

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 059**

51 Int. Cl.:
C12N 9/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08731952 .1**
96 Fecha de presentación: **12.03.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2132307**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2009**

54 Título: **LA A-AMILASA DE TRICHODERMA REESEI ES UNA ENZIMA MALTOGÉNICA.**

30 Prioridad:
14.03.2007 US 906811 P
14.03.2007 US 906812 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.03.2012

73 Titular/es:
Danisco US Inc.
925 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304, US

72 Inventor/es:
DUAN, Gang;
QIAN, Kathy;
SCHEFFERS, Martijn;
SHETTY, Jayarama y
VAN SOLINGEN, Pieter

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

ES 2 376 059 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

La α -amilasa de *Trichoderma reesei* es una enzima maltogénica

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] Se usa una α -amilasa maltogénica de *Trichoderma reesei* (TrAA) para la sacarificación de almidón para dar un jarabe rico en maltosa.

10 **ANTECEDENTES**

[0002] El jarabe de maíz con alto contenido en fructosa (HFCS) es una forma procesada del jarabe de maíz que presenta un alto contenido en fructosa y un dulzor comparable al del azúcar, lo que hace que el HFCS sea útil como sustituto de azúcar en refrescos y otros alimentos procesados. El HFCS supone actualmente una industria de mil millones de dólares. El proceso de producción de HFCS ha evolucionado a lo largo de los años desde la hidrólisis ácida hasta una secuencia de reacciones catalizadas por enzimas:

(1) Licuefacción: Las α -amilasas (EC 3.2.1.1) se usan primero para degradar una suspensión de almidón que contiene entre 30 y 40% p/p de sólidos secos (ss) a maltodextranos. Las α -amilasas son endohidrolasas que catalizan la rotura aleatoria de enlaces α -1,4-D-glucosídicos internos. Puesto que la licuefacción se realiza típicamente a temperaturas elevadas, por ejemplo de 90 a 100°C, se prefieren para este paso α -amilasas termoestables, tales como una α -amilasa de *Bacillus sp.*

(2) Sacarificación: Habitualmente se usan glucoamilasas y/o α -amilasas maltogénicas para catalizar la hidrólisis de los extremos no reductores de los maltodextranos formados después de la licuefacción, liberando D-glucosa, maltosa e isomaltosa. Se pueden usar enzimas desramificantes, tales como la pululanasa, para apoyar la sacarificación. La sacarificación transcurre típicamente en condiciones ácidas y a temperaturas elevadas, por ejemplo a 60°C y pH 4,3. Las glucoamilasas usadas en este proceso se obtienen típicamente de hongos, por ejemplo la glucoamilasa de *Aspergillus niger* (AnGA) usada en Optidex[®] L400 o la glucoamilasa de *Humicola grisea* (HgGA). Las α -amilasas maltogénicas usadas actualmente para esta aplicación incluyen amilasas de plantas y la α -amilasa de *Aspergillus oryzae*, el ingrediente activo de Clarase[®] L. La sacarificación se puede usar para producir jarabes o bien con alto contenido en maltosa o bien ricos en glucosa.

(3) Isomerización: Un jarabe rico en glucosa se puede procesar posteriormente para producir fructosa si se desean productos más dulces. La isomerización de glucosa a fructosa es catalizada por la glucosa isomerasa y proporciona aproximadamente un 42% (p/v) de fructosa, entre 50 y 52% de glucosa y una mezcla de otros azúcares. Manipulaciones adicionales pueden proporcionar finalmente un HFCS de calidad comercial con un contenido en fructosa del 42%, 55% o 90%, por ejemplo.

[0003] Las α -amilasas y las glucoamilasas se añaden directamente a un lote de procesamiento del jarabe de maíz y no se reutilizan. Las glucosa isomerasa, por otra parte, se inmovilizan en columnas a través de las cuales se pasa la mezcla de azúcares. Las columnas con glucosa isomerasa se reutilizan hasta que las enzimas hayan perdido la mayor parte de su actividad.

[0004] El paso de sacarificación es el paso limitante de la velocidad de producción de HFCS. La sacarificación dura típicamente entre 48 y 72 horas, periodo durante el cual muchas glucoamilasas fúngicas han perdido actividad significativa. Además, aunque se pueden usar tanto las α -amilasas maltogénicas como las glucoamilasas para catalizar la sacarificación, las enzimas trabajan típicamente a diferentes pH y temperaturas óptimos. Por ejemplo, las α -amilasas maltogénicas presentan típicamente un pH óptimo de al menos pH 5,0 y una temperatura óptima inferior a 55°C, mientras que la AnGA presenta típicamente un pH óptimo de pH 4,0 a 4,5 y una temperatura óptima de aproximadamente 60°C. La diferencia en las condiciones de reacción entre las dos enzimas requiere ajustar el pH y la temperatura, lo que ralentiza el proceso global y puede dar lugar a la formación de agregados de amilosa insolubles. Cualquier α -amilasa bacteriana residual se inactivará si se baja el pH; sin embargo, la α -amilasa bacteriana se puede sustituir posteriormente por una α -amilasa estable a ácido.

[0005] De forma ideal, el paso de sacarificación proporciona un jarabe con una composición de aproximadamente 95 a 97% p/p de glucosa, 1 a 2% p/p de maltosa y 0,5 a 2% p/p de isomaltosa. Este jarabe rico en glucosa se puede usar en la reacción de isomerización (paso (3) anterior) o bien se puede usar para la producción de glucosa cristalina. Estas concentraciones tan elevadas de glucosa no son fáciles de conseguir. Por ejemplo, la glucoamilasa de *Trichoderma reesei* (TrGA) ofrece una actividad específica mejorada en relación con AnGA o HgGA; sin embargo, la TrGA proporciona un producto que presenta típicamente una concentración final de glucosa de aproximadamente 88% p/v. Además, las concentraciones elevadas de glucosa en el jarabe promueven la conversión de glucosa en maltosa y maltotriosa.

[0006] Por consiguiente, existe en la técnica la demanda de un procedimiento mejorado para preparar HFCS que incluya un paso de sacarificación que use una α -amilasa con un pH óptimo y una temperatura óptima compatibles con el uso de glucoamilasas fúngicas. Existe además la demanda de una α -amilasa que pueda catalizar la sacarificación en menos tiempo. Asimismo existe la demanda de una α -amilasa que pueda lograr estos objetivos produciendo al mismo tiempo, después de la sacarificación, un jarabe que presente una concentración de glucosa de aproximadamente 96% p/p.

RESUMEN

[0007] Estas y otras demandas de la técnica se satisfacen mediante una α -amilasa maltogénica de *Trichoderma reesei* (TrAA). Se proporcionan la enzima, variantes de la enzima y ácidos nucleicos codificantes. Igualmente se proporcionan células huésped que expresan la TrAA.

[0008] La TrAA se usa ventajosamente en diversos procesos, en particular en la sacarificación de maltodextranos formados después de la licuefacción. En un aspecto, una TrAA se usa en un proceso de producción de maltosa bien sola o bien en combinación con otras enzimas, tales como la pululanasa. La TrAA cataliza ventajosamente la producción de maltosa a un pH relativamente bajo y una temperatura elevada, lo que permite el uso de condiciones de reacción compatibles con las glucoamilasas fúngicas, por ejemplo la AnGA. Además, la facilidad con la que se produce la TrAA la hace más económica que las α -amilasas usadas actualmente para la producción de maltosa.

[0009] En otro aspecto, la TrAA se usa en un proceso de sacarificación que produce una concentración elevada de glucosa. La TrAA suprime ventajosamente la reacción inversa que forma maltooligosacáridos a partir de glucosa, lo que permite alcanzar concentraciones de glucosa en una mezcla de almidón de maíz procesada tan altas como aproximadamente 96% p/v. Además, esta concentración de glucosa se puede alcanzar en menos tiempo que catalizando la reacción con solo una glucoamilasa. En una realización, se añade una glucoamilasa con la TrAA. La glucoamilasa puede ser una glucoamilasa fúngica, tal como TrGA, o se puede añadir una mezcla de glucoamilasas, por ejemplo una combinación de TrGA, HgGA y AnGA.

[0010] La invención proporciona un procedimiento para la sacarificación de almidón licuado para producir un jarabe rico en maltosa, que comprende:

la adición de un polipéptido a una solución de almidón licuado, que comprende:

- (i) los residuos 21 a 463 de la SEQ ID NO:3; o
- (ii) una variante de la α -amilasa de *Trichoderma reesei* (TrAA), presentando la variante actividad α -amilasa y una secuencia de aminoácidos con una identidad de al menos 90% con los residuos 21 a 463 de la SEQ ID NO:3;

y la sacarificación de la solución de almidón licuado para producir un jarabe rico en maltosa.

[0011] La variante puede presentar una identidad de secuencia de al menos 95% con los residuos 21 a 463 de la SEQ ID NO:3.

[0012] Por ejemplo, la variante puede presentar entre 1 y 10 sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos en comparación con los residuos 21 a 463 de la SEQ ID NO:3.

[0013] De forma alternativa, el polipéptido puede comprender la secuencia SEQ ID NO:3.

[0014] El polipéptido se puede añadir a la solución de almidón licuado en una cantidad de aproximadamente 0,3 a 1 kg por tonelada métrica de sólidos secos. La solución de almidón licuado puede ser cualquier suspensión de almidón licuado con aproximadamente 20 a 35% p/p de sólidos secos.

[0015] El procedimiento puede comprender adicionalmente un paso de adición de una pululanasa, una β -amilasa, una α -amilasa fúngica distinta de TrAA, una proteasa, una celulasa, una hemicelulasa, una lipasa, una cutinasa, una isoamilasa o una combinación de las mismas a la solución de almidón licuado. La solución de almidón licuado puede encontrarse entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 60°C. La solución de almidón licuado puede encontrarse entre aproximadamente pH 4,0 y aproximadamente pH 6,0, o entre aproximadamente pH 4,2 y aproximadamente pH 4,8.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0016] Los dibujos adjuntos se incorporan en y forman parte de esta memoria descriptiva e ilustran diferentes

realizaciones. En los dibujos:

- 5 **[0017]** La fig. 1 representa la capacidad de la TrAA para catalizar, en presencia de una glucoamilasa, un proceso de sacarificación con una eficacia superior a la alcanzada con la glucoamilasa sola. El eje y muestra el porcentaje en peso de glucosa (DP1) producido en un proceso de sacarificación de 24 horas a pH 4,2, 60°C. La reacción fue catalizada por 1,0 kg/tm ss de glucoamilasa sola (GA) o de GA combinada con la cantidad indicada de TrAA en kg/tm de ss. Nótese que la adición de 1 mg de enzima a una solución de 50 ml que contiene un 32% de sólidos secos, por ejemplo, significa que la solución contiene 1 mg de enzima/16 g de ss, o 0,0625 kg/tm de ss.
- 10 **[0018]** La fig. 2 representa la capacidad de la TrAA para catalizar la producción de maltosa a un pH bajo. El eje y muestra el porcentaje en peso de maltosa (DP2) producido en un proceso de producción de maltosa de 24 horas catalizado por 0,5 kg/tm ss de TrAA a 55°C. El pH de la reacción se muestra en el eje x.
- 15 **[0019]** La fig. 3 representa la capacidad de la TrAA para catalizar la producción de maltosa con una eficacia comparable a Clarase® L. En el eje y se muestra el porcentaje en peso de maltosa (DP2) producido en un proceso de producción de maltosa de 48 horas. En el eje x se muestra la enzima usada para catalizar la reacción. "Clarase": 10 SKBU/g ss de Clarase® L a pH 5,5, 55°C. "10 TrAA": 10 SKBU/g ss de α -amilasa de *Trichoderma reesei* a pH 4,5, 60°C. "15 TrAA": y "20 TrAA" representan TrAA a 15 SKBU/g de ss y 20 SKBU/g de ss, respectivamente, a pH 4,5, 60°C. "20 TrAA + PU" representa la adición de 0,25 kg/tm ss de pululanasa a 20 SKBU/g ss de TrAA a pH 4,5, 60°C.
- 20 **[0020]** La fig. 4 representa un proceso de producción de maltosa catalizado por TrAA con la cantidad óptima de pululanasa. El eje y muestra el porcentaje en peso de maltosa (DP2) producido al cabo de 24 horas a pH 4,6, 58°C en presencia de 0,5 kg/tm ss de TrAA. El eje x muestra la cantidad de pululanasa en kg/tm de ss añadida a la reacción.
- 25 **[0021]** La fig. 5 muestra proteínas separadas mediante SDS-PAGE procedentes de una alícuota de células cultivadas que expresan TrAA (carril 1) o de TrAA purificada (carril 2). En el carril M se muestran los marcadores del peso molecular.
- 30 **[0022]** La fig. 6A muestra la actividad α -amilasa relativa (en unidades arbitrarias) de la TrAA purificada en función del pH, usando el reactivo Ceralpha (Megazyme International Ireland, Ltd., Wicklow, Irlanda; n° de catálogo K-CERA) como sustrato.
- 35 **[0023]** La fig. 6B muestra la actividad α -amilasa relativa (en unidades arbitrarias) de la TrAA purificada en función de la temperatura, usando el mismo sustrato artificial.
- [0024]** La fig. 7A y la fig. 7B son un listado de las SEQ ID NOS:1-7.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

- 40 **[0025]** Se proporciona una α -amilasa fúngica procedente de *Trichoderma reesei*. La TrAA ofrece varias ventajas frente a las α -amilasas usadas actualmente. En primer lugar, la TrAA es activa a un pH relativamente bajo y a una temperatura elevada, lo que permite usar la enzima en combinación con una glucoamilasa fúngica en las mismas condiciones de reacción. Esto obvia la necesidad de realizar la reacción de sacarificación en forma de un proceso discontinuo, en el que se han de reajustar el pH y la temperatura para el uso óptimo de la α -amilasa o la glucoamilasa. En segundo lugar, la TrAA, en combinación con una pululanasa, cataliza la generación de maltosa con la misma eficacia que las enzimas más caras usadas comúnmente, tales como Clarase® L.

1. Definiciones y abreviaturas

- 50 **[0026]** De acuerdo con esta descripción detallada, se aplican las siguientes abreviaturas y definiciones. Cabe señalar que, según se usa en la presente memoria, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen los equivalentes en plural, salvo que el contexto dicte claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una enzima" incluye una pluralidad de tales enzimas, y la referencia a "la formulación" incluye la referencia a una o más formulaciones y equivalentes de las mismas conocidos para los expertos en la técnica, y así sucesivamente.
- 55 **[0027]** Salvo que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria poseen el significado que entiende habitualmente un experto normal en la técnica. A continuación se proporcionan los términos siguientes.

