

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 526 867**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/31** (2006.01)

**C12N 15/63** (2006.01)

**C12N 15/56** (2006.01)

**C12N 9/24** (2006.01)

**C12N 15/67** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2009 E 09748920 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.10.2014 EP 2358878**

54 Título: **Polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica y polinucleótidos que codifican el mismo**

30 Prioridad:

**20.11.2008 US 116605 P**

**08.12.2008 US 120617 P**

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

**16.01.2015**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES INC. (100.0%)**

**1445 Drew Avenue**

**Davis, CA 95616, US**

72 Inventor/es:

**HARRIS, PAUL y**

**WOGULIS, MARK**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 526 867 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**

Polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica y polinucleótidos que codifican el mismo

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 [0001] La presente invención se refiere a procesos para degradar materiales que contienen almidón utilizando una composición enzimática que comprenden enzimas amilolíticas y polipéptidos que tienen actividad potenciadora amilolítica. La invención también se refiere a procesos para producir productos sacarificados a partir de un material que contiene almidón utilizando una composición enzimática que comprende enzimas amilolíticas y un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica. Por último, la invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación utilizando una composición enzimática que comprende enzimas amilolíticas y un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica.

Descripción de las técnicas relacionadas

20 [0002] El almidón es un carbohidrato complejo compuesto por dos componentes principales: amilopectina y amilosa. La amilosa es una molécula de cadena lineal mientras que la amilopectina es una molécula ramificada. La amilosa está compuesta por moléculas de D-glucosa que están enlazadas por enlaces alfa-1,4-glicosídicos. La amilopectina está compuesta por moléculas de D-glucosa que están enlazadas por enlaces alfa-1,4-glicosídicos al igual que moléculas de D-glucosa enlazadas por enlaces alfa-1,6-glicosídicos. Los enlaces alfa-1,6-glicosídicos generan ramificación. La proporción de amilosa a amilopectina varía entre las fuentes de almidón.

25 [0003] El almidón se puede hidrolizar en carbohidratos más simples por ácidos, varias enzimas o una combinación de los mismos. El grado de conversión se cuantifica típicamente por equivalencia de dextrosa (DE), que se refiere a la fracción de los enlaces glucósidos en el almidón que han sido escindidos. Las enzimas primarias usadas para hidrolizar el almidón en carbohidratos más simples son endoamilasas, exoamilasas y enzimas desramificantes, que hidrolizan la amilosa y la amilopectina. La amilosa es hidrolizada principalmente por amilasas, mientras que la amilopectina también requiere enzimas desramificantes tales como pululanasa (E.C. 3.2.1.41) para la hidrólisis completa. Las endoamilasas, la más común es la alfa-amilasa (E.C. 3,2,1,1), son específicas para los alfa-1,4- enlaces de amilosa y amilopectina. Las exoamilasas tienen la capacidad de hidrolizar tanto alfa-1,4-enlaces como alfa-1,6-enlaces de amilosa y amilopectina. Un ejemplo común es la amiloglucosidasa (E.C. 3.2.1.20). La beta-amilasa es una enzima que tiene la capacidad de hidrolizar los alfa-1,4-enlaces de amilosa. Las enzimas desramificantes, por ejemplo pululanasa, hidrolizan alfa-1,6-enlaces en la amilopectina. Productos de hidrólisis de enzimas desramificantes son principalmente maltotriosa y maltosa.

40 [0004] Hay muchos productos alimenticios que se producen a partir de almidón, incluyendo, por ejemplo, maltodextrina, un producto de almidón ligeramente hidrolizado (DE 10-20) usado como espesante y relleno de sabor insípido, varios jarabes de maíz (DE 30-70), soluciones viscosas usadas como edulcorantes y espesantes en muchos tipos de alimentos procesados, dextrosa (DE 100), glucosa comercial, preparada por la hidrólisis completa del almidón, y jarabe rico en fructosa, hecho mediante el tratamiento de soluciones de dextrosa con la enzima glucosa (xilosa) isomerasa, hasta que una fracción sustancial de la glucosa se convierte en fructosa.

45 [0005] Sería ventajoso en la técnica mejorar la conversión enzimática de materiales que contienen almidón.

[0006] La presente invención proporciona tales procesos.

50 Resumen de la invención

[0007] La presente invención se refiere a procesos para degradar un material que contiene almidón, que comprende: el tratamiento del material que contiene almidón con una composición enzimática que comprende una o más enzimas amilolíticas (diferentes) en presencia de un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica seleccionado de:

55 (i) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID n°: 4;

60 (ii) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 3.

[0008] La presente invención también se refiere a procesos para producir un producto sacarificado a partir de un material que contiene almidón, incluyendo:

65 (a) licuefacción del material que contiene almidón con una alfa-amilasa; y

(b) sacarificación del material que contiene almidón licuado con una composición enzimática que comprende una o más enzimas amilolíticas (diferentes);

5 donde el paso (a), el paso (b) o los pasos (a) y (b) se realizan en presencia de un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica seleccionado del grupo que consiste en:

(i) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID nº: 4;

10 (ii) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 3.

[0009] Además, la presente invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación, que comprende:

15 (a) sacarificación de un material que contiene almidón con una composición enzimática que comprende una o más enzimas amilolíticas (diferentes) en presencia de un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica seleccionado de:

20 (i) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID nº: 4;

(ii) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 3; y

25 (b) fermentación del material que contiene almidón sacarificado con uno o más microorganismos de fermentación (diferentes) para producir un producto de fermentación.

