORMACIONES: cebador Hk3-S372X sentido

ES 2 294 846 T3

<400> SEC ID NO:81

cgccagtc gacttatagt nntattgtag atgccgtgaa gac

43

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65