60 1.1 Definiciones

- [0028]** "Amilasa" se refiere a una enzima que, entre otras cosas, es capaz de catalizar la degradación de

almidón. Generalmente, las α -amilasas (EC 3.2.1.1; α -D-(1 \rightarrow 4)-glucano glucanohidrolasa) se definen como enzimas endoactivas que rompen los enlaces α -D-(1 \rightarrow 4) O-glucosídicos en el interior de la molécula de almidón de una manera aleatoria. Por el contrario, las enzimas amilolíticas exoactivas, tales como las α -amilasas maltogénicas (EC 3.2.1.133); las β -amilasas (EC 3.2.1.2; y la α -D-(1 \rightarrow 4)-glucano maltohidrolasa) rompen la molécula de almidón desde el extremo no reductor del sustrato. Las β -amilasas, las α -glucosidasas (EC 3.2.1.1.20; α -D-glucósido glucohidrolasa), la glucoamilasa (EC 3.2.1.3; α -D-(1 \rightarrow 4)-glucano glucohidrolasa) y las amilasas específicas de producto pueden producir maltooligosacáridos de una longitud específica a partir del almidón. Las glucoamilasas liberan restos glucosilo de los extremos no reductores de las moléculas de amilosa y amilopectina. Las glucoamilasas también catalizan la hidrólisis de los enlaces α -1,6 y α -1,3, aunque a una velocidad mucho menor que los enlaces α -1,4.

[0029] “Variante de la α -amilasa”, “polipéptido variante de la α -amilasa” y “enzima variante” se refieren a una proteína α -amilasa que presenta una secuencia de aminoácidos que ha sido modificada a partir de la secuencia de aminoácidos de una α -amilasa natural. Como se usa en la presente memoria, “enzimas parentales”, “secuencia parental”, “polipéptido parental”, “proteína α -amilasa natural” y “polipéptidos parentales” se refieren a enzimas y polipéptidos en los que se basan los polipéptidos variantes de la α -amilasa, por ejemplo una α -amilasa de *Trichoderma reesei*. Por “ácido nucleico parental” se entiende una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido parental. Una α -amilasa natural existe en la naturaleza. Las “variantes de la α -amilasa” difieren de una α -amilasa natural en los restos de aminoácidos de la proteína madura, es decir, sin una secuencia señal. La variante de la α -amilasa puede ser una proteína de fusión que contiene un polipéptido α -amilasa heterólogo. Por ejemplo, la proteína α -amilasa puede comprender una proteína α -amilasa madura unida al péptido señal de otra α -amilasa.

[0030] “Variantes” se refieren a polipéptidos y ácidos nucleicos. El término “variante” y el término “mutante” se pueden usar indistintamente. Las variantes incluyen inserciones, sustituciones, transversiones, truncamientos y/o inversiones en uno o más puntos de la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos, respectivamente. Los ácidos nucleicos variantes pueden incluir secuencias que son complementarias a secuencias que son capaces de hibridar con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria. Por ejemplo, una secuencia variante es complementaria a secuencias capaces de hibridar en condiciones estrictas, por ejemplo 50°C y 0,2x SSC (1x SSC = NaCl 0,15 M, citrato sódico 0,015 M, pH 7,0), con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria. Más concretamente, el término variante abarca secuencias que son complementarias a secuencias que son capaces de hibridar en condiciones muy estrictas, por ejemplo 65°C y 0,1x SSC, con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria.

[0031] Como se usa en la presente memoria, el término “expresión” se refiere al proceso por medio del cual se produce un polipéptido a partir de la secuencia de ácido nucleico de un gen. El proceso incluye tanto la transcripción como la traducción.

[0032] “Aislado” significa que la secuencia está al menos sustancialmente exenta de al menos otro componente al que la secuencia está asociada de forma natural y se encuentra en la naturaleza.

[0033] “Purificado” significa que el material se encuentra en un estado relativamente puro, por ejemplo de una pureza de al menos aproximadamente 90%, una pureza de al menos aproximadamente 95% o una pureza de al menos aproximadamente 98%.

[0034] “Termoestable” significa que la enzima retiene su actividad tras la exposición a temperaturas elevadas. La termoestabilidad de una enzima, tal como una α -amilasa, se mide mediante su semivida ($t_{1/2}$), en la que la mitad de la actividad enzimática se pierde por la semivida. El valor de la semivida se calcula en condiciones definidas midiendo la actividad amilasa residual.

[0035] “Intervalo de pH” se refiere a la capacidad de la enzima para mostrar actividad catalítica en condiciones desde ácidas hasta básicas, abarcando 5 o más unidades de pH.

[0036] Como se usa en la presente memoria, “estable al pH” se refiere a la capacidad de la enzima para retener su actividad en un amplio intervalo de pH.

[0037] Como se usa en la presente memoria, “secuencia de aminoácidos” es sinónimo del término “polipéptido” y/o del término “proteína”. En algunos casos, la expresión “secuencia de aminoácidos” es sinónimo del término “péptido”; en algunos casos, la expresión “secuencia de aminoácidos” es sinónimo del término “enzima”.

[0038] Como se usa en la presente memoria, “secuencia de nucleótidos” o “secuencia de ácido nucleico” se refiere a una secuencia de oligonucleótidos o una secuencia de polinucleótidos y a variantes, homólogos, fragmentos y derivados de la misma. La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico, sintético o recombinante y puede ser de cadena doble o de cadena sencilla, tanto si representa la cadena sentido como la antisentido. Como se usa en la presente memoria, la expresión “secuencia de nucleótidos” incluye ADN genómico,

ADNc, ADN sintético y ARN.

- 5 **[0039]** "Homólogo" se refiere a una entidad que presenta un cierto grado de identidad u "homología" con las presentes secuencias de aminoácidos y las presentes secuencias de nucleótidos. Una "secuencia homóloga" incluye un polinucleótido o un polipéptido que presenta un cierto porcentaje, por ejemplo 80%, 85%, 90%, 95% o 99%, de identidad de secuencia con otra secuencia. Porcentaje de identidad significa que, cuando están alineados, ese porcentaje de bases o restos de aminoácidos es el mismo cuando se comparan las dos secuencias. Las secuencias de aminoácidos no son idénticas cuando un aminoácido está sustituido, delecionado o añadido en comparación con la presente secuencia. El porcentaje de identidad de secuencia típicamente se mide con respecto a la secuencia madura de la presente proteína, es decir, después de la modificación postraducciona para eliminar, por ejemplo, una secuencia señal. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos residuos en los sitios activos que la presente secuencia de aminoácidos. Los homólogos igualmente retienen la actividad α -amilasa maltogénica, aunque el homólogo pueda presentar propiedades enzimáticas diferentes que la presente proteína.
- 10 **[0040]** Como se usa en la presente memoria, "hibridación" incluye el proceso por medio del cual se junta una cadena de ácido nucleico con una cadena complementaria a través de un apareamiento de bases, así como el proceso de amplificación realizado en las tecnologías de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El ácido nucleico variante de la α -amilasa puede existir en forma de ADN o ARN de cadena sencilla o doble, un heterodúplex de ARN/ADN o un copolímero de ARN/ADN. Como se usa en la presente memoria, "copolímero" se refiere a una cadena sencilla de ácido nucleico que comprende tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos. El ácido nucleico variante de la α -amilasa puede presentar codones optimizados para incrementar adicionalmente la expresión.
- 15 **[0041]** Como se usa en la presente memoria, un compuesto "sintético" se produce mediante síntesis química o enzimática *in vitro*. Incluye, pero no se limita a, ácidos nucleicos variantes de la α -amilasa preparados con el uso de codones óptimos para los organismos huésped, tales como las levaduras metilotróficas *Pichia*, *Hansenula*, *Streptomyces* y *Trichoderma*, por ejemplo *T. reesei*, u otros huéspedes de expresión a elegir.
- 20 **[0042]** Como se usa en la presente memoria, "célula transformada" incluye células, tanto células bacterianas como fúngicas, que han sido transformadas mediante el uso de técnicas de ADN recombinante. La transformación se produce típicamente por inserción de una o más secuencias de nucleótidos en una célula. La secuencia de nucleótidos insertada puede ser una secuencia de nucleótidos heteróloga, es decir, una secuencia que no es natural de la célula que se ha de transformar, tal como una proteína de fusión.
- 25 **[0043]** Como se usa en la presente memoria, "unido funcionalmente" significa que los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar de la manera deseada. Por ejemplo, una secuencia reguladora unida funcionalmente a una secuencia codificante está ligada de tal manera que se logra la expresión de la secuencia codificante en condiciones compatibles con las secuencias control.
- 30 **[0044]** Como se usa en la presente memoria, "biológicamente activo" se refiere a una secuencia que presenta una función estructural, reguladora o bioquímica similar a la de la secuencia presente en la naturaleza, aunque no necesariamente en la misma medida.
- 35 **[0045]** La expresión "hongos filamentosos" se refiere a todas las forma filamentosas de la subdivisión *Eumycotina*. Véase Alexopoulos, INTRODUCTORY MYCOLOGY, Wiley, Nueva York (1962). Estos hongos se caracterizan por un micelio vegetativo con una pared celular compuesta por quitina, celulosa y otros polisacáridos complejos. Los hongos filamentosos son morfológica, fisiológica y genéticamente distintos de las levaduras. El crecimiento vegetativo de los hongos filamentosos se produce por elongación de las hifas y el catabolismo del carbono es obligatoriamente aerobio. Una célula parental de hongo filamentoso puede ser una célula de *Trichoderma sp.*, por ejemplo *T. reesei* (clasificado previamente como *T. longibrachiatum* y conocido actualmente también como *Hypocrea jecorina*), *T. viricle*, *T. koningii*, *T. harzianum*; *Penicillium sp.*; *Humicola sp.*, por ejemplo *H. insolens* y *H. grisea*; *Chrysosporium sp.*, por ejemplo *C. lucknowense*; *Gliocladium sp.*; *Aspergillus sp.*, por ejemplo *A. oryzae*, *A. niger* y *A. awamori*; *Fusarium sp.*; *Neurospora sp.*; *Hypocrea sp.*; y *Emericella sp.* Véase también Innis y col., Science 228: 21-26 (1985).
- 40 **[0046]** Como se usa en la presente memoria, el término "almidón" se refiere a cualquier material compuesto por los carbohidratos polisacáridos complejos de plantas compuestos por amilosa y amilopectina con la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_x$, en la que X puede ser cualquier número. La expresión "almidón granular" se refiere al almidón crudo, es decir, sin cocer, por ejemplo al almidón que no ha sido sometido a una gelificación.
- 45 **[0047]** Como se usa en la presente memoria, el término "sacarificación" se refiere a la conversión enzimática de almidón en glucosa.
- 50
- 55
- 60

[0048] El término "licuefacción" se refiere al estado de conversión del almidón en el que el almidón gelificado se hidroliza para dar dextrinas solubles de bajo peso molecular. La expresión "grado de polimerización" (DP) se refiere al número (n) de unidades de anhidroglucopiranosas en un sacárido dado. Ejemplos de DP1 son los monosacáridos glucosa y fructosa. Ejemplos de DP2 son los disacáridos maltosa y sacarosa.

5 **[0049]** Como se usa en la presente memoria, la expresión "contenido en sólidos secos" (ss) se refiere a los sólidos totales de una suspensión expresados en porcentaje en peso seco. El término "suspensión" se refiere a una mezcla acuosa que contiene sólidos insolubles.

10 **[0050]** El término "ED" o "equivalente de dextrosa" se define como el porcentaje de azúcar reductor, es decir, D-glucosa, como fracción de los carbohidratos totales en un jarabe.

15 **[0051]** La expresión "sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)" se refiere a un proceso de la producción de productos bioquímicos en el que están presentes, durante el mismo paso del proceso, un organismo microbiano, tal como un microorganismo productor de etanol, y al menos una enzima, tal como TrAA o una variante de la misma. SFS se refiere a la hidrólisis contemporánea de sustratos de almidón granular para dar sacáridos, que incluyen glucosa, y la fermentación de los sacáridos para dar, por ejemplo, alcohol en el mismo recipiente de reacción.

20 **[0052]** Como se usa en la presente memoria, "microorganismo productor de etanol" se refiere a un microorganismo con la capacidad para convertir un azúcar o un oligosacárido en etanol.

1.2. Abreviaturas

25 **[0053]** Salvo que se indique lo contrario, se aplican las abreviaturas siguientes:

ADA	azodicarbonamida
AnGA	glucoamilasa de <i>Aspergillus niger</i>
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
30 BBA	β -amilasa Spezyme [®] BBA 1500L
ADNc	ADN complementario
ED	equivalente de dextrosa
DEAE	dietilaminoetanol
ADN	ácido desoxirribonucleico
35 DNS	ácido 3,5-dinitrosalicílico
DPn	grado de polimerización con n subunidades
ss	sólido seco
EC	comisión de enzimas para la clasificación de las enzimas
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
40 FGSC	Centro de Cepas Genéticas de Hongos
G173A	el resto glicina (G) en posición 173 está reemplazado por un resto alanina (A), designándose los aminoácidos con las abreviaturas de una sola letra bien conocidas en la técnica
GA	glucoamilasa
UG	unidad de actividad glucoamilasa
45 HFCS	jarabe de maíz con alto contenido en fructosa
HFSS	jarabe basado en almidón con alto contenido en fructosa
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
HgGA	glucoamilasa de <i>Humicola grisea</i>
AS	azúcares superiores (DPn, donde n > 3)
50 kb	kilobase
LAT	α -amilasa de <i>B. licheniformis</i>
LB	caldo de Luria Bertani
UL	unidades lipasa, una medida de la actividad fosfolipasa por unidad de masa de enzima
MOPS	ácido 3-(n-morfolino)propanosulfónico
55 ARNm	ácido ribonucleico mensajero
tm	tonelada métrica (1.000 kg)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
ppm	partes por millón
60 PU, UP	pululanasa o unidades pululanasa
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SD	caldo dextrosa Sabouraud
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

	SKBU/g ss	unidad α -amilasa por gramo de sólidos secos. Una unidad α -amilasa dextriniza 1,0 g de sustrato dextrina límite por hora en las condiciones del ensayo.
	1x SSC	NaCl 0,15 M, citrato sódico 0,015 M, pH 7,0
	SFS	sacarificación y fermentación simultáneas
5	TE	Tris 10 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM
	TrAA	α -amilasa de <i>Trichoderma reesei</i>
	TrGA	glucoamilasa de <i>Trichoderma reesei</i>
	p/v	peso/volumen
	p/p	peso/peso
10	YM	caldo extracto de levadura y malta
	μ l	microlitro

2. α -Amilasa de *Trichoderma reesei* (TrAA) y variantes de la misma

15 **[0054]** Se describe un polipéptido aislado y/o purificado que comprende la SEQ ID NO:3 para el uso en los procedimientos de la invención. Se trata de una α -amilasa natural de *Trichoderma reesei* (TrAA) que comprende una secuencia líder de 20 aminoácidos. En una realización, la TrAA es una forma madura del polipéptido en la que se ha disociado la secuencia líder de 20 aminoácidos, de manera que el extremo N-terminal del polipéptido comienza con el resto ácido aspártico (D) en la posición 21 de la SEQ ID NO:3.

20 **[0055]** Además de la α -amilasa natural de *Trichoderma reesei* (TrAA), se pueden usar variantes de la misma que difieren de la secuencia de la TrAA natural mostrada en la SEQ ID NO:3 en la sustitución, inserción o delección de uno o más aminoácidos. Por ejemplo, una α -amilasa variante puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35 ó 40 modificaciones de aminoácidos, por ejemplo 1 a 10 sustituciones de aminoácidos, al mismo tiempo que retiene la actividad α -amilasa maltogénica. La TrAA variante puede retener una actividad específica mayor o menor que la TrAA natural. Las variantes son sinónimos de "homólogos".