[0010] Por último, la presente invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación a partir de un material que contiene almidón, que comprende:

30 (a) licuefacción del material que contiene almidón con una alfa-amilasa;

35 (b) sacarificación del material que contiene almidón licuado con una composición enzimática que comprende uno o más (diferentes) enzimas amilolíticas; y

(c) fermentación del material que contiene almidón sacarificado en presencia de uno o varios (diferentes) organismos fermentantes para producir el producto de fermentación;

40 donde el paso (a), el paso (b) o los pasos (a) y (b) se realizan en presencia del polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica seleccionado de:

(i) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID nº: 4;

45 (ii) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 3.

Breve descripción de las figuras

50 [0011]

La figura 1 muestra un mapa de restricción de pPH48.

55 La figura 2 muestra la secuencia de ADN genómico y la secuencia de aminoácidos deducida de un polipéptido de *Neurospora crassa* FGSC 2489 que tiene actividad potenciadora amilolítica (SEC ID nº: 1 y 2, respectivamente).

La figura 3 muestra un mapa de restricción de pPH49.

60 La figura 4 muestra la secuencia de ADN genómico y la secuencia de aminoácidos deducida de un polipéptido de *Aspergillus nidulans* FGSC A1000 que tiene actividad potenciadora amilolítica (SEC ID nº: 3 y 4, respectivamente).

La figura 5 muestra un mapa de restricción de pHUda666.  $\alpha$

65 La figura 6 muestra el efecto del polipéptido de *Neurospora crassa* que tiene actividad potenciadora amilolítica en la hidrólisis de la amilopectina por la amiloglucosidasa de *Trametes cingulata*, la alfa-amilasa ácida de *Aspergillus niger* y

una combinación de la amiloglucosidasa de *T. cingulata* y la alfa-amilasa ácida de *A. niger* a pH 4,0 y temperatura ambiente.

5 La figura 7 muestra el efecto de los polipéptidos de *Aspergillus nidulans* y de *Neurospora crassa* que tienen actividad potenciadora amilolítica en la hidrólisis de la amilosa por alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* a pH 6,0 y temperatura ambiente.

10 La figura 8 muestra el efecto del polipéptido de *Neurospora crassa* que tiene actividad potenciadora amilolítica en la hidrólisis de la amilosa por alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* a pH 4,0 y bien temperatura ambiente, 40°C o 50°C.

La figura 9 muestra el efecto de los polipéptidos de *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans* que tienen actividad potenciadora amilolítica en la hidrólisis de la amilopectina por amiloglucosidasa de *Trametes cingulata* y la amiloglucosidasa de *Talaromyces emersonii* a pH 5,0 y temperatura ambiente.

15 La figura 10 muestra el efecto del polipéptido de *Neurospora crassa* que tiene actividad potenciadora amilolítica en la hidrólisis del almidón de maíz por la amiloglucosidasa de *Trametes cingulata* a pH 5,0 y temperatura ambiente.

La figura 11 muestra un mapa de restricción de pMStr80.

20 La figura 12 muestra la secuencia de ADNc y la secuencia de aminoácidos deducida de un polipéptido de *Aspergillus oryzae* IFO 4177 que tiene actividad potenciadora amilolítica (SEC ID n°: 5 y 6, respectivamente).

La figura 13 muestra el efecto del polipéptido de *Aspergillus oryzae* que tiene actividad potenciadora amilolítica en la hidrólisis del almidón de maíz por la amiloglucosidasa de *Trametes cingulata* a pH 5,0 y temperatura ambiente.

25 Definiciones

[0012] Actividad potenciadora amilolítica: el término "actividad potenciadora amilolítica" se define aquí como una actividad biológica que mejora la hidrólisis de un almidón por las proteínas que tienen actividad amilolítica. Para fines de la presente invención, la actividad potenciadora amilolítica se determina midiendo el aumento en azúcares reductores a partir de la hidrólisis de un almidón por una enzima amilolítica bajo condiciones de pH y temperatura que son preferiblemente óptimas para la enzima amilolítica.

35 [0013] Los polipéptidos usados en procesos de la presente invención tienen al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, y de la forma más preferible al menos 100% de la actividad potenciadora amilolítica del polipéptido maduro de SEC ID n°: 4.

40 [0014] Los polipéptidos que tienen actividad potenciadora amilolítica mejoran la hidrólisis de un material que contiene almidón catalizado por proteínas que tienen actividad amilolítica reduciendo la cantidad de la enzima amilolítica requerida para alcanzar el mismo grado de hidrólisis preferiblemente al menos 1,01 veces, más preferiblemente al menos 1,05 veces, más preferiblemente al menos 1,10 veces, más preferiblemente al menos 1,25 veces, más preferiblemente al menos 1,5 veces, más preferiblemente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 4 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, incluso más preferiblemente al menos 10 veces, y de la forma más preferible al menos 20 veces.