2.1. Caracterización de las variantes de la TrAA

30 **[0056]** Las variantes de la enzima se pueden caracterizar por sus secuencias de ácido nucleico y polipeptídica primaria, por modelado estructural tridimensional y/o por su actividad específica. Otras características de la variante de la TrAA incluyen, por ejemplo, estabilidad, intervalo de pH, estabilidad a la oxidación y termoestabilidad. En un aspecto, las variantes de la TrAA se expresan a niveles más altos que la TrAA natural al mismo tiempo que retienen las características de rendimiento de la TrAA natural. Los niveles de expresión y la actividad enzimática se pueden valorar usando ensayos convencionales conocidos para el experto en este campo. En otro aspecto, las variantes demuestran unas características de rendimiento mejoradas en relación con la enzima natural, tal como una estabilidad mejorada a altas temperaturas (es decir, 70 a 120°C) y/o a pH extremos (es decir, pH 4,0 a 6,0, o pH 8,0 a 11,0).

40 **[0057]** Una característica de expresión se refiere a un nivel de expresión alterado de la variante cuando la variante se produce en una célula huésped concreta. La expresión generalmente se refiere a la cantidad de variante activa que se puede recuperar de un caldo de fermentación a lo largo de un periodo de tiempo dado usando técnicas convencionales conocidas en la técnica. La expresión también se puede referir a la cantidad o la tasa de variante producida en la célula huésped o secretada por la célula huésped. La expresión también se puede referir a la tasa de traducción del ARNm que codifica la enzima variante.

45 **[0058]** Las variantes de la TrAA también pueden presentar una estabilidad alterada a la oxidación en comparación la α -amilasa parental. Por ejemplo, una estabilidad reducida a la oxidación puede resultar ventajosa en composiciones para la licuefacción de almidón.

50 **[0059]** La TrAA variante puede ser más termoestable que la α -amilasa natural. Tales variantes de la TrAA son ventajosas para el uso en procesos que requieran temperaturas elevadas. Por ejemplo, una variante termoestable de la TrAA puede degradar almidón a temperaturas de aproximadamente 55°C a aproximadamente 80°C o más. Una variante termoestable de la TrAA puede retener su actividad tras una exposición a temperaturas de hasta aproximadamente 95°C.

55 **[0060]** Los polipéptidos variantes de la α -amilasa descritos en la presente memoria también pueden presentar mutaciones que prolonguen la semivida en relación con la enzima parental en un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o más, especialmente a temperaturas elevadas de aproximadamente 55°C a aproximadamente 95°C o más, en particular a aproximadamente 80°C. En una realización, la variante de la TrAA se puede calentar durante aproximadamente 1 a 10 minutos a 80°C o más.

60 **[0061]** Los polipéptidos variantes de la TrAA pueden incluir adicionalmente mutaciones en la secuencia señal

del polipéptido parental o en cualquier otra parte del polipéptido parental de la TrAA. Por ejemplo, la variante de la TrAA puede encontrarse en forma de una proteína de fusión que comprende un polipéptido heterólogo, tal como el péptido señal de *B. licheniformis* (LAT), fusionado con la TrAA para promover la secreción de la proteína expresada desde una célula huésped bacteriana. Otros polipéptidos heterólogos que se pueden fusionar con la TrAA variante incluyen secuencias para, por ejemplo, facilitar la purificación de la proteína expresada. En una realización, una secuencia heteróloga incluye un sitio sensible a proteasas que permite cortar la secuencia heteróloga de la TrAA variante expresada.

[0062] El polipéptido variante de la TrAA codificado por el ácido nucleico puede poseer la misma estabilidad al pH que la secuencia parental. La variante de la TrAA puede comprender una mutación que confiere un mayor intervalo de estabilidad al pH o que desplaza el intervalo de pH a una zona deseada para la finalidad comercial última de la enzima. Por ejemplo, la variante de la TrAA puede degradar almidón entre aproximadamente pH 4,5 y aproximadamente pH 10,5. El polipéptido variante de la TrAA puede presentar, en condiciones idénticas, una semivida más larga o una actividad mayor (dependiendo del ensayo) en comparación con el polipéptido parental, o la variante de la TrAA puede presentar la misma actividad que el polipéptido parental. El polipéptido variante de la α -amilasa también puede presentar, en condiciones idénticas de pH, una semivida aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% más larga o mayor que su polipéptido parental. Alternativa o adicionalmente, la variante de la TrAA puede presentar una actividad específica mayor que el polipéptido parental en condiciones idénticas de pH.

3. Producción de TrAA y de las variantes de la misma

[0063] La TrAA natural se puede expresar en una cepa de *T. reesei* y, opcionalmente, aislar antes del uso. Alternativamente, la TrAA natural se purifica después de la expresión. Usando técnicas bien conocidas para el experto, se seleccionan cepas de *T. reesei* especialmente útiles que expresan altos niveles de la TrAA natural. Un alto nivel de expresión puede ser aproximadamente 12 a 20 g de TrAA o de una variante de la misma por litro de medio de cultivo, aproximadamente 14 a 18 g/l o aproximadamente 16 a 19 g/l. La TrAA natural o una variante de la misma se puede expresar por recombinación en una célula huésped. El gen de la TrAA se puede clonar y expresar como se describe, por ejemplo, en las solicitudes publicadas de EE.UU. nº 2007/0004018 y nº 2006/0094080.

3.1. Expresión recombinante de enzimas

[0064] Los microorganismos se pueden manipular genéticamente para expresar la TrAA o sus variantes. Las células huésped adecuadas incluyen células de hongos filamentosos, que pueden ser, por ejemplo, una cepa de *Aspergillus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Fusarium sp.* o *Penicillium sp.* Las células huésped fúngicas especialmente adecuadas incluyen *Aspergillus nidulans*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. japonicus*, *Trichoderma reesei*, *T. viride*, *Fusarium oxysporum* y *F. solani*. En Ward y col., Appl. Microbiol. Biotechnol. 39: 738-743 (1993) y Goedegebuur y col., Curr. Gene. 41: 89-98 (2002), se describen cepas de *Aspergillus*. En una realización especialmente adecuada, el huésped es una cepa de *Trichoderma reesei* que produce niveles relativamente altos de TrAA, por ejemplo de 15 a 20 g/l. Se conocen *T. reesei* adecuados, y ejemplos no limitantes incluyen ATCC nº 13631, ATCC nº 26921, ATCC nº 56764, ATCC nº 56765, ATCC nº 56767 y NRRL 15709. La cepa huésped es un derivado de RL-P37, que se describe en Sheir-Neiss y col., Appl. Microbiol. Biotechnology 20: 46-53 (1984). Cuando la TrAA o sus variantes se expresan en una célula huésped eucariota, la TrAA expresada puede presentar el mismo patrón de glicosilación que el que se encuentra en la TrAA natural. Las células huésped especialmente adecuadas incluyen células huésped de *Trichoderma reesei* manipuladas de acuerdo con los procedimientos expuestos en la patente de EE.UU. nº 5,874,276 y el documento WO 05/001036 (Genencor International, Inc.).

[0065] La célula huésped puede ser una célula huésped manipulada genéticamente con genes nativos desactivados, por ejemplo genes delecionados. Por ejemplo, la inactivación de uno o más genes en una célula huésped fúngica se puede realizar mediante procedimientos conocidos, como los que se describen en la patente de EE.UU. nº 5,246,853, la patente de EE.UU. nº 5,475,101 y el documento WO 92/06209. La inactivación génica se puede efectuar mediante deleción completa o parcial, inactivación insercional o mediante cualquier otro medio que convierta a un gen en no funcional respecto a su finalidad deseada, impidiendo de este modo que el gen exprese una proteína funcional. Los genes inactivados pueden incluir, por ejemplo, genes que codifican enzimas celulolíticas, tales como endoglucanasas y exocelobiohidrolasas, por ejemplo *cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2* y *egl3*. En una realización, cuando la célula huésped es una célula de *Trichoderma*, en particular una célula huésped de *T. reesei*, se inactivarán y, en particular, se delecionarán los genes *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl2*. En la patente de EE.UU. nº 5,874,276 y el documento WO 05/001036 se exponen y describen células huésped de *T. reesei* especialmente adecuadas que presentan cuatro proteínas delecionadas. La patente de EE.UU. nº 5,650,322 describe cepas derivadas de RL-P37 que presentan deleciones en el gen *cbh1* y el gen *cbh2*, por ejemplo.

[0066] Otras células huésped adecuadas incluyen una bacteria gram-positiva seleccionada del grupo formado por *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. thuringiensis*, *Streptomyces lividans* o *S. murinus*; o una

bacteria gram-negativa, siendo dicha bacteria gram-negativa *Escherichia coli* o una especie de *Pseudomonas*.

[0067] La célula huésped que expresa una TrAA o una variante de la misma también se puede manipular genéticamente para expresar una GA heteróloga.

5

3.2. Vectores

[0068] Típicamente se prepara una construcción de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una TrAA o una variante de la misma para que se exprese en una célula huésped. Los ácidos nucleicos representativos que codifican una TrAA incluyen las SEQ ID NO:1 y 2. La construcción de ADN se puede transferir a una célula huésped mediante un vector de expresión que comprende secuencias reguladoras unidas funcionalmente a una secuencia que codifica la TrAA.

10

[0069] El vector puede ser cualquier vector que se pueda integrar en el genoma de una célula huésped fúngica y replicar cuando se introduce en la célula huésped. El Catálogo de Cepas del FGSC enumera vectores adecuados. Véase FGSC, Catálogo de Cepas, Universidad de Missouri, en www.fgsc.net (última actualización 17 de enero de 2007). En Sambrook y col., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (2001); Bennett y col., MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press, San Diego (1991), págs. 396-428; y la patente de EE.UU. nº 5,874,276 se proporcionan ejemplos adicionales de vectores de expresión y/o de integración adecuados. Los vectores especialmente útiles incluyen pFB6, pBR322, PUC18, pUC100 y pENTR/D, pDONTM201, pDONRTM221, pENTRTM, pGEM[®]3Z y pGEM[®]4Z. Los plásmidos adecuados para el uso en células bacterianas incluyen pBR322 y pUC19, que permiten la replicación en *E. coli*, y pE194, por ejemplo, que permite la replicación en *Bacillus*.

15

20

[0070] En general, un ácido nucleico que codifica una TrAA o una variante de la misma se une funcionalmente a un promotor adecuado que permita la transcripción en la célula huésped. El promotor puede proceder de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas con respecto a la célula huésped. Preferentemente, el promotor es útil en un huésped de *Trichoderma*. Ejemplos adecuados no limitantes de promotores incluyen los promotores de *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl2*. El promotor puede ser uno que es nativo de la célula huésped. Por ejemplo, cuando el huésped es *T. reesei*, el promotor es un promotor nativo de *T. reesei*, por ejemplo *cbh1* de *T. reesei*, que es un promotor inducible depositado en GenBank bajo el número de acceso D86235. Un "promotor inducible" es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o del desarrollo. De forma alternativa, el promotor es uno que es heterólogo con respecto a la célula huésped. Otros ejemplos de promotores útiles incluyen los promotores de los genes de la glucoamilasa de *Aspergillus awamori* y *A. niger*. Véanse Nunberg y col., Mol. Cell. Biol. 4: 2306-2315 (1984) y Boel y col., EMBO J. 3: 1581-1585 (1984).

25

30

35

[0071] La secuencia codificante puede estar unida funcionalmente a una secuencia señal. El ADN que codifica la secuencia señal puede ser la secuencia de ADN asociada de forma natural al gen de la TrAA que se ha de expresar. Por ejemplo, el ADN codificante puede comprender la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:4, que codifica la secuencia señal de la TrAA de SEQ ID NO:5, o una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal de una especie distinta de *Trichoderma reesei*. El polinucleótido que codifica la secuencia señal normalmente se encuentra inmediatamente en la dirección 5' y en el marco del polinucleótido que codifica el polipéptido. La secuencia señal y la secuencia promotora que componen una construcción de ADN o un vector que se ha de introducir en una célula huésped fúngica pueden provenir de la misma fuente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la secuencia señal es la secuencia señal de *cbh1* que se une funcionalmente a un promotor de *cbh1*.

40

45

[0072] El vector de expresión también puede incluir una secuencia de terminación. En una realización, la secuencia de terminación y la secuencia promotora provienen de la misma fuente. La secuencia de terminación puede ser homóloga con respecto a la célula huésped. Una secuencia de terminación especialmente adecuada es *cbh1* procedente de una cepa de *Trichoderma* y, en particular, de *T. reesei*. Otros terminadores fúngicos útiles incluyen el terminador del gen de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *A. awamori*. Véanse Nunberg y col. (1984), antes citado, y Boel y col (1984), antes citado.

50

[0073] El vector de expresión puede incluir un marcador seleccionable. Ejemplos de marcadores seleccionables adecuados incluyen aquellos que confieren resistencia a agentes antimicrobianos, por ejemplo higromicina o fleomicina. También son adecuados los marcadores selectivos nutricionales que incluyen *amdS*, *argB* y *pyr4*. Los marcadores útiles en los sistemas de vectores para la transformación de *Trichoderma* son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, BIOTECHNOLOGY OF FILAMENTOUS FUNGI, Finkelstein y col., eds., Butterworth-Heinemann, Boston, Mass. (1992); cap. 6; y Kingdom y col., APPLIED MOLECULAR GENETICS OF FILAMENTOUS FUNGI, Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, Londres (1992). El gen *amdS* codifica la enzima acetamidasa; permite el crecimiento de las células transformadas en acetamida como fuente de nitrógeno. El uso de un gen *amdS* de *A. nidulans* como marcador selectivo se describe en Kelley y col., EMBO J. 4: 475-479 (1985) y Penttila y col., Gene 61: 155-164 (1987).

55

60

[0074] Un vector de expresión adecuado que comprende una construcción de ADN con un polinucleótido que codifica una TrAA o una variante de la misma puede ser cualquier vector que sea capaz de replicarse de forma autónoma en un organismo huésped dado o de integrarse en el ADN del huésped, por ejemplo un plásmido. En algunos sistemas se usan dos tipos de vectores de expresión para obtener la expresión de genes. El primer vector de expresión comprende secuencias de ADN en las que el promotor, la región codificante de la TrAA y el terminador provienen todos del gen que se ha de expresar. Se puede obtener un truncamiento génico por delección de secuencias de ADN no deseadas, por ejemplo ADN que codifica dominios no deseados, para dejar el dominio que se ha de expresar bajo el control de sus propias secuencias reguladoras de transcripción y traducción. El segundo tipo de vector de expresión está preensamblado y contiene secuencias necesarias para obtener altos niveles de transcripción y un marcador seleccionable. Típicamente, la región codificante de un gen de TrAA o parte de la misma se inserta en este vector de expresión de utilidad general de manera que se encuentre bajo el control transcripcional de las secuencias promotora y terminadora de la construcción de expresión, como el fuerte promotor de *cbh1*.

[0075] Los procedimientos usados para ligar una construcción de ADN que comprende un polinucleótido que codifica una TrAA o una variante de la misma, un promotor, un terminador y otras secuencias y los procedimientos para insertar la construcción en un vector adecuado son conocidos en la técnica. La unión se efectúa generalmente por ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, se usan los conectores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional. Véanse, por ejemplo, Sambrook (2001), antes citado, y Bennett y col. (1991), antes citado. Adicionalmente, los vectores se pueden construir usando técnicas de recombinación conocidas en la técnica.

[0076] Se pueden usar procedimientos conocidos para obtener una célula huésped fúngica con uno o más genes inactivados, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 5,246,853; la patente de EE.UU. nº 5,475,101; y el documento WO 92/06209. La inactivación génica se puede efectuar mediante delección completa o parcial, por inactivación insercional o mediante cualquier otro medio que convierta a un gen en no funcional respecto a su finalidad deseada, impidiendo de este modo que el gen exprese una proteína funcional. Se puede delecionar cualquier gen de *Trichoderma sp.* o de otro huésped fúngico filamentoso que haya sido clonado, por ejemplo los genes *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl2*. La delección génica se puede efectuar insertando una forma del gen deseado que se ha de inactivar en un plásmido mediante procedimientos conocidos en la técnica. El plásmido de delección se corta después en un sitio(s) apropiado de restricción para enzimas dentro de la región codificante del gen deseado y la secuencia codificante del gen o una parte de ella es sustituida por un marcador seleccionable. A ambos lados del gen marcador permanecen secuencias de ADN flanqueantes del locus del gen que se ha de delecionar, por ejemplo entre aproximadamente 0,5 y 2,0 kb. Un plásmido de delección apropiado generalmente presentará sitios de restricción para enzimas únicos, presentes para poder retirar el fragmento que contiene el gen delecionado, incluidas las secuencias de ADN flanqueantes y el gen marcador seleccionable, en una sola pieza lineal.

3.3. Transformación, expresión y cultivo de las células huésped

[0077] La introducción de una construcción de ADN o de un vector en una célula huésped incluye técnicas tales como transformación; electroporación; microinyección nuclear; transducción; transfección, por ejemplo, mediada por lipofección y mediada por DEAE-dextrano; incubación con precipitado de ADN por fosfato cálcico; bombardeo de alta velocidad con microproyectiles recubiertos con ADN; y fusión de protoplastos. Las técnicas de transformación generales son conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, Ausubel y col. (1987), antes citado, capítulo 9; Sambrook y col. (2001), antes citado; y Campbell y col., *Curr. Genet.* 16: 53-56 (1989). La expresión de proteínas heterólogas en *Trichoderma* se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. nº 6,022,725; la patente de EE.UU. nº 6,268,328; Harkki y col., *Enzyme Microb. Technol.* 13: 227-233 (1991); Harkki y col., *BioTechnol.* 7: 596-603 (1989); documento EP 244234; documento EP 215594; y Nevalainen y col., "The molecular biology of *Trichoderma* and its application to the expression of both homologous and heterologous genes", en *MOLECULAR INDUSTRIAL MYCOLOGY*, Leong y Berka, eds., Marcel Dekker Inc., Nueva York (1992), págs. 129-148. También se hace referencia a Cao y col., *Science* 9: 991-1001 (2000) para la transformación de cepas de *Aspergillus*. Se pueden construir transformantes genéticamente estables con sistemas de vectores por medio de los cuales el ácido nucleico que codifica una TrAA o una variante de la misma se integra de forma estable en el cromosoma de una célula huésped. Los transformantes se purifican después mediante técnicas conocidas.

[0078] Los transformantes estables que incluyen un marcador *amdS* se distinguen de los transformantes inestables por su tasa de crecimiento más rápida y la formación de colonias circulares con un contorno liso en lugar de mellado sobre medio de cultivo sólido que contiene acetamida. En algunos casos se realiza adicionalmente un ensayo de estabilidad adicional en el que se hacen crecer los transformantes sobre medio sólido no selectivo, por ejemplo un medio exento de acetamida, se recogen las esporas de este medio de cultivo y se determina el porcentaje de estas esporas que seguidamente germinan y crecen sobre medio selectivo que contiene acetamida. Se pueden usar otros procedimientos conocidos en la técnica para seleccionar los transformantes.

[0079] La preparación de *Trichoderma sp.* para la transformación puede implicar la preparación de protoplastos a partir de micelios fúngicos. Véase Campbell y col., *Curr. Genet.* 16: 53-56 (1989). Los micelios se

pueden obtener a partir de esporas vegetativas germinadas. Los micelios se tratan con una enzima que digiere la pared celular, dando como resultado protoplastos. Los protoplastos se protegen mediante la presencia de un estabilizador osmótico en el medio de suspensión. Estos estabilizadores incluyen sorbitol, manitol, cloruro potásico, sulfato de magnesio y similares. La concentración de estos estabilizadores varía habitualmente entre 0,8 M y 1,2 M, pudiéndose usar, por ejemplo, una solución de sorbitol 1,2 M en el medio de suspensión.

[0080] La captación de ADN por parte de la cepa huésped de *Trichoderma sp.* depende de la concentración de ion calcio. En una solución de captación generalmente se usa CaCl_2 de aproximadamente 10 a 50 mM. Otros compuestos adecuados adicionales incluyen un sistema tamponante, tal como tampón TE (Tris 10 mM, pH 7,4; EDTA 1 mM) o MOPS 10 mM, pH 6,0, y polietilenglicol. Se cree que el polietilenglicol fusiona las membranas celulares, permitiendo de este modo que el contenido del medio sea liberado al citoplasma de la cepa de *Trichoderma sp.* Esta fusión con frecuencia deja múltiples copias del ADN plasmídico integradas en el cromosoma del huésped.

[0081] En la transformación de *Trichoderma sp.* habitualmente se usan protoplastos o células que han sido sometidos a un tratamiento de permeabilidad, típicamente a una densidad de 10^5 a 10^7 /ml, en particular de 2×10^6 /ml. Un volumen de 100 μl de estos protoplastos o células en una solución apropiada (por ejemplo sorbitol 1,2 M y CaCl_2 50 mM) se mezcla con el ADN deseado. Generalmente se añade una concentración elevada de PEG a la solución de captación. Se puede añadir entre 0,1 y 1 volumen de PEG 4000 al 25% a la suspensión de protoplastos; sin embargo, resulta útil añadir aproximadamente 0,25 volúmenes a la suspensión de protoplastos. Asimismo se pueden añadir a la solución de captación aditivos, tales como dimetilsulfóxido, heparina, espermidina, cloruro potásico y similares, para facilitar la transformación. Se dispone de procedimientos similares para otras células huésped fúngicas. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 6,022,725 y 6,268,328.

[0082] Generalmente, la mezcla se incuba después a aproximadamente 0°C durante un periodo de tiempo de 10 a 30 minutos. Después se añade PEG adicional a la mezcla para fomentar la captación del gen o de la secuencia de ADN deseados. El PEG 4000 al 25% generalmente se añade en volúmenes de 5 a 15 veces el volumen de la mezcla de transformación; sin embargo, pueden ser adecuados volúmenes mayores y menores. El PEG 4000 al 25% asciende típicamente a aproximadamente 10 veces el volumen de la mezcla de transformación. Una vez añadido el PEG, la mezcla de transformación se incuba bien a temperatura ambiente o bien sobre hielo antes de añadir una solución de sorbitol y CaCl_2 . La suspensión de protoplastos se añade después a alícuotas fundidas de un medio de crecimiento. Este medio de crecimiento permite solo el crecimiento de los transformantes.

[0083] En general, las células se cultivan en un medio convencional que contiene sales fisiológicas y nutrientes. Véanse, por ejemplo, Pourquie y col., BIOCHEMISTRY AND GENETICS OF CELLULOSE DEGRADATION, Aubert y col., eds., Academic Press (1988), págs. 71-86; e Ilmen y col., Appl. Environ. Microbiol. 63: 1298-1306 (1997). También son adecuados los medios comunes preparados comercialmente, por ejemplo caldo extracto de levadura y malta (YM), caldo de Luria Bertani (LB) o caldo dextrosa Sabouraud (SD).

[0084] Son adecuadas las condiciones de cultivo convencionales; por ejemplo, los cultivos se incuban a aproximadamente 28°C en un medio apropiado en cultivos en agitación o fermentadores hasta alcanzar el nivel deseado de expresión de una TrAA o de una variante de la misma. Las condiciones de cultivo preferidas para un hongo filamentosos dado son conocidas en la técnica y están disponibles, por ejemplo, en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) y el Centro de Cepas Genéticas de Hongos (FGSC). Una vez establecido el crecimiento del hongo, las células se exponen a condiciones efectivas para causar o permitir la expresión de una TrAA o de una variante de la misma.

3.4. Identificación de la actividad de la TrAA

[0085] Para evaluar la expresión de una TrAA o de una variante de la misma en una célula huésped se pueden medir la proteína expresada, el ARNm correspondiente o la actividad α -amilasa maltogénica en ensayos. Los ensayos adecuados incluyen, por ejemplo, transferencias Northern y Southern, RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) e hibridación *in situ*, usando una sonda de hibridación marcada de forma apropiada. Los ensayos adecuados también incluyen la medición de la actividad de la TrAA en una muestra, por ejemplo mediante ensayos que miden directamente los azúcares reductores, tales como glucosa, en los medios de cultivo. La concentración de glucosa se puede determinar, por ejemplo, usando el kit de reactivos para glucosa n° 15-UV (Sigma Chemical Co.) o un instrumento, tal como el autoanalizador Technicon. La actividad glucoamilasa se puede ensayar mediante el procedimiento del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Véase Goto y col., Biosci. Biotechnol. Biochem. 58: 49-54 (1994).

[0086] Generalmente, la TrAA expresada en un huésped *Trichoderma* o *Aspergillus* presentará una concentración en el medio de cultivo superior a 1 gramo de proteína por litro (g/l), superior a 2 g/l, superior a 5 g/l, superior a 10 g/l, superior a 20 g/l o superior a 25 g/l. La TrAA o la variante de la misma expresada en un huésped *Trichoderma* o *Aspergillus* puede estar glucosilada, es decir, la TrAA o la variante de la misma comprenderá un resto

glucosilo. El patrón de glucosilación puede ser el mismo que el que está presente en la TrAA natural.

3.5. Procedimientos para la purificación de la TrAA

5 **[0087]** En general, una TrAA o una variante de la misma producida en un cultivo celular es secretada al medio y se puede purificar o aislar, por ejemplo, eliminando los componentes no deseados del medio de cultivo celular. En algunos casos, una TrAA o una variante de la misma se puede recuperar de un lisado celular. En tales casos, la enzima se purifica a partir de las células en las que se ha producido usando técnicas utilizadas de forma rutinaria por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cromatografía de afinidad, 10 procedimientos cromatográficos de intercambio iónico que incluyen intercambio iónico de alta resolución, cromatografía de interacción hidrófoba, reparto entre dos fases, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico, tal como DEAE, cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel usando Sephadex G-75, por ejemplo.

15 3.6. Fermentación

[0088] Las células fúngicas que expresan una TrAA o una variante de la misma se pueden cultivar en condiciones de fermentación continua o discontinua. Una fermentación discontinua clásica consiste en un sistema cerrado en el que la composición del medio se fija al principio de la fermentación y no se altera durante la 20 fermentación. Al comienzo de la fermentación el medio se inocula con el (los) organismo(s) deseado(s). En este procedimiento, la fermentación se deja que transcurre sin la adición de ningún componente al sistema. Típicamente, una fermentación discontinua se califica de "discontinua" con respecto a la adición de la fuente de carbono, y con frecuencia se intenta controlar factores tales como el pH y la concentración de oxígeno. Las composiciones del metabolito y de la biomasa del sistema discontinuo cambian constantemente hasta el momento en que se detiene la 25 fermentación. En los cultivos discontinuos, las células progresan desde una fase de adaptación (lag) estática a una fase logarítmica de alto crecimiento y, finalmente, hasta una fase estacionaria, en la que la tasa de crecimiento disminuye o se detiene. Si no se tratan, las células en la fase estacionaria finalmente mueren. En general, las células en fase logarítmica son las responsables de la mayor parte de la producción de producto.

30 **[0089]** Una variación útil del sistema discontinuo convencional es el sistema de "fermentación discontinua alimentada". En esta variación de un sistema discontinuo típico el sustrato se añade en incrementos a medida que la fermentación progresa. Los sistemas discontinuos alimentados son útiles cuando es probable que la represión catabólica inhiba el metabolismo de las células y cuando resulta deseable tener cantidades limitadas de sustrato en el medio. La medición de la concentración real de sustrato en los sistemas discontinuos alimentados es difícil y, por 35 lo tanto, se estima en base a los cambios observados en factores medibles, tales como pH, oxígeno disuelto y la presión parcial de los gases de desecho, tales como CO₂. Las fermentaciones discontinua y discontinua alimentada son habituales y conocidas en la técnica.

[0090] La fermentación continua es un sistema abierto en el que se añade de forma continua un medio de 40 fermentación definido a un biorreactor y se retira simultáneamente la misma cantidad de medio acondicionado para el procesamiento. La fermentación continua generalmente mantiene los cultivos a una densidad elevada constante, encontrándose las células principalmente en la fase de crecimiento logarítmico. La fermentación continua permite modular uno o más factores que afecten al crecimiento celular y/o a la concentración de producto. Por ejemplo, un nutriente limitante, tal como la fuente de carbono o la fuente de nitrógeno, se mantiene a una tasa fija y todos los 45 demás parámetros se pueden modular. En otros sistemas, se pueden alterar continuamente numerosos factores que afecten al crecimiento mientras se mantiene constante la concentración de células, medida a partir de la turbidez del medio. Los sistemas continuos procuran mantener las condiciones de crecimiento del estado estacionario. Así, la pérdida de células debida a la retirada del medio se deberá compensar con la tasa de crecimiento celular en la fermentación. En la técnica de la microbiología industrial se conocen procedimientos para modular nutrientes y 50 factores de crecimiento para los procesos de fermentación continua, así como técnicas para maximizar la tasa de formación de producto.

4. Usos de la TrAA y de sus variantes

55 4.1. Preparación de sustratos de almidón

[0091] Los expertos normales en la técnica estarán al corriente de los procedimientos disponibles que se pueden usar para preparar sustratos de almidón para el uso en los procesos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, se puede obtener un sustrato de almidón útil a partir de tubérculos, raíces, tallos, legumbres, cereales o 60 grano entero. Más específicamente, el almidón granular se puede obtener a partir de maíz, zuro, trigo, cebada, centeno, milo, sagú, yuca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, judías, plátanos o patatas. El maíz contiene entre aproximadamente 60 y 68% de almidón; la cebada contiene entre aproximadamente 55 y 65% de almidón; el mijo contiene entre aproximadamente 75 y 80% de almidón; el trigo contiene entre aproximadamente 60 y 65% de almidón; y el arroz pulido contiene entre 70 y 72% de almidón. Los sustratos de almidón que se consideran

específicamente son almidón de maíz y almidón de trigo. El almidón procedente de un grano puede estar molido o entero e incluye sólidos de maíz, tales como semillas, salvado y/o zuro. El almidón puede ser almidón bruto altamente refinado o materia prima de los procesos de refinación de almidón. También existen diferentes almidones disponibles en el mercado. Por ejemplo, el almidón de maíz está disponible en Cerestar, Sigma, y Katayama Chemical Industry Co. (Japón); el almidón de trigo está disponible en Sigma; el almidón de batata está disponible en Wako Pure Chemical Industry Co. (Japón); y el almidón de patata está disponible en Nakaari Chemical Pharmaceutical Co. (Japón).