45 [0015] Material que contiene almidón: el término "material que contiene almidón" se define aquí como cualquier material que comprenda almidón, que es un carbohidrato polisacárido  $(C_6H_{10}O_5)_n$  que consiste en un gran número de unidades monosacáridas de glucosa unidas por enlaces alfa-1,4-glicosídicos o enlaces alfa-1,4-glicosídicos y enlaces alfa-1,6-glicosídicos. El almidón se encuentra especialmente en semillas, bulbos y tubérculos. En los procesos de la presente invención, el material que contiene almidón puede ser cualquier material que contenga almidón. El almidón se obtiene generalmente a partir de las semillas de plantas, tales como maíz, trigo, sorgo o arroz; y de los tubérculos y raíces de plantas tales como mandioca, patata, arrurruz, tapioca y la médula de sagú. Ejemplos de materias primas que contienen almidón adecuadas para su uso en un proceso de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, tubérculos, raíces, tallos, granos enteros, granos, mazorcas, trigo, cebada, centeno, milo, sagú, mandioca, tapioca, 50 sorgo, guisantes del arroz, alubias o batatas o sus mezclas derivadas, o cereales, materias primas que contienen azúcar, tales como melaza, materiales de la fruta, caña de azúcar o remolacha azucarera, patatas, y materiales que contienen celulosa, tales como residuos de la madera o vegetales o sus mezclas derivadas. Se contemplan tanto los tipos cerosos como los no cerosos de maíz y cebada. La principal fuente comercial de almidón es el maíz, del que se extrae el almidón mediante procesos de molienda en húmedo. El material que contiene almidón también puede ser 60 lignocelulosa que contiene almidón.

[0016] En un aspecto, el material que contiene almidón es almidón de maíz. En otro aspecto, el material que contiene almidón es almidón de trigo. En otro aspecto, el material que contiene almidón es almidón de sorgo. En otro aspecto, el material que contiene almidón es almidón de arroz. En otro aspecto, el material de almidón es almidón de mandioca. En otro aspecto, el material que contiene almidón es almidón de patata. En otro aspecto, el material que contiene almidón

es almidón de arrurruz. En otro aspecto, el material que contiene almidón es almidón de tapioca. En otro aspecto, el material que contiene almidón es almidón de sagú.

5 [0017] El término "almidón granular" se refiere al almidón crudo no cocinado, es decir, almidón según se encuentra en su forma natural en el cereal, los tubérculos o los granos. El almidón se forma dentro de las células vegetales como gránulos ínfimos insolubles en el agua. Cuando se ponen en agua fría, los gránulos de almidón pueden absorber una pequeña cantidad del líquido e hincharse. A temperaturas de hasta 50°C a 75°C, la hinchazón pueden ser reversibles. No obstante, con temperaturas más altas comienza una hinchazón irreversible llamada "gelatinización". El almidón  
10 granulado puede ser un almidón altamente refinado, preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 97%, y de la forma más preferible al menos 99,5% puro, o puede ser un almidón más crudo que contenga material que incluya grano entero molido con fracciones no amiláceas tales como residuos de germen y fibras. La materia prima, tal como el grano entero, se muele para abrir la estructura para más tratamiento. Dos procesos de molienda se prefieren: molienda en seco y en húmedo. En la molienda en seco los granos enteros se muelen y se usan. La molienda en húmedo da una buena separación de germen y la harina (gránulos de almidón y proteína) y frecuentemente se aplica en lugares en los que el hidrolizado de almidón se usa para la producción de jarabes. Tanto la molienda en húmedo como en seco son bien conocidas en la técnica de tratamiento del almidón.

[0018] El material que contiene almidón se puede reducir a tamaño de partícula, preferiblemente por molienda en húmedo o en seco, para exponer más área de superficie. En un aspecto, el tamaño de partícula es preferiblemente  
20 entre 0,05 a 3,0 mm, más preferiblemente entre 0,1 a 1,5 mm, y de la forma más preferible entre 0,1 a 0,5 mm, de modo que preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 50%, incluso más preferiblemente al menos 70%, y de la forma más preferible al menos 90% del material que contiene almidón pasa a través de una criba con una pantalla de preferiblemente 0,05 a 3,0 mm, más preferiblemente una pantalla de 0,5 a 1,5 mm, y de la forma más preferible una pantalla de 0,1 a 0,5 mm.

25 [0019] Polipéptido aislado: el término "polipéptido aislado" como se usa aquí se refiere a un polipéptido que está aislado de una fuente. En un aspecto preferido, el polipéptido es al menos 1% puro, preferiblemente al menos 5% puro, más preferiblemente al menos 10% puro, más preferiblemente al menos 20% puro, más preferiblemente al menos 40% puro, más preferiblemente al menos 60% puro, incluso más preferiblemente al menos 80% puro, y de la forma más preferible al menos 90% puro, como se determina por SDS-PAGE.

[0020] Polipéptido sustancialmente puro: el término "polipéptido sustancialmente puro" denota aquí una preparación de polipéptido que contiene como mucho 10%, preferiblemente como mucho 8%, más preferiblemente como mucho 6%,  
35 más preferiblemente como mucho 5%, más preferiblemente como mucho 4%, más preferiblemente como mucho 3%, incluso más preferiblemente como mucho 2%, de la forma más preferible como mucho 1%, e incluso de la forma más preferible como mucho 0,5% en peso de otro material de polipéptido con el que está originalmente o de forma recombinante asociado. Por lo tanto, se prefiere que el polipéptido sustancialmente puro sea al menos 92% puro, preferiblemente al menos 94% puro, más preferiblemente al menos 95% puro, más preferiblemente al menos 96% puro, más preferiblemente al menos 97% puro, más preferiblemente al menos 98% puro, incluso más preferiblemente al menos 99% puro, de la forma más preferible al menos 99,5% puro, e incluso de la forma más preferible 100% puro en peso del material de polipéptido total presente en la preparación. Los polipéptidos están preferiblemente en una forma sustancialmente pura, es decir, que la preparación de polipéptido está esencialmente libre de otro material de polipéptido con el que esté originalmente o de forma recombinante asociado. Esto se puede conseguir, por ejemplo, preparando el polipéptido por métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación tradicionales.