[0092] El sustrato de almidón puede ser un almidón crudo procedente de granos enteros molidos que contiene fracciones sin almidón, por ejemplo residuos de germen y fibras. La molienda puede comprender bien la molienda en húmedo o bien la molienda en seco. En la molienda en húmedo, el grano entero se pone en remojo en agua o ácido diluido para separar el grano en sus partes constituyentes, por ejemplo almidón, proteína, germen, aceite, fibras de semilla. La molienda en húmedo separa eficazmente el germen y la harina (es decir, gránulos de almidón y proteína) y es especialmente adecuada para la producción de jarabes. En la molienda en seco, las semillas enteras se muelen para dar un polvo fino y se procesan sin fraccionar el grano en sus partes constituyentes. El grano molido en seco comprenderá así, además del almidón, cantidades significativas de compuestos carbohidratados distintos del almidón. De forma alternativa, el almidón que se ha de procesar puede ser un almidón altamente refinado, por ejemplo con una pureza de al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o al menos 99,5%.

4.2. Gelificación y licuefacción del almidón

[0093] Como se usa en la presente memoria, el término "licuefacción" o "licuar" se refiere a un proceso por medio del cual el almidón se convierte en dextrinas menos viscosas y de cadena más corta. En general, este proceso implica la gelificación del almidón simultáneamente con o seguida de la adición de una α -amilasa, aunque se pueden añadir opcionalmente enzimas adicionales que induzcan licuefacción. En algunas realizaciones, el sustrato de almidón preparado como se ha descrito anteriormente se suspende en agua. La suspensión de almidón puede contener, en porcentaje en peso de sólidos secos, entre aproximadamente 10 y 55%, entre aproximadamente 20 y 45%, entre aproximadamente 30 y 45%, entre aproximadamente 30 y 40% o entre aproximadamente 30 y 35% de almidón. La α -amilasa (EC 3.2.1.1) se puede añadir a la suspensión con, por ejemplo, una bomba dosificadora. La α -amilasa usada típicamente para esta aplicación es una α -amilasa bacteriana termoestable, tal como una α -amilasa de *B. licheniformis*. Habitualmente, la α -amilasa se suministra, por ejemplo, a aproximadamente 1.500 unidades por kg de materia seca de almidón. Para optimizar la estabilidad y actividad de la α -amilasa, el pH de la suspensión se ajusta a entre aproximadamente pH 5,5 y 6,5, y típicamente se añade calcio aproximadamente 1 mM (aproximadamente 40 ppm de iones calcio libres). Otras α -amilasas puede requerir condiciones diferentes. La α -amilasa bacteriana que permanece en la suspensión después de la licuefacción se puede desactivar bajando el pH en un paso de reacción subsiguiente o eliminando el calcio de la suspensión.

[0094] La suspensión de almidón más la α -amilasa se puede bombear de forma continua a través de un aparato de cocción a presión que se calienta a vapor a 105°C. La gelificación ocurre muy rápidamente en estas condiciones, y la actividad enzimática, combinada con las significativas fuerzas de corte, inicia la hidrólisis del sustrato de almidón. El tiempo de permanencia en el aparato de cocción a presión es muy breve. El almidón parcialmente gelificado se puede transferir a una serie de tubos de retención mantenidos entre 100 y 105°C y retener durante 5 min para completar el proceso de gelificación. La hidrólisis se completa hasta alcanzar el ED requerido en depósitos de retención entre 90 y 100°C, o a temperaturas superiores, durante aproximadamente 1 a 2 horas. Estos depósitos pueden contener separadores para impedir el retromezclado.

[0095] Como se usa en la presente memoria, la expresión "licuefacción secundaria" se refiere al paso de licuefacción posterior a la licuefacción primaria (calentamiento a 90-100°C), cuando la suspensión se deja enfriar a temperatura ambiente. Este paso de enfriamiento puede durar de 30 minutos a 180 minutos, por ejemplo de 90 minutos a 120 minutos. Como se usa en la presente memoria, la expresión "minutos de licuefacción secundaria" se refiere al tiempo transcurrido desde el inicio de la licuefacción secundaria hasta el momento en que se mide el equivalente de dextrosa (ED).

[0096] El almidón licuado resultante del proceso anterior típicamente contiene aproximadamente 98% de oligosacáridos y aproximadamente 2% de maltosa y 0,3% de D-glucosa. El almidón licuado típicamente se encuentra en forma de una suspensión que presenta aproximadamente 10 a 50% de ss; aproximadamente 10 a 45%; aproximadamente 15 a 40%; aproximadamente 20 a 40%; aproximadamente 25 a 40%; o aproximadamente 25 a 35% de ss.

4.3. Sacarificación: Creación de un jarabe de maltosa

[0097] El almidón licuado se sacarifica para dar un jarabe de maltosa usando la TrAA y las variantes de la misma, opcionalmente en presencia de otra(s) enzima(s). La composición exacta de los productos de la sacarificación depende de la combinación de enzimas usada, así como del tipo de almidón granular procesado. El

jarabe de maltosa que se puede obtener usando la TrAA proporcionada y las variantes de la misma puede contener más del 60% p/p de maltosa.

[0098] En general, la TrAA o una variante de la misma se añade a una suspensión de un sustrato de almidón granular en una cantidad de aproximadamente 0,01 a 1 kg de enzima por tonelada métrica de sólidos secos. En algunas realizaciones, la TrAA o una variante de la misma se añade en una cantidad de 0,1 a 5 kg/tm de ss o de 0,3 a 1 kg/tm de ss, o a aproximadamente 0,5 kg/tm de ss. La actividad específica de la TrAA o de la variante de la misma puede ascender a entre aproximadamente 10.000 y 80.000 SKBU/g de enzima o a entre aproximadamente 15.000 y 60.000 SKBU/g o a entre aproximadamente 15.000 y 30.000 SKBU/g.

[0099] La TrAA o una variante de la misma se puede añadir a la suspensión en forma de enzima purificada. De forma alternativa, la TrAA o una variante de la misma se puede añadir en forma de una solución de enzima aislada. En una realización, la TrAA o una variante de la misma se añade en forma de un extracto celular producido a partir de un cultivo de células que expresan la TrAA o la variante de la misma. En otra realización, la TrAA o una variante se añade en forma de una célula huésped que expresa y secreta la TrAA o la variante al medio de reacción, de manera que la enzima es proporcionada de forma continua a la reacción. En esta realización, la célula huésped que expresa la TrAA o una variante de la misma también puede expresar otra enzima que se use además de la TrAA o su variante para catalizar la sacarificación. Por ejemplo, una célula huésped, por ejemplo *Trichoderma reesei* o *Aspergillus niger*, se pueden manipular para que coexpresen la TrAA o una variante de la misma y una glucoamilasa, por ejemplo TrGA o HgGA. En una realización, la célula huésped se modifica genéticamente de manera que no exprese su glucoamilasa endógena.

4.3.1. Jarabes de maltosa

[0100] La TrAA o una variante de la misma se usa en un proceso de producción de un jarabe con un alto contenido en maltosa. Entre las ventajas que ofrece la TrAA y sus variantes se encuentra la posibilidad de usar la TrAA y sus variantes a pH relativamente bajos. En la fig. 2 se representa una dependencia de pH representativa de la TrAA para la producción de maltosa (DP2). Puesto que la sacarificación típicamente transcurre en condiciones ácidas y a temperaturas elevadas, por ejemplo a 60°C y pH 4,3, la alta actividad de la TrAA o de sus variantes en estas condiciones permite ventajosamente el uso de la TrAA o de sus variantes en condiciones que son óptimas para otras enzimas, por ejemplo las glucoamilasas, usadas en la sacarificación.

[0101] Los jarabes con un alto contenido en maltosa producidos con una TrAA o sus variantes presentan propiedades ventajosas. La concentración de maltosa alcanzada usando la TrAA o sus variantes es comparable o superior a la que se alcanza con las enzimas maltogénicas convencionales, tales como BBA o la α -amilasa fúngica Clarase[®] L. Véanse las tablas 3 y 4 y la fig. 2. En una realización, la concentración de maltosa alcanza un porcentaje de sólidos secos de aproximadamente 50% a aproximadamente 62%. En otra realización, la concentración de maltosa llega de aproximadamente 55%, aproximadamente 60% o aproximadamente 61% a aproximadamente 62%. Además, el jarabe con un alto contenido en maltosa obtenido usando la TrAA puede contener glucosa en una concentración de aproximadamente 8 a 9%, mientras que un jarabe convencional con un alto contenido en maltosa producido en condiciones comparables, por ejemplo usando Clarase[®] L, presenta típicamente una concentración de glucosa de aproximadamente 4 a 5%. Véase la tabla 3. El rendimiento relativamente alto de glucosa hace que el jarabe con un alto contenido en maltosa preparado usando la TrAA o sus variantes sea más dulce que los jarabes con un alto contenido en maltosa producidos usando enzimas convencionales.

[0102] La TrAA o una variante de la misma puede catalizar la producción de un jarabe con un alto contenido en maltosa por sí misma o en presencia de al menos otra enzima más. Una enzima especialmente adecuada para el uso con la TrAA o una variante de la misma es la pululanasa. La adición de una pululanasa aumenta significativamente el rendimiento de maltosa, como se muestra en la tabla 5 y en la fig. 3. La cantidad de pululanasa añadida puede ascender a aproximadamente 0,1 kg/tm de ss, a aproximadamente 0,25 kg/tm de ss o a aproximadamente 0,5 kg/tm de ss. En una realización, la cantidad de pululanasa añadida para proporcionar un incremento máximo de maltosa producida en la reacción. Los datos en la tabla 5 indican que el efecto de la pululanasa en la formación de maltosa es máximo cuando la concentración de pululanasa asciende a aproximadamente 0,25 kg/tm de ss en las condiciones concretas usadas para producir maltosa, indicadas en el texto que acompaña la tabla 5 en los ejemplos más adelante.

[0103] Otras enzimas adecuadas para el uso con la TrAA o variantes de la misma incluyen β -amilasas bacterianas, por ejemplo BBA, otras α -amilasas fúngicas, por ejemplo Clarase[®] L, o la glucoamilasa. Otras enzimas adecuadas adicionales incluyen proteasas, tales como proteasas fúngicas y bacterianas. Las proteasas fúngicas incluyen las obtenidas de *Aspergillus*, como *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*; *Mucor*, por ejemplo *M. miehei*; y *Rhizopus*. Otras enzimas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, celulasas, hemicelulasas, lipasas, isoamilasas y cutinasas.

[0104] Las β -amilasas (EC 3.2.1.2) son amilasas maltogénicas exoactivas que catalizan la hidrólisis de los enlaces α -1,4-glucosídicos para dar amilopectina y polímeros de glucosa relacionados, liberando de este modo maltosa. Las β -amilasas se han aislado de diversas plantas y microorganismos. Véase Fogarty y col., en PROGRESS IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, vol. 15, págs. 112-115 (1979). Estas β -amilasas presentan temperaturas óptimas comprendidas en el intervalo de 40°C a 65°C y pH óptimos comprendidos en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,0. Las β -amilasas que se consideran incluyen, pero no se limitan a, las β -amilasas de cebada Spezyme[®] BBA 1500, Spezyme[®] DBA, Optimalt[™] ME, Optimalt[™] BBA (Genencor International, Inc.) y Novozym[™] WBA (Novozymes A/S).

10 EJEMPLOS

Ejemplo 1

1.1 Clonación del gen de la TrAA

[0105] Se aisló ADN cromosómico de *T. reesei* QM6a a partir de una masa micelial de un cultivo líquido en caldo de dextrosa de patata (Difco[™], nº de cat. 254920) usando el sistema B10101 Fast Prep[®] de acuerdo con el procedimiento descrito por el proveedor (Qbiogene, Inc., Irvine, CA). El ADN se purificó usando una columna Quick Spin (Qiagen, Inc., Valencia, CA; nº de cat. 28106). El gen de la TrAA se aisló usando cebadores con secuencias específicas de la TrAA, un cebador directo NSP331 (SEQ ID NO:6: ATGAAGCTCCGGTACGCTCTCC) y un cebador inverso NSP332 (SEQ ID NO:7: TCACGAAGACAGCAAGACAATGGGC) diseñados de acuerdo con la secuencia de nucleótidos predicha en la base de datos del genoma de *Trichoderma reesei* del Instituto de Genómica Adjunto del Departamento de Energía de Estados Unidos. Los cebadores estaban flanqueados en el extremo 5' por secuencias Gateway[®] AttB (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). El ADN cromosómico de *T. reesei* QM6a se usó como molde.

[0106] La mezcla de PCR contenía los componentes siguientes: 4 μ l del cebador directo (10 μ M); 4 μ l del cebador inverso (10 μ M); 1 μ l de ADN molde (500 ng/ μ l); 2 μ l de mezcla de dNTP (10 mM); 10 μ l de tampón Cx 10x; y 0,5 μ l de ADN polimerasa PfuTurbo[®] Cx Hotstart (Stratagene, La Jolla, CA; nº de cat. 600410). Se añadió agua desionizada hasta un volumen total de 100 μ l. El protocolo para la PCR fue el siguiente: desnaturalización inicial durante 30 s a 98°C, desnaturalización, alineamiento y extensión en 30 ciclos de 10 s a 98°C; 30 s a 68°C; 45 s a 72°C, respectivamente, y un paso de extensión final de 10 min a 72°C.

[0107] Los fragmentos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en agarosa al 1%. Los fragmentos del tamaño esperado se aislaron usando el kit de purificación y extracción del gel (Qiagen nº de cat. 28706). Los fragmentos de la PCR se clonaron en el vector pDONR201 Gateway[®] Entry, y con él se transformaron células de *E. coli* DH5 α Max Efficiency (Invitrogen nº de cat. 18258012). Se determinó la secuencia de nucleótidos del ADN insertado, y a partir de ella se dedujo la secuencia de ADN genómico del gen de la TrAA (SEQ ID NO:1).

1.2 Transformación de *T. reesei* y fermentación/expresión de TrAA

[0108] El ADN vectorial que contenía el gen de la TrAA se recombinó en el vector de expresión pTrex3g para *T. reesei*, que se describe en detalle en el documento WO 2006/060062. Con el vector de expresión resultante se transformó una cepa huésped de *T. reesei* derivada de RL-P37 que presentaba diversas deleciones génicas (Δ cbh1, Δ cbh2, Δ egl1, Δ egl2, es decir, "cuatro deleciones"; véanse los documentos WO 92/06184 y WO 05/001036), usando bombardeo de partículas con el sistema PDS-1000/Helium (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA; nº de cat. 165-02257). El protocolo se expone más adelante y se hace referencia a los ejemplos 6 y 11 del documento WO 05/001036.

[0109] Se preparó una suspensión de esporas (aproximadamente 5×10^8 esporas/ml) de una cepa de *T. reesei* con cuatro deleciones. Se esparció una suspensión de esporas de 100 a 200 μ l sobre el centro de placas con medio mínimo (MM) con acetamida. El medio MM con acetamida se compone de 0,6 g/l de acetamida; 1,68 g/l de CsCl; 20 g/l de glucosa; 20 g/l de KH₂PO₄; 0,6 g/l de CaCl₂·2H₂O; solución de oligoelementos; 20 g/l de agar Noble; pH 5,5. Una solución concentrada de oligoelementos 1000x contenía 5,0 g/l de FeSO₄·7H₂O; 1,6 g/l de MnSO₄·H₂O; 1,4 g/l de ZnSO₄·7H₂O; y 1,0 g/l de CoCl₂·6H₂O. La suspensión de esporas se dejó secar en la superficie del medio MM con acetamida.

[0110] Para la transformación se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, se colocaron 60 mg de partículas de tungsteno M10 en un tubo de microcentrífuga. Se añadió 1 ml de etanol y la solución se dejó reposar durante 15 s. Las partículas se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15 s. El etanol se eliminó y las partículas se lavaron tres veces con dH₂O estéril antes de añadir 250 μ l de glicerol al 50% (v/v) estéril. Se colocaron 25 μ l de la suspensión de partículas de tungsteno en un tubo de microcentrífuga. Después se añadieron las soluciones siguientes bajo continua agitación en vórtex: 5 μ l (100 a 200 ng/ μ l) de ADN plasmídico, 25 μ l de CaCl₂ 2,5 M y 10 μ l de espermidina 0,1 M. Las partículas se centrifugaron durante 3 s. El sobrenadante se retiró y las partículas se

lavaron con 200 μ l de etanol al 100% y se centrifugaron durante 3 s. Se retiró el sobrenadante, se añadieron 24 μ l de etanol al 100% y se mezclaron mediante una pipeta, después se retiraron alícuotas de partículas de 8 μ l y se colocaron en el centro de discos macroportadores en un desecador. Una vez seca la solución de tungsteno/ADN, los discos macroportadores se colocaron en una cámara de bombardeo junto con la placa de MM de acetamida con esporas y el proceso de bombardeo se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras bombardear las esporas de la placa con las partículas de tungsteno/ADN, las placas se incubaron a 30°C. Las colonias transformadas se transfirieron a placas nuevas con medio MM con acetamida y se incubaron a 30°C.

1.3 Demostración de la actividad α -amilasa de la TrAA expresada

[0111] Tras crecer durante 5 días en placas con medio MM con acetamida, los transformantes que mostraban una morfología estable se inocularon en frascos de agitación de 250 ml que contenían 30 ml de medio Proflo. El medio Proflo contenía 30 g/l de α -lactosa; 6,5 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2 g/l de KH_2PO_4 ; 0,3 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g/l de CaCl_2 ; solución de oligoelementos; 2 ml/l de Tween 80 al 10%; 22,5 g/l de harina de algodón ProFlo (Traders Protein, Memphis, TN); y 0,72 g/l de CaCO_3 . Tras dos días de crecimiento a 28°C con agitación a 140 rpm se transfirió un 10% del cultivo Proflo a un frasco de agitación de 250 ml que contenía 30 ml de medio definido de lactosa. La composición del medio definido de lactosa es 5 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 33 g/l de tampón PIPPS; 9 g/l de casaminoácidos; 4,5 g/l de KH_2SO_4 ; 1,0 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5 ml/l de antiespumante Mazu DF60-P (Mazur Chemicals, IL); solución de oligoelementos; pH 5,5. Después de la esterilización se añadieron al medio 40 ml/l de una solución de lactosa al 40% (p/v). Los frascos de agitación con medio definido de lactosa se incubaron a 28°C, 140 rpm, durante 4 a 5 días.

[0112] Los micelios se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se analizó en cuanto a proteínas totales (kit de ensayo de proteína BCA, Pierce CA; n° de cat. 23225). La actividad α -amilasa se ensayó usando el reactivo Ceralpha (p-nitrofenil maltoheptaósido bloqueado con bencilideno) como sustrato (Megazyme International Ireland, Ltd., Wicklow, Irlanda; n° de cat. K-CERA).

[0113] Se mezclaron muestras del sobrenadante del cultivo con un volumen apropiado de tampón de carga de muestras 2x con agente reductor, y las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) usando el gel Bis-Tris al 10% NUPAGE[®] Novex con tampón de corrida MES SDS. Las proteínas se tiñeron con SimplyBlue[™] SafeStain (Invitrogen, Carlsbad, CA). En la fig. 5, carril 1, se muestra el patrón de tinción de las proteínas de una muestra bruta del sobrenadante del cultivo. Es obvio que las células huésped expresan cantidades relativamente elevadas de una proteína con un peso molecular aparente de aproximadamente 47 kDa, como se determina por comparación con los marcadores del peso molecular en el carril M. Se estima que esta TrAA presenta una pureza de aproximadamente 89%.

1.4 Caracterización bioquímica del producto génico de TrAA

[0114] Los transformantes que expresaban la TrAA se crecieron en un cultivo de 3 l. La célula huésped secretó TrAA al cultivo en una concentración de aproximadamente 15 a 20 g/l. El filtrado del cultivo se concentró usando una unidad de ultrafiltración con un límite para el peso molecular de 10.000 Da (Pall Corp., Omega[™] Membrane, n° de cat. OS010c10). La preparación enzimática bruta se purificó usando un sistema de FPLC ÅKTA explorer 100 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Se equilibró una columna HiPrep 16/10 FF Q-Sepharose (Amersham Biosciences, n° de cat. 17-5190-01) con Tris 25 mM, pH 6,0, y la proteína se eluyó de la columna con NaCl 100 mM, Tris 25 mM, pH 6,0. Se efectuó un segundo paso de cromatografía de afinidad usando la resina Cbind 200 (Novagen n° de cat. 701212-3) y Tris 50 mM, pH 7,0, que contenía NaCl 500 mM como tampón de elución. Después de esta purificación por afinidad, la TrAA se puede concentrar de nuevo por ultrafiltración como se ha descrito anteriormente. La TrAA purificada se analizó mediante SDS-PAGE, y los resultados se muestran en la fig. 5, carril 2. Se estimó que la TrAA presentaba una pureza de aproximadamente 98%.

[0115] Los perfiles de pH y temperatura de la actividad α -amilasa del producto génico se determinaron usando el reactivo Ceralpha (Megazyme International Ireland, Ltd., Wicklow, Irlanda; n° de cat. K-CERA) como sustrato. Como se muestra en la fig. 6A, la TrAA demostró tener un pH óptimo de aproximadamente pH 5 a 6 y, como se muestra en la fig. 6B, la TrAA demostró presentar una temperatura óptima de aproximadamente 42°C en las condiciones de ensayo.

Ejemplo 2

[0116] La TrAA es útil para aumentar el rendimiento de glucosa en una reacción de sacarificación catalizada por una glucoamilasa a pH bajo. La TrAA (lote n° GCI2004017/018-UF) se purificó como se ha descrito en la sección 1.3 del ejemplo 1. La glucoamilasa era de GA-L, lote n° 901-04290-001 (Genencor International, Inc.), que presentaba una actividad de 385 UG/g. El sustrato consistía en un sustrato de almidón licuado preparado de la siguiente manera: Se diluyeron 745 g de almidón de maíz crudo con agua para crear una suspensión del 32% p/p de

ss. Se añadió la α -amilasa bacteriana termoestable Spezyme® Ethyl (Genencor International, Inc.), lote nº 107-04107-001, en una concentración de 0,3 kg/tm de ss y la solución se licuó a 92°C durante 25 min. Se realizó un ensayo de yodo para medir la concentración residual de almidón usando procedimientos conocidos en la técnica.

5 **[0117]** El almidón licuado se enfrió a 60°C y el pH se ajustó a 4,2 con ácido sulfúrico al 20% v/v. Se añadieron TrAA y Optimax® 4060 en las concentraciones indicadas más adelante y la reacción transcurrió durante 30 horas a 60°C. Al final de la reacción se determinaron los DPn producidos en la reacción mediante HPLC después de diluir la muestra 1:40 con agua de calidad HPLC y filtrar las muestras a través de un filtro de 0,45 micrómetros. Para el análisis por HPLC se inyectaron muestras de 20 μ l en una columna Phenomenex Rezex ROA-Organic Acid (H+) y se separaron en un ciclo de 16 min en una fase móvil de agua de calidad HPLC a 60°C. Los productos (DPn) en el eluato se midieron registrando el cambio en el índice de refracción.

10 **[0118]** La tabla 1 muestra los DPn obtenidos en una reacción representativa; la fig. 1 representa la producción de DP1 en función de las concentraciones de enzima usadas en este experimento. Como se puede apreciar, la TrAA produce, en presencia de una glucoamilasa, un jarabe rico en glucosa que presenta una concentración de glucosa mayor que la que produce una glucoamilasa por sí sola.

TABLA 1

GA	TrAA	Tiempo (h)	DP1	DP2	DP3	DP4+
0,6 kg/tm de ss	Nada	30	95,7	1,7	0,2	2,5
0,6 kg/tm de ss	0,06 kg/tm de ss	30	96,7	1,7	0,1	1,5
0,6 kg/tm de ss	0,12 kg/tm de ss	30	96,7	1,8	0,2	1,3
0,6 kg/tm de ss	0,18 kg/tm de ss	30	97,0	1,8	0,2	1,1
0,6 kg/tm de ss	0,3 kg/tm de ss	30	97,2	1,8	0,2	0,8

20

Ejemplo 3

25 **[0119]** Una reacción de sacarificación catalizada por la TrAA y una glucoamilasa alcanza un mayor nivel de glucosa en menos tiempo que una reacción catalizada solo por una glucoamilasa. Se preparó almidón de maíz crudo licuado como se ha descrito en el ejemplo 2 en forma de una suspensión de 32% de ss. El almidón licuado se enfrió a 60°C y el pH se ajustó a 4,2 antes de añadir las enzimas en las concentraciones indicadas en la tabla 2. La TrAA (lote nº GCI12004017/018-UF) se preparó como se ha descrito en la sección 1.3 del ejemplo 1. La glucoamilasa se proporcionó en forma de GA-L (lote nº 901-04290-001) a 385 UG/g. Los DPn se midieron al final de la reacción como se ha indicado en el ejemplo 2 anterior.

30

TABLA 2

GA	TrAA	Tiempo (h)	DP1	DP2	DP3	DP4+
1 kg/tm de ss	Nada	21	93,9	2,5	0,3	3,3
		24	94,6	2,6	0,3	2,4
		29	95,0	2,8	0,3	1,9
		48	95,2	3,8	0,4	0,7
1 kg/tm de ss	0,1 kg/tm de ss	21	94,6	2,5	0,3	2,4
		24	95,1	2,6	0,3	2,0
		29	95,4	2,9	0,3	1,4
		48	95,3	3,7	0,4	0,7
1 kg/tm de ss	0,2 kg/tm de ss	21	95,1	2,5	0,3	2,0
		24	95,3	2,6	0,3	1,7
		29	95,5	2,9	0,4	1,2
		48	95,4	3,7	0,4	0,5
1 kg/tm de ss	0,3 kg/tm de ss	21	95,6	2,5	0,3	1,7
		24	95,7	2,6	0,3	1,4
		29	95,7	2,9	0,3	1,1
		48	95,3	3,6	0,3	0,7
1 kg/tm de ss	0,5 kg/tm de ss	21	95,6	2,6	0,3	1,4
		24	95,9	2,6	0,3	1,2
		29	95,9	2,9	0,3	0,9
		48	95,2	3,8	0,4	0,7
0,5 kg/tm de ss	0,5 kg/tm de ss	21	94,2	2,0	0,4	3,4
		24	94,5	2,5	0,4	3,0
		29	95,3	2,1	0,4	2,3
		48	95,9	2,5	0,3	1,3

[0120] La adición de la TrAA a la reacción de sacarificación provocó un aumento de DP1, es decir, de glucosa, en la reacción. Las condiciones óptimas para la producción de DP1 se obtuvieron a una concentración de glucoamilasa de 1 kg/tm de ss y a una concentración de TrAA de 0,5 kg/tm de ss. En estas condiciones, DP1 ascendió al 95,9% p/p de ss, lo que superaba el nivel máximo de DP1 obtenido sin TrAA (95,2% p/p de ss). El nivel máximo de DP1 se alcanzó a las 24 horas en presencia de TrAA, pero se alcanzó solo después de 48 horas con glucoamilasa sola. En presencia de 0,5 kg/tm de ss y TrAA, la reversión de DP1 a oligosacáridos superiores no comenzó hasta 48 horas después de iniciarse la reacción.

Ejemplo 4

[0121] La TrAA también es útil para aumentar el rendimiento de maltosa en una reacción de sacarificación. La TrAA muestra actividad maltogénica a un pH relativamente bajo, como se determina en el experimento siguiente. El sustrato consistió en un sustrato de almidón licuado preparado como se ha descrito en el ejemplo 2, excepto que el maíz crudo se diluyó con agua para crear una suspensión del 30% p/p de ss, a la que se añadieron 0,25 kg/tm ss de Spezyme[®] Ethyl (Genencor International, Inc., lote n° 107-04107-001). Después de la licuefacción a 92°C durante 25 min, el almidón licuado se enfrió a 55°C y el pH se ajustó usando ácido sulfúrico al 20% v/v. Los DPn se midieron como se ha descrito en el ejemplo 2 anterior. La fig. 2 representa la dependencia de pH de la producción de DP2 después de una reacción de 24 horas catalizada por 0,5 kg/tm ss de TrAA (lote n° GCI12004017/018-UF). Como se muestra en la fig. 2, la TrAA mostró una actividad óptima entre pH 5,0 y 5,5; sin embargo, la TrAA también mostró una actividad casi óptima en el intervalo de pH de 4,5 a 6,0. Este experimento indica que la TrAA es altamente activa al pH relativamente bajo de 4,5.

Ejemplo 5

[0122] La TrAA puede catalizar la producción de DP2 proporcionando niveles comparables a los obtenidos con la α -amilasa maltogénica fúngica Clarase[®] L (Genencor International, Inc.). La TrAA se produjo en *T. reesei* y se purificó de acuerdo con los procedimientos descritos en el ejemplo 1 anterior. La TrAA (lote n° 150906) usada para este experimento demostró una actividad específica de aproximadamente 18.000 SKBU/g. La TrAA también se ensayó en combinación con una pululanasa en forma de Optimax[®] L-1000 (Genencor International, Inc., lote n° 107-04224-001), que presentaba una actividad específica de aproximadamente 1.040 unidades PU/g. La actividad específica de Clarase[®] L (lote n° 107-04330-001) en este experimento ascendió a aproximadamente 41.000 SKBU/g.

[0123] Se preparó almidón licuado como se ha descrito en el ejemplo 2 y se ajustó a 55°C, pH 5,5, o 60°C, pH 4,5. Las enzimas se añadieron en las concentraciones indicadas más adelante y la reacción transcurrió durante 48 horas a la temperatura indicada. Los DPn producidos durante la reacción se midieron 24 horas y 48 horas después de iniciarse la reacción, usando los procedimientos descritos en el ejemplo 2. La tabla 3 muestra los DPn obtenidos en una reacción representativa. La fig. 3 representa la concentración de DP2 obtenida en la reacción de sacarificación a las 48 horas en función de la concentración de enzima en unidades SKBU/g.