45 [0021] Polipéptido maduro: el término "polipéptido maduro" se define aquí como un polipéptido en su forma final tras la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como el tratamiento de N-terminal, truncamiento de C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 19 a 385 de SEC ID n°: 2 basado en el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, Protein Engineering 10: 1-6) que predice que los aminoácidos 1 a 18 de SEC ID n°: 2 es un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 19 a 385 de SEC ID n°: 4 basado en el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *supra*) que predice que los aminoácidos 1 a 18 de SEC ID n°: 4 es un péptido señal. En otro aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 19 a 251 de SEC ID n°: 6 basado en el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *supra*) que predice que los aminoácidos 1 a 18 de SEC ID n°: 6 es un péptido señal.

55 [0022] Secuencia codificante de polipéptido maduro: el término "secuencia codificante de polipéptido maduro" se define aquí como una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad potenciadora amilolítica. En un aspecto, la secuencia codificante de polipéptido maduro es los nucleótidos 55 a 1273 de SEC ID n°: 1 basada en el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *supra*) que predice que los nucleótidos 1 a 54 de SEC ID n°: 1 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante de polipéptido maduro es los nucleótidos 55 a 1214 de SEC ID n°: 3 basada en el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *supra*) que predice que los nucleótidos 1 a 54 de SEC ID n°: 3 codifican un péptido señal. En otro aspecto, la secuencia codificante de polipéptido maduro es los nucleótidos 55 a 753 de SEC ID n°: 5 basada en el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *supra*) que predice que los nucleótidos 1 a 54 de SEC ID n°: 5 codifican un péptido señal.

65

[0023] Identidad de secuencia: la relación entre dos secuencias de aminoácido o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad de secuencia".

[0024] Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, Trends in Genetics 16: 276-277), preferiblemente versión 3.0.0 o superior. Los parámetros opcionales usados son una penalización de apertura de espacio de 10, una penalización de extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). La salida de la "identidad más larga" marcada con Needle (obtenida utilizando la opción *-nobrief*) se usa como el porcentaje de identidad y se calculada de la siguiente manera:

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

[0025] Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *supra*), preferiblemente la versión 3.0.0 o superior. Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4). La salida de la "identidad más larga" marcada con Needle (obtenida utilizando la opción *-nobrief*) se usa como el porcentaje de identidad y se calculada de la siguiente manera:

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

[0026] Secuencia homóloga: el término "secuencia homóloga" se define aquí como una proteína predicha que tiene un valor E (o puntuación de expectativa) inferior a 0,001 en una búsqueda rápida (Pearson, W.R., 1999, in Bioinformatics Methods and Protocols, S. Misener and S. A. Krawetz, ed., pp. 185-219) con el polipéptido de *Neurospora crassa* que tiene actividad potenciadora amilolítica de SEC ID n°: 2 o el polipéptido maduro del mismo, el polipéptido de *Aspergillus nidulans* que tiene actividad potenciadora amilolítica de SEC ID n°: 4 o el polipéptido maduro del mismo, o el polipéptido de *Aspergillus oryzae* que tiene actividad potenciadora amilolítica de SEC ID n°: 6 o el polipéptido maduro del mismo.

[0027] Fragmento de polipéptido: el término "fragmento de polipéptido" se define aquí como un polipéptido que tiene uno o más (varios) aminoácidos eliminados del amino y/o carboxilo terminal del polipéptido maduro de SEC ID n°: 2, SEC ID n°: 4 o SEC ID n°: 6, o una secuencia homóloga del mismo, donde el fragmento tiene actividad potenciadora amilolítica. En un aspecto, un fragmento contiene al menos 312 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 330 residuos de aminoácidos y de la forma más preferible al menos 348 residuos de aminoácidos del polipéptido maduro de SEC ID n°: 2 o una secuencia homóloga del mismo. En otro aspecto, un fragmento contiene al menos 312 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 330 residuos de aminoácidos y de la forma más preferible al menos 348 residuos de aminoácidos del polipéptido maduro de SEC ID n°: 4 o una secuencia homóloga del mismo. En otro aspecto, un fragmento contiene al menos 200 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 210 residuos de aminoácidos y de la forma más preferible al menos 220 residuos de aminoácidos del polipéptido maduro de SEC ID n°: 6 o una secuencia homóloga del mismo.

[0028] Subsecuencia: el término "subsecuencia" se define aquí como una secuencia de nucleótidos que tiene uno o más (varios) nucleótidos eliminados del extremo 5' y/o 3' de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 1, SEC ID n°: 3, o SEC ID n°: 5 o una secuencia homóloga del mismo; donde la subsecuencia codifica un fragmento del polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica. En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos 936 nucleótidos, más preferiblemente al menos 990 nucleótidos y de la forma más preferible al menos 1044 nucleótidos de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 1 o una secuencia homóloga del mismo. En otro aspecto, una subsecuencia contiene al menos 936 nucleótidos, más preferiblemente al menos 990 nucleótidos y de la forma más preferible al menos 1044 nucleótidos de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 3 o una secuencia homóloga del mismo. En otro aspecto, una subsecuencia contiene al menos 600 nucleótidos, más preferiblemente al menos 6300 nucleótidos y de la forma más preferible al menos 660 nucleótidos de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 5 o una secuencia homóloga del mismo.