TABLA 3

Enzima 1 (dosis)	Enzima 2 (dosis)	T (°C)	pH	Tiempo (h)	% DP1	% DP2	% DP3	% AS
Clarase [®] L (10 SKBU/g)	NA	55	5,5	24	3,0	53,9	21,3	21,7
				48	4,4	58,2	17,1	20,3
TrAA (10 SKBU/g)	NA	60	4,5	24	4,5	37,8	23,7	34,0
				48	6,4	46,2	21,7	25,7
TrAA (15 SKBU/g)	NA	60	4,5	24	6,7	47,4	21,3	24,6
				48	8,9	52,8	17,3	21,1
TrAA (20 SKBU/g)	NA	60	4,5	24	8,7	52,6	17,6	21,1
				48	10,5	55,1	14,5	19,9
TrAA (20 SKBU/g)	PU (0,25 kg/tm)	60	4,5	24	8,9	54,5	19,4	17,2
				48	11,3	58,9	16,5	13,4

[0124] A las 48 horas, la concentración de DP2 había aumentado a aproximadamente 58% p/p ss en presencia de 10 SKBU/g de Clarase[®] L a 55°C, pH 5,5. En comparación, las reacciones catalizadas por 20 SKBU/g de TrAA a 60°C, pH 4,5, produjeron aproximadamente 55% de DP2 en 48 horas. En presencia de 20 SKBU/g de TrAA y 0,25 kg/tm de pululanasa, sin embargo, DP2 subió a aproximadamente 59% p/p ss en 48 horas, excediendo la concentración obtenida con Clarase[®] L. Además, la TrAA produjo, sola o en combinación con una pululanasa, un jarabe rico en maltosa con una concentración mayor de DP1 que la obtenida con Clarase[®] L: aproximadamente 11% p/p ss frente a aproximadamente 4% p/p ss. Este experimento muestra, por consiguiente, que la TrAA se puede usar para producir un jarabe con alto contenido en maltosa a un pH bajo, conteniendo el jarabe niveles de maltosa comparables así como niveles de glucosa mayores que los obtenidos con Clarase[®] L.

Ejemplo 6

[0125] Cuando se usa a pH bajo, la TrAA supera significativamente a otras amilasas maltogénicas convencionales, como se muestra en el experimento siguiente. Las condiciones experimentales usadas fueron las mismas que en el ejemplo 5, excepto por que la reacción se realizó a 58°C, pH 4,6, y la producción de DPn fue catalizada por 0,2 kg/tm ss de BBA (una β -amilasa; lote n° 05189-001), 0,2 kg/tm ss de Clarase® L (lote n° 9016231002) o 0,5 kg/tm ss de TrAA (lote n° GCI2004017/018-UF). Como se indica en la tabla 4, se obtuvieron concentraciones significativamente mayores de DP2 en presencia de TrAA que con BBA o Clarase® L.

TABLA 4

Enzima (dosis)	T (°C)	pH	Tiempo (h)	% DP1	% DP2	% DP3	% AS	ED
BBA (0,2 kg/tm ss)	58	4,6	24	0,6	12,5	3,2	83,6	25
			48	0,3	12,2	3,1	84,4	24
Clarase® L (0,2 kg/tm ss)	58	4,6	24	0,6	9,9	17,9	71,6	28
			48	10,0	18,0	14,2	71,3	28
TrAA (0,5 kg/tm ss)	58	4,6	24	6,0	44,4	20,8	28,7	46
			48	8,1	51,2	17,8	22,9	49

Ejemplo 7

[0126] La producción de DP2 por medio de la TrAA aumentó significativamente con la adición de una pululanasa. En el experimento siguiente, las condiciones experimentales fueron las mismas que las descritas en el ejemplo 5, excepto por que la reacción se realizó a 58°C, pH 4,6. La pululanasa se añadió en forma de Optimax® L-1000 (Genencor International, Inc.; lote n° 9016167004 a 1.165 UP/g) en las concentraciones indicadas en la tabla 5. La reacción transcurrió a 58°C, pH 4,6, durante los tiempos indicados. Como se muestra en la tabla 5, 0,1 a 0,25 kg/tm ss de pululanasa aumentaron significativamente la producción de DP2 catalizada por TrAA en 48 horas. La fig. 4 representa la formación de DP2 a las 48 horas en las diferentes condiciones descritas en este ejemplo.

TABLA 5

TrAA	PU	T (°C)	pH	Tiempo (h)	% DP1	% DP2	% DP3	% AS	ED
0,5 kg/tm ss	Nada	58	4,6	24	7,2	44,8	20,1	27,9	47
				48	9,2	51,6	16,8	22,3	50
0,5 kg/tm ss	0,1 kg/tm ss	58	4,6	24	6,7	44,9	21,5	26,9	47
				48	10,4	61,8	22,4	5,3	57
0,5 kg/tm ss	0,25 kg/tm ss	58	4,6	24	7,8	49,4	23,6	19,2	50
				48	10,8	61,7	22,0	5,5	57
0,5 kg/tm ss	0,5 kg/tm ss	58	4,6	24	7,5	50,3	25,0	17,2	51
				48	10,3	60,9	22,9	5,9	56

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la sacarificación de almidón licuado para producir un jarabe rico en maltosa, que comprende:
añadir a una solución de almidón licuado un polipéptido que comprende:
- 5 (i) los restos 21 a 463 de la SEQ ID NO:3 mostrada en la fig. 7B; o
(ii) una variante de la α -amilasa de *Trichoderma reesei* (TrAA), presentando la variante actividad α -amilasa y una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos 90% con los restos 21 a 463 de la SEQ ID NO:3 mostrada en la fig. 7B;
- 10 y sacarificar la solución de almidón licuado para producir un jarabe rico en maltosa.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicha variante presenta una identidad de secuencia de al menos 95% con los restos 21 a 463 de la SEQ ID NO:3 mostrada en la fig. 7B.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la variante presenta entre 1 y 10 sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos en comparación con los restos 21 a 463 de la SEQ ID NO:3 mostrada en la fig. 7B.
- 15 4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polipéptido comprende la secuencia de SEQ ID NO:3 mostrada en la fig. 7B.
- 20 5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho polipéptido se añade a la solución de almidón licuado en una cantidad de aproximadamente 0,3 a 1 kg por tonelada métrica de sólidos secos.
- 25 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la solución de almidón licuado es una suspensión de almidón licuado de aproximadamente 20 a 35% p/p de sólidos secos.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la solución de almidón licuado se sacarifica entre aproximadamente 50°C y aproximadamente 60°C.
- 30 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la solución de almidón licuado se sacarifica entre aproximadamente 55°C y aproximadamente 60°C.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la solución de almidón licuado se sacarifica entre aproximadamente pH 4,0 y aproximadamente pH 6,0.
- 35 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la solución de almidón licuado se sacarifica entre aproximadamente pH 4,2 y aproximadamente pH 4,8.
- 40 11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende adicionalmente un paso de adición de una pululanasa, una β -amilasa, una α -amilasa fúngica distinta de una TrAA, una proteasa, una celulasa, una hemicelulasa, una lipasa, una cutinasa, una isoamilasa o una combinación de las mismas a la solución de almidón licuado.
- 45 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la concentración final de maltosa alcanza un porcentaje en peso de sólidos secos de aproximadamente 50% a aproximadamente 62%.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la concentración final de maltosa alcanza un porcentaje en peso de sólidos secos de aproximadamente 60% a aproximadamente 62%.

FIG. 1

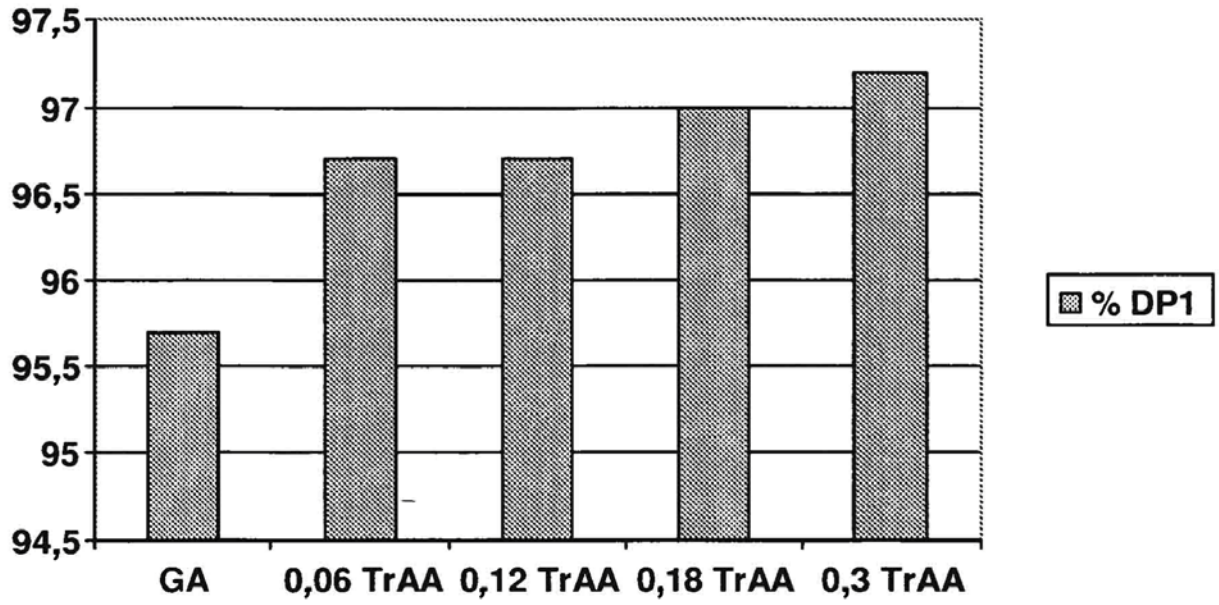


FIG. 2

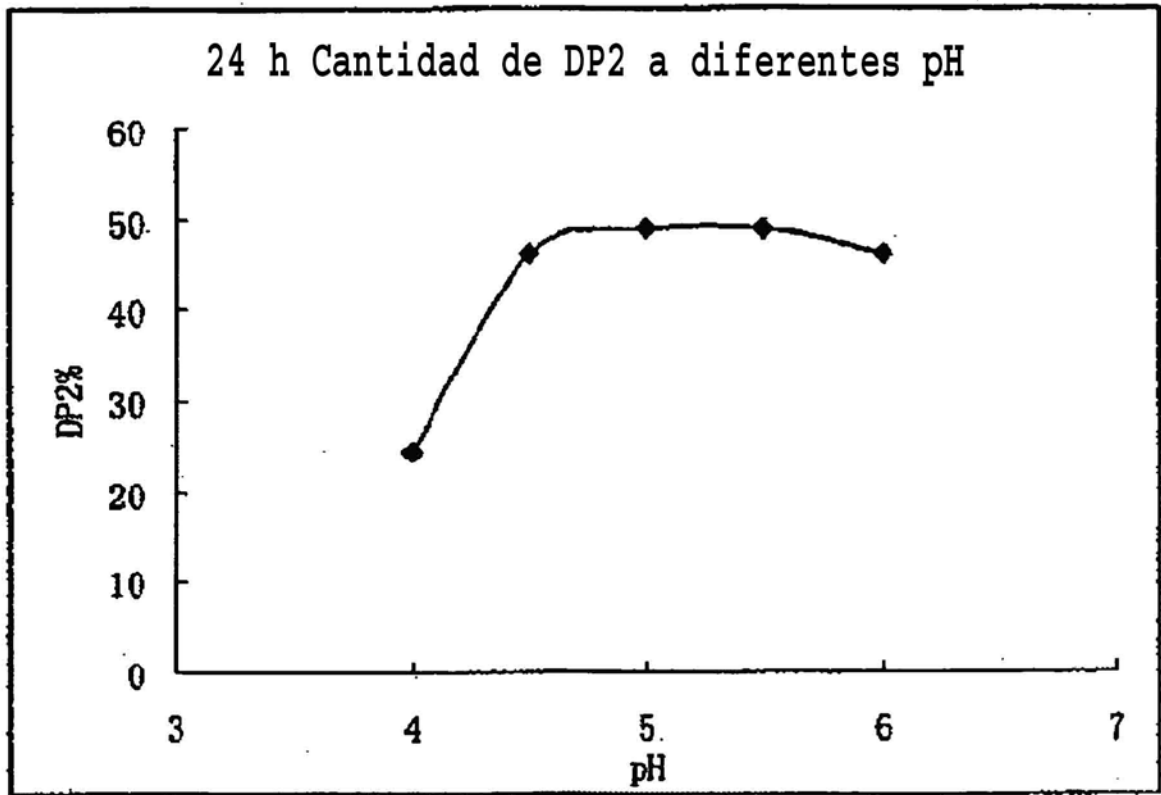


FIG. 3

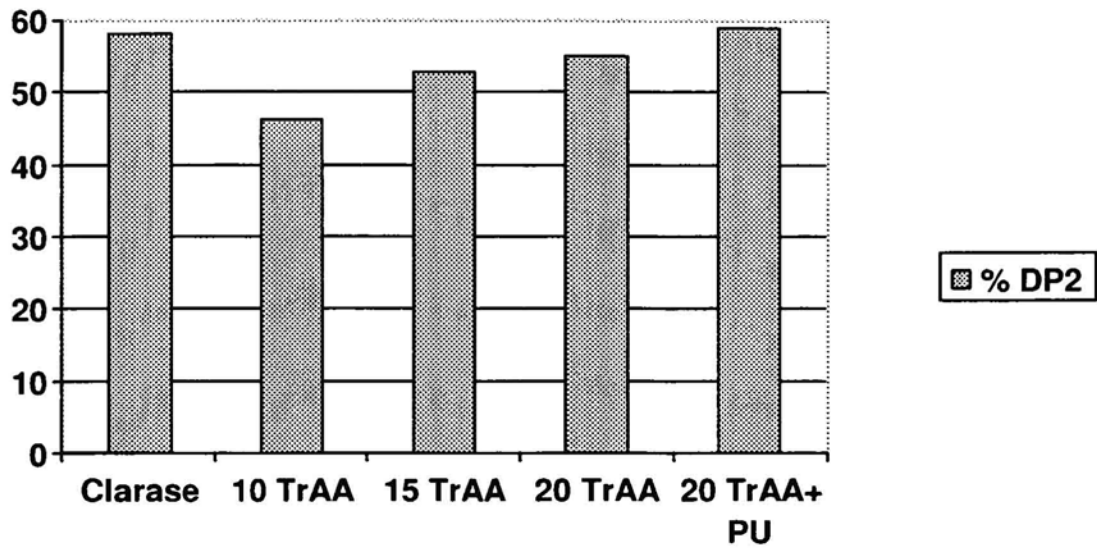


FIG. 4

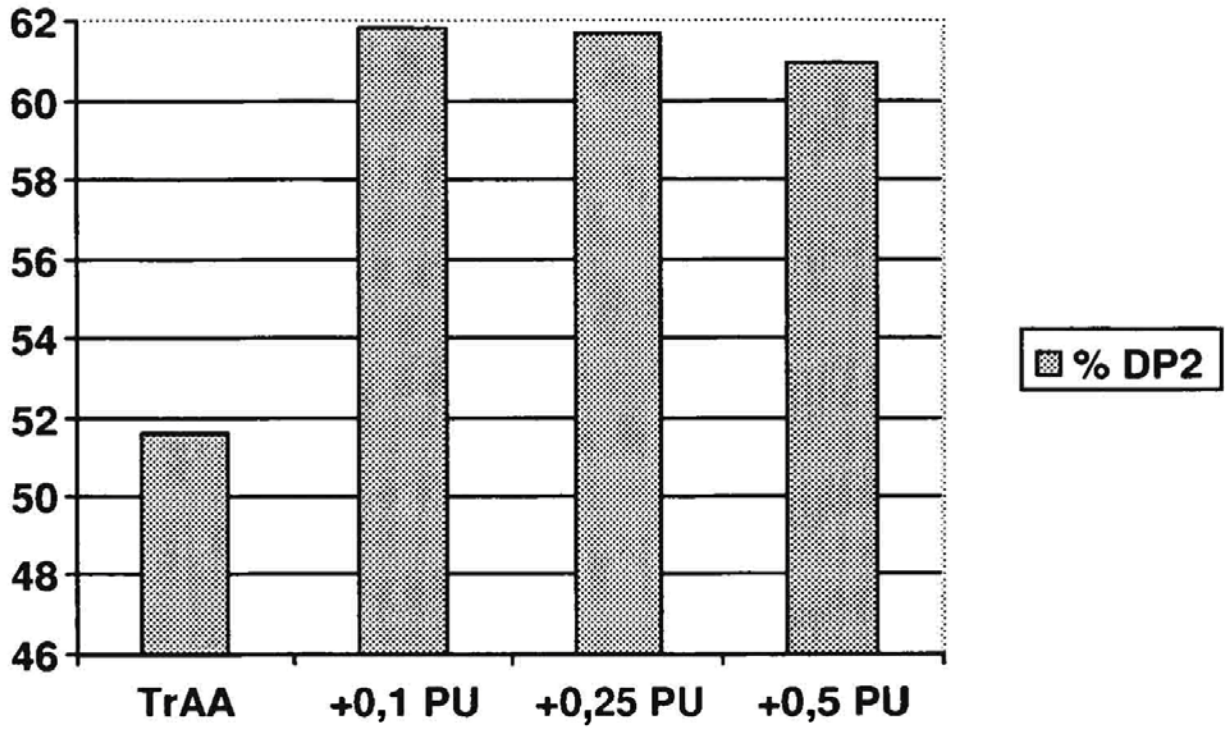


FIG. 5

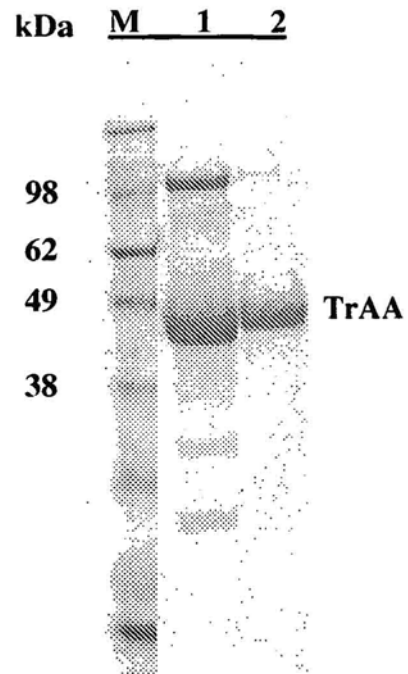


FIG. 6A

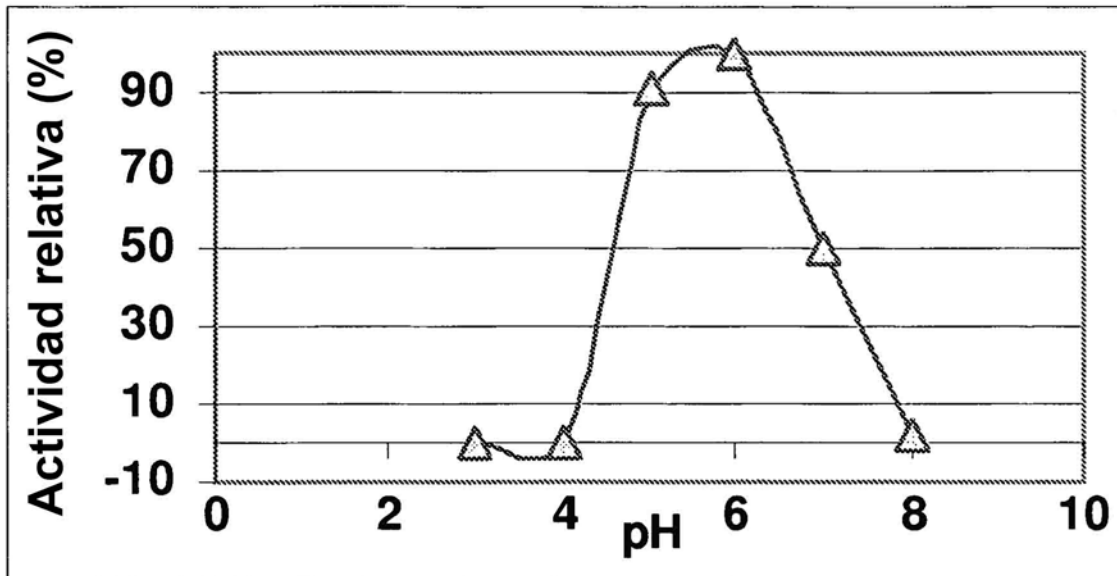


FIG. 6B

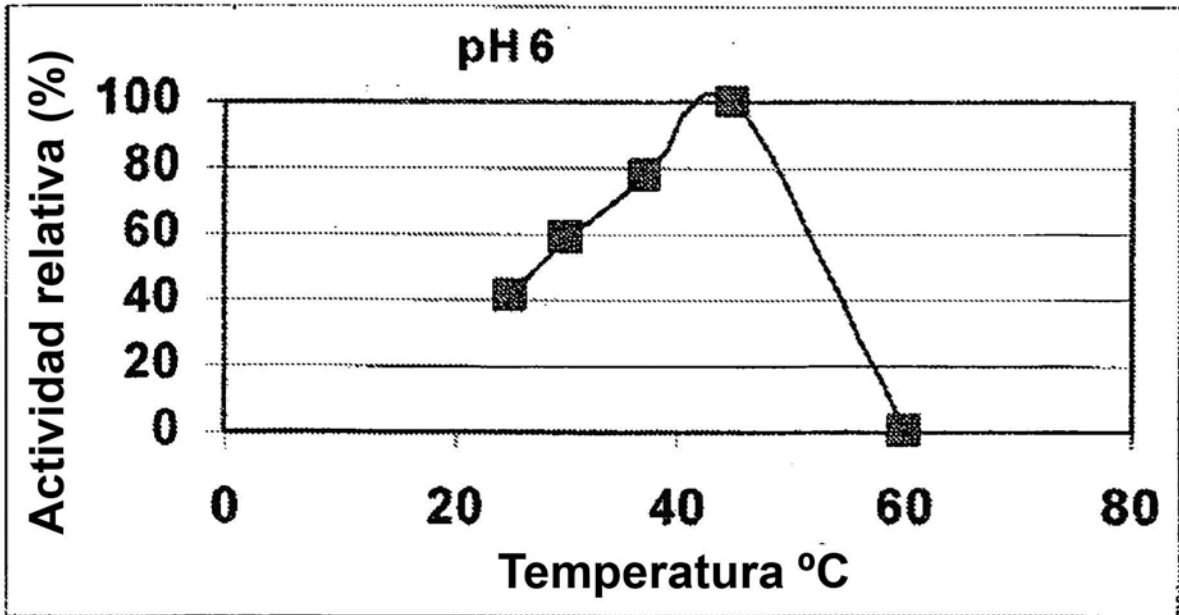


FIG. 7A

SEQ ID NO:1 α -amilasa de *Trichoderma reesei* - ADN genómico (1.548 nucleótidos)

```

1 atgaagctcc ggtacgctct cccgctgctc ttgcagctct ctttgccggt cctctccgca
61 gacaccgccg cctggaggte ccgcaccatc tactttgccc tgacagaccg catcgctcgt
121 ggaagcgggtg acacgggggg cagtgcgtgt gggaaacctg gggactactg cgggtggcacg
181 ttccagggct tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg
241 atcacacctg ttgtgacgag tgagtctttt cataccttgc cctgccttgc ctcgctcgc
301 cttgcatgtg tgcatacag gcttctggta tgcatagcta aacctgatac ctctggacag
361 acagtgatgg gggctaccat ggctattggg cggaggacat cgactccatc aactctcatt
421 atggctctgc ggacgatctc aagagtctcg tcaacgccgc gcatagcaag gtattccctt
481 ttgttcacac cagacttcat gattatcaaa ataacacaa accagggtct ctatatgatg
541 gtggacgtcg tggccaacca catgggctac gccaatatct ctgacgatag tccctctcca
601 ctgaaccagg cctcgctcga tcaccccgag tgtgatatcg actacaacaa ccaaaccagc
661 gtcgagaact gctggatcag cggcctccc gatctcaaca cgcagagctc aacctccgc
721 agcctctacc aggactgggt ctccaacctc gtgtccactg acggcttca cggcgtccgc
781 atcgacaccg tcaagcacgt cgagcaagac tactggcccg gcttcgtcaa cgccaccggc
841 gtctactgca tcggcgaggt ctttgacgga gacccaaact acctgctgcc ctacgccagc
901 ctcatgccgg gcctgctcaa ctacgccatc tactacccca tgacgcgctt cttctccag
961 cagggctcct cgcaggacat ggtcaacatg cagcaccaga tcggcagatc gttccccgac
1021 ccgaccgcgc tcggcacctt tgtcgacaac cagcacaacc cgcgcttctt gagcatcaag
1081 aacgacacgg ccctgctcaa gaacgcgctg acgtacacca tcctctcgcg cggcatccc
1141 atcgtctact acggcaccga gcaggccttc tcggcgggca acgaccggc caacagggag
1201 gacctctggc gcagcggtt caacgcccag tccgacatgt acgacgccat ctccaagctc
1261 acctacgcca agcacgccgt cggcggctc gccgacaacg accacaagca cctgtactctc
1321 gccgacacgg cctacgcctt cagccgcgcc ggcggcaaca tgggtggcctt gaccaccaac
1381 agcggcagcg ggagctcggc ccagcactgc ttcggcacgc aggtgccaa cggccgctgg
1441 cagaatgtct ttgacgaggg caatggggcg acgtattccg ccgacggcaa cggccagctt
1501 tgcttgaatg tgtccaacgg tcagcccatt gtcttgctgt cttctgta

```

SEQ ID NO:2 α -amilasa de *Trichoderma reesei* - secuencia codificante (1.392 nucleótidos)

```

1 atgaagctcc ggtacgctct cccgctgctc ttgcagctct ctttgccggt cctctccgca
61 gacaccgccg cctggaggte ccgcaccatc tactttgccc tgacagaccg catcgctcgt
121 ggaagcgggtg acacgggggg cagtgcgtgt gggaaacctg gggactactg cgggtggcacg
181 ttccagggct tggagagcaa gttggactac atcaagggca tgggattcga tgccatctgg
241 atcacacctg ttgtgacgag tgatgatggg ggctaccatg gctattgggc ggaggacatc
301 gactccatca actctcatta tggctctgcg gacgatctca agagtctcgt caacgccgcg
361 catagcaagg gcttctatat gatggtggac gtcgtggcca accacatggg ctacgccaat
421 atctctgacg atagtcctc tccactgaac caggcctcgt cgtatcacc cgagtgtgat
481 atcgactaca acaaccaaac cagcgtcgag aactgctgga tcagcggcct cccggatctc
541 aacacgcaga gctcaacat ccgcagcctc taccaggact gggctccaa cctcgtgtcc
601 acgtacggct tcgacggcgt ccgcacgac accgtcaagc acgtcgagca agactactgg
661 cccggcttgc tcaacgccac cggcgtctac tgcacggcg aggtcttga cggagacca
721 aactacctgc tgccctacgc cagcctcatg ccgggctgc tcaactacgc catctactac
781 cccatgacgc gcttcttctt ccagcagggc tcctcgcagg acatggtcaa catgacgac
841 cagatcggca gcatgttccc cgacccgacc gcgctcggca cctttgtcga caaccacgac
901 aacccgcgct tcctgagcat caagaacgac acggcctgc tcaagaacgc gctgacgtac
961 accatcctct cgcgcggcat ccccatcgtc tactacggca ccgagcaggc cttctcgggc
1021 ggcaacgacc cggccaacag ggaggacctc tggcgcagcg gcttcaacgc ccagtccgac
1081 atgtacgacg ccactctcaa gctcacctac gccaaagcag ccgtcggcgg cctcggcagc
1141 aacgaccaca agcacctgta cgtcgccgac acggcctacg ccttcagccg cgccggcggc
1201 aacatggtgg ccctgaccac caacagcggc agcgggagct cggcccagca ctgcttcggc
1261 acgcaggtgc ccaacggccg ctggcagaat gtctttgacg agggcaatgg gccgacgtat
1321 tccgcccagc gcaacggcca gctttgcttg aatgtgtcca acggtcagcc cattgtcttg
1381 ctgtcttcgt ga

```

FIG. 7B

SEQ ID NO:3 α -amilasa de *Trichoderma reesei* - secuencia de aminoácidos (463 aminoácidos)

1 MKLRYALPLL LQLSLPVLSA DTAAWRSRTI YFALTDRIAR GSGDTGGSAC GNLGDYCGGT
 61 FQGLSKLDY IKGMGFDAIW ITPVVTSDDG GYHGYWAEDI DSINSHYGSA DDLKSLVNAA
 121 HSKGFYMMVD VVANHMGYAN ISDDSPSPLN QASSYHPECD IDYNNQTSVE NCWISGLPDL
 181 NTQSSTIRSL YQDWVSNLVS TYGFDGVRID TVKHVEQDYW PGFVNATGVY CIGEVFDGDP
 241 NYLLPYASLM PGLLNyaiyy PMTRFFLQOG SSQDMVNMHD QIGSMFPDPT ALGTFVDNHD
 301 NPRFLSIKND TALLKNALTY TILSRGIPIV YYGTEQAFSG GNDPANREDL WRSGFNAQSD
 361 MYDAISKLTy AKHAVGGLAD NDHKHLYVAD TAYAFSRAGG NMVALTTNSG SGSSAQHCFG
 421 TQVPNGRWQN VFDEGNGPTY SADGNGQLCL NVSNGQPIVL LSS

SEQ ID NO:4 α -amilasa de *Trichoderma reesei* - secuencia señal (60 nucleótidos)

1 atgaagctcc ggtacgctct cccgctgctc ttgcagctct ctttgccggt cctctccgca

SEQ ID NO:5 α -amilasa de *Trichoderma reesei* - secuencia líder (20 aminoácidos)

1 MKLRYALPLL LQLSLPVLSA

SEQ ID NO:6 cebador directo NSP331 (22 nucleótidos)

1 atgaagctcc ggtacgctct cc

SEQ ID NO:7 cebador inverso NSP332 (25 nucleótidos)

1 tcacgaagac agcaagacaa tgggc