[0029] Variante alélica: el término "variante alélica" denota aquí cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación, y puede dar como resultado polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones del gen pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0030] Polinucleótido aislado: el término "polinucleótido aislado" como se usa aquí se refiere a un polinucleótido que es aislado de una fuente. En un aspecto preferido, el polinucleótido es al menos 1% puro, preferiblemente al menos 5% puro, más preferiblemente al menos 10% puro, más preferiblemente al menos 20% puro, más preferiblemente al menos 40% puro, más preferiblemente al menos 60% puro, incluso más preferiblemente al menos 80% puro y de la forma más preferible al menos 90% puro, según se determina por electroforesis de agarosa.

[0031] Polinucleótido sustancialmente puro: el término "polinucleótido sustancialmente puro" según se usa aquí se refiere a una preparación polinucleótida libre de otros nucleótidos indeseados o extraños y en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteína genéticamente modificada. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como mucho 10%, preferiblemente como mucho 8%, más preferiblemente como mucho 6%, más preferiblemente como mucho 5%, más preferiblemente como mucho 4%, más preferiblemente como mucho 3%, incluso más preferiblemente como mucho 2%, de la forma más preferible como mucho 1%, e incluso de la forma más preferible como mucho 0,5% en peso de otro material polinucleótido con el que está originalmente o de forma recombinante asociado. Un polinucleótido sustancialmente puro puede, no obstante, incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural, tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido sustancialmente puro sea al menos 90% puro, preferiblemente al menos 92% puro, más preferiblemente al menos 94% puro, más preferiblemente al menos 95% puro, más preferiblemente al menos 96% puro, más preferiblemente al menos 97% puro, incluso más preferiblemente al menos 98% puro, de la forma más preferible al menos 99% puro e incluso de la forma más preferible al menos 99,5% puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura, es decir, que la preparación polinucleótida está esencialmente libre de otro material polinucleótido con el que está originalmente o de forma recombinante asociado. Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, de ADNc, ARN, semisintéticos o cualquier combinación de los mismos.

[0032] Secuencia codificante: cuando se usa aquí, el término "secuencia codificante" se refiere a una secuencia de nucleótidos, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los límites de la secuencia codificante están generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que empieza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG y acaba con un codón de terminación tal como TAA, TAG y TGA. La secuencia codificante puede ser una secuencia de nucleótidos de ADN, de ADNc, sintética o recombinante.

[0033] ADNc: el término "ADNc" se define aquí como una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm madura empalmada, obtenida a partir de una célula eucariota. Secuencias de intrones con carencias de ADNc que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente. La transcripción de ARN primaria inicial es un precursor de ARNm que se procesa a través de una serie de pasos antes de aparecer como ARNm empalmado maduro. Estos pasos incluyen la eliminación de secuencias de intrones por un proceso denominado empalme. ADNc derivado ARNm carece, por lo tanto, de cualquier secuencia de intrones.

[0034] Constructo de ácidos nucleicos: el término "constructo de ácidos nucleicos", como se utiliza en este caso, se refiere a una molécula de ácido nucleico, bien uni- o bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de una manera que no existirían de otro modo en la naturaleza o que es sintético. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control necesarias para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0035] Secuencias de control: el término "secuencias de control" se define aquí para incluir todos los componentes necesarios para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o foránea de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o nativa o foránea entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, una secuencia líder de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada traduccionales y transcripcionales. Las secuencias de control pueden estar provistas de enlaces para introducir sitios de restricción específicos facilitando la unión de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

[0036] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" se refiere aquí a una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia de codificación de una secuencia polinucleótida de modo que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

[0037] Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de un polipéptido, incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0038] Vector de expresión: el término "vector de expresión" se define aquí como una molécula de ADN circular o lineal que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención y está operativamente enlazado a nucleótidos adicionales que permiten su expresión.

[0039] Célula huésped: el término "célula huésped", como se utiliza en este caso, incluye cualquier tipo de célula que sea susceptible de transformación, transfección, transducción y similar con un constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprenda un polinucleótido de la presente invención.

[0040] Modificación: el término "modificación" se refiere aquí a cualquier modificación química del polipéptido que comprende o consista en el polipéptido maduro de SEC ID n°: 2, SEC ID n°: 4 o SEC ID n°: 6 o una secuencia homóloga de las mismas, así como la manipulación genética del ADN que codifica tal polipéptido. La modificación puede ser una sustitución, una eliminación y/o una inserción de uno o más (diferentes) aminoácidos así como reemplazos de una o más (diferentes) cadenas laterales de aminoácidos.

[0041] Variante artificial: cuando se usa aquí, el término "variante artificial" se refiere a un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica producida por un organismo que expresa una secuencia de polinucleótidos modificada de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 1, SEC ID n°: 3, o SEC ID n°: 5 o una secuencia homóloga de la misma. La secuencia de nucleótidos modificada se obtiene a través de la intervención humana por modificación de la secuencia de polinucleótidos descrita en SEC ID n°: 1, SEC ID n°: 3 o SEC ID n°: 5 o una secuencia homóloga de las mismas.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos que tienen actividad potenciadora amilolítica para su uso en un proceso de la invención

[0042] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a procesos para degradar un material que contiene almidón, que comprenden: tratamiento del material que contiene almidón con una composición enzimática que comprende una o más enzimas amilolíticas (diferentes) en presencia de un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica que comprende secuencias de aminoácidos que tienen un grado de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID n°: 4 de al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, incluso más preferiblemente al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95% e incluso de la forma más preferible al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%, que tiene actividad potenciadora amilolítica (en adelante "polipéptidos homólogos"). En un aspecto preferido, los polipéptidos homólogos comprenden secuencias de aminoácidos que difieren en diez aminoácidos, preferiblemente en cinco aminoácidos, más preferiblemente en cuatro aminoácidos, incluso más preferiblemente en tres aminoácidos, de la forma más preferible en dos aminoácidos e incluso de la forma más preferible en un aminoácido del polipéptido maduro de SEC ID n°: 4.

[0043] Un polipéptido para su uso en un proceso de la invención preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 4 o una variante alélica de la misma, o un fragmento de la misma que tenga actividad potenciadora amilolítica. En un aspecto preferido, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 4. En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende el polipéptido maduro de SEC ID n°: 4. En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende los aminoácidos 19 a 385 de SEC ID n°: 4, o una variante alélica de la misma, o un fragmento de la misma que tiene actividad potenciadora amilolítica. En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende los aminoácidos 19 a 385 de SEC ID n°: 4. En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 4 o una variante alélica de la misma, o un fragmento de la misma que tiene actividad potenciadora amilolítica. En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 4. En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en el polipéptido maduro de SEC ID n°: 4. En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en los aminoácidos 19 a 385 de SEC ID n°: 4 o una variante alélica de la misma, o un fragmento de la misma que tiene actividad potenciadora amilolítica. En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en los aminoácidos 19 a 385 de SEC ID n°: 4.

[0044] La secuencia de nucleótidos de SEC ID n°: 3 o una subsecuencia de la misma, así como la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 4 o un fragmento de la misma, se pueden usar para diseñar sondas de ácidos nucleicos para identificar y clonar polipéptidos codificantes de ADN que tengan actividad potenciadora amilolítica a partir de cepas de diferente géneros o especies, según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para hibridación con el ADNc o genómico del género o especie de interés, procedimientos de transferencia de Southern estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente en el mismo. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deben ser de al menos 14, preferiblemente al menos 25, más preferiblemente al menos 35 y de la forma más preferible al menos 70 nucleótidos de longitud. No obstante, se prefiere que la sonda de ácidos nucleicos tenga al menos 100 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la sonda de ácidos nucleicos puede tener al menos 200 nucleótidos, preferiblemente al menos 300 nucleótidos, más preferiblemente al menos 400 nucleótidos o de la forma más preferible al menos 500 nucleótidos de longitud. Se pueden utilizar sondas incluso más largas, por ejemplo, sondas de ácidos nucleicos que tengan preferiblemente al menos 600 nucleótidos, más preferiblemente al menos 700 nucleótidos, incluso más preferiblemente al menos 800 nucleótidos o de la forma más preferible al menos 900 nucleótidos de longitud. Se pueden usar tanto sondas de ADN como de ARN. Las sondas están típicamente marcadas para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con <sup>32</sup>P, <sup>3</sup>H, <sup>35</sup>S, biotina o avidina). Tales sondas están abarcadas por la presente invención.

[0045] Una genoteca de ADN genómico o de ADNc preparada a partir de tales otras cepas se puede examinar, por lo tanto, para ADN que hibridice con las sondas descritas anteriormente y que codifique un polipéptido que tenga actividad potenciadora amilolítica. El ADN genómico u otro de estas otras cepas se puede separar por electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa u otras técnicas de separación. El ADN de las bibliotecas o el ADN separado se puede transferir e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que sea

homólogo de SEC ID n°: 3 o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa preferiblemente en una transferencia de Southern.

5 [0046] La hibridación indica que la secuencia de nucleótidos hibridiza a una sonda de ácidos nucleicos marcada que se corresponde con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 3, la secuencia de ADNc contenida en la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 3 o la secuencia de ADN genómico que comprende la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 3, su cadena complementaria de longitud completa o una subsecuencia de la misma, bajo condiciones de astringencia de muy bajas a muy altas. Las moléculas a las que la sonda de ácidos nucleicos hibridiza bajo estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, películas radiográficas.

10 [0047] En un aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 3. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es los nucleótidos 55 a 1214 de SEC ID n°: 3. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es una secuencia polinucleótida que codifica el polipéptido de SEC ID n°: 4, o una subsecuencia de la misma. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es SEC ID n°: 3.

15 [0048] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, se definen condiciones de astringencia de muy bajas a muy altas como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3% de SDS, 200 µg/ml ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y bien 25% de formamida para astringencias muy bajas y bajas, 35% de formamida para astringencias medias y medio altas, o 50% de formamida para astringencias alto y muy altas, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas óptimamente.

20 [0049] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador se lava finalmente tres veces cada vez durante 15 minutos usando 2X SSC, 0,2% de SDS preferiblemente a 45°C (astringencia muy baja), más preferiblemente a 50°C (astringencia baja), más preferiblemente a 55°C (astringencia media), más preferiblemente a 60°C (astringencia media-alta), incluso más preferiblemente a 65°C (astringencia alta) y de la forma más preferible a 70°C (astringencia muy alta).

25 [0050] Para sondas cortas de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia se definen como prehibridación, hibridación y post-hibridación de lavado en aproximadamente 5°C a aproximadamente 10°C por debajo de la T<sub>m</sub> calculada utilizando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390) en 0,9 M de NaCl, 0,09 M de Tris-HCl pH 7,6, 6 mM de EDTA, 0,5% de NP-40, 1X solución de Denhardt, 1 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM de fosfato monobásico de sodio, 0,1 mM de ATP y 0,2 mg de ARN de levadura por ml siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas óptimamente.

30 [0051] Para sondas cortas de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, el material portador se lava una vez en 6X SCC más 0,1% de SDS durante 15 minutos y dos veces cada una durante 15 minutos usando 6X SSC en 5°C a 10°C por debajo de la T<sub>m</sub> calculada.

35 [0052] Polipéptidos aislados que tienen actividad potenciadora amilolítica para su uso en un proceso de la invención se pueden codificar por polinucleótidos que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que tienen un grado de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 3 de al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, e incluso de la forma más preferible al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, que codifican un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica. Véase la sección de polinucleótidos en la presente.

40 [0053] Variantes artificiales para su uso en un proceso de la invención pueden comprender una sustitución, eliminación y/o inserción de uno o más (o diferentes) aminoácidos del polipéptido maduro de SEC ID n°: 4, o una secuencia homóloga del mismo. Preferiblemente, los cambios en los aminoácidos son de naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegado y/o la actividad de la proteína, pequeñas deleciones, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos, pequeñas extensiones de amino o carboxilo terminal, tales como un residuo de metionina aminoterminal, un pequeño péptido enlazador de hasta aproximadamente 20-25 residuos, o una pequeña extensión que facilita la purificación mediante el cambio de la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

45 [0054] Ejemplos de sustituciones conservadoras están en el grupo de los aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y son descritos, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, New York. Los intercambios que se producen de forma más frecuente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

65

- 5 [0055] Además de los 20 aminoácidos estándar, se pueden sustituir aminoácidos no estándar (tales como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y alfa-metil serina) por residuos de aminoácidos de un polipéptido de tipo salvaje. Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no se codifican por el código genético y aminoácidos no naturales se puede sustituir por residuos de aminoácidos. "Aminoácidos no naturales" se han modificado después de la síntesis de proteína y/o tienen una estructura química en su cadena o cadenas laterales diferente de los aminoácidos estándar. Los aminoácidos no naturales se pueden sintetizar químicamente y, preferiblemente, están disponibles comercialmente e incluyen ácido pipercolico, ácido carboxílico de tiazolidina, dehidroprolina, 3- y 4-metilprolina y 3,3-dimetilprolina.
- 10 [0056] Alternativamente, los cambios en los aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos se alteran. Por ejemplo, los cambios en los aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo y similares.
- 15 [0057] Los aminoácidos esenciales del polipéptido original se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En esta última técnica, las mutaciones de alanina individuales se introducen en cada residuo de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad biológica (es decir, actividad potenciadora amilolítica) para identificar residuos de aminoácido que son fundamentales para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton *et al.*, 1996, J. Biol. Chem. 271: 4699-4708. El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica se puede determinar también por análisis físico de estructura, como se determina por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con la mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos *et al.*, 1992, Science 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, J. Mol. Biol. 224: 899-904; Wlodaver *et al.*, 1992, FEBS Lett. 309: 59-64. Las identidades de los aminoácidos esenciales pueden también ser inferidas a partir del análisis de identidades con polipéptidos que están relacionados con un polipéptido según la invención.
- 25 [0058] Sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples, deleciones y/o inserciones se pueden hacer y evaluar usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o redistribución, seguidos de un procedimiento de selección pertinente, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-2156; WO 95/17413 o WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación en fagos (p. ej., Lowman *et al.*, 1991, Biochem. 30: 10832-10837, patente EE. UU. n° 5,223,409, WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire *et al.*, 1986, Gene 46: 145; Ner *et al.*, 1988, DNA 7: 127).
- 30 [0059] Métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con métodos de selección automatizados de alto rendimiento para detectar actividad de polipéptidos mutagenizados clonados expresados por células huésped (Ness *et al.*, 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar a partir de las células huésped y secuenciar rápidamente utilizando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de los residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.
- 35 [0060] El número total de sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones del polipéptido maduro de SEC ID n°: 2, SEC ID n°: 4 o SEC ID n°: 6 es 10, preferiblemente 9, más preferiblemente 8, más preferiblemente 7, más preferiblemente como mucho 6, más preferiblemente 5, más preferiblemente 4, incluso más preferiblemente 3, de la forma más preferible 2 e incluso de la forma más preferible 1.
- 40 Fuentes de polipéptidos que tienen actividad potenciadora amilolítica para su uso en un proceso de la invención
- 45 [0061] Un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica para su uso en un proceso de la invención se puede obtener a partir de microorganismos de cualquier género. El término "obtenido a partir de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente dada se referirá a que el polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos es producido por la fuente o por una cepa en la que la secuencia de nucleótidos de la fuente se ha insertado. En un aspecto preferido, el polipéptido obtenido a partir de una fuente dada es secretado extracelularmente.
- 50 [0062] Un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica puede ser un polipéptido bacteriano. Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano gram positivo tal como un polipéptido de *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Geobacillus* o *Oceanobacillus* que tiene actividad potenciadora amilolítica, o un polipéptido bacteriano gram negativo tal como un polipéptido de *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Neisseria* o *Ureaplasma* que tiene actividad potenciadora amilolítica.
- 55 [0063] En un aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis* que tiene actividad potenciadora amilolítica.
- 60

[0064] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* o *Streptococcus equi spp. Zoepidemicus* que tiene actividad potenciadora amilolítica.

[0065] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* o *Streptomyces lividans* que tiene actividad potenciadora amilolítica.

[0066] Un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica también puede ser un polipéptido fúngico, y más preferiblemente un polipéptido de levadura tal como un polipéptido de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia* que tiene actividad potenciadora amilolítica; o más preferiblemente un polipéptido fúngico filamentoso tal como un polipéptido de *Acremonium*, *Agaricus*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Botryosphaeria*, *Ceriporiopsis*, *Chaetomidium*, *Chrysosporium*, *Claviceps*, *Cochliobolus*, *Coprinopsis*, *Coptotermes*, *Corynascus*, *Cryphonectria*, *Cryptococcus*, *Diplodia*, *Exidia*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Holomastigotoides*, *Humicola*, *Irpex*, *Lentinula*, *Leptosphaeria*, *Magnaporthe*, *Melanocarpus*, *Meripilus*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Piromyces*, *Poitrasia*, *Pseudoplectania*, *Pseudotriconympha*, *Rhizomucor*, *Schizophyllum*, *Scytalidium*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trichoderma*, *Trichophaea*, *Verticillium*, *Volvariella* o *Xylaria* que tiene actividad potenciadora amilolítica.

[0067] En un aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis* que tiene actividad potenciadora amilolítica.

[0068] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Acremonium cellulolyticus*, *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola grisea*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Irpex lacteus*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Thielavia achromatica*, *Thielavia albomyces*, *Thielavia albopilosa*, *Thielavia australeinsis*, *Thielavia fimeti*, *Thielavia microspora*, *Thielavia ovispora*, *Thielavia peruviana*, *Thielavia spededonium*, *Thielavia setosa*, *Thielavia subthermophila*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride* que tiene actividad potenciadora amilolítica.

[0069] En un aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Aspergillus nidulans* que tiene actividad potenciadora amilolítica. En un aspecto más preferido, el polipéptido es un polipéptido FGSC A1000 de *Aspergillus nidulans* que tiene actividad potenciadora amilolítica, por ejemplo, el polipéptido que comprende el polipéptido maduro de SEC ID n°: 4.

[0070] Se entiende que para las especies anteriormente mencionadas abarca tanto el estado perfecto como el imperfecto, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de la especie por el que se conocen. Expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes apropiados.

[0071] Cepas de estas especies están fácilmente disponibles para el público en un número de colecciones de cultivo, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0072] Además, tales polipéptidos se pueden identificar y obtener a partir de otras fuentes, incluyendo microorganismos aislados a partir de la naturaleza (p. ej., tierra, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas mencionadas anteriormente. Técnicas para aislar microorganismos a partir de hábitats naturales se conocen en la técnica. El polinucleótido se puede obtener luego por selección de forma similar en una genoteca de ADNc o genómica de tal microorganismo. Una vez que se ha detectado un polinucleótido que codifica un polipéptido con la sonda o sondas, el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

[0073] Polipéptidos también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos divisibles de fusión donde otro polipéptido se fusiona en el N-término o el C-término del polipéptido o fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado se produce por la fusión de una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) que codifica otro polipéptido con una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma). Técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen el enlace de las secuencias de codificación que codifican los polipéptidos de modo que éstas estén en el marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo control del mismo promotor o promotores y terminador.

[0074] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión. En la secreción de la proteína de fusión, el sitio se divide liberando el polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica a partir de la proteína de fusión. Ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, un sitio Kex2 que codifica el dipéptido Lys-Arg (Martin *et al.*, 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina *et al.*, 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488- 3493; Ward *et al.*, 1995, Biotechnology 13: 498-503; and Contreras *et al.*, 1991, Biotechnology 9: 378-381), un sitio Ile-(Glu o Asp)-Gly-Arg, que es dividido por una proteasa de Factor Xa después del residuo de arginina (Eaton *et al.*, 1986, Biochem. 25: 505-512), un sitio Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, que es dividido por una enteroquinasa después de la lisina (Collins-Racie *et al.*, 1995, Biotechnology 13: 982-987), un sitio His-Tyr-Glu o sitio His-Tyr-Asp, que se divide por Genenase I (Carter *et al.*, 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248), un sitio Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser, que se divide por trombina después del Arg (Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48), un sitio Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln- Gly, que se divide por TEV proteasa después del Gln (Stevens, 2003, *supra*) y un sitio Leu-Glu-Val- Leu-Phe-Gln-Gly-Pro, que se divide por una forma genéticamente modificada de proteasa 3C de rinovirus de humano después del Gln (Stevens, 2003, *supra*).

15 Polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen actividad potenciadora amilolítica para su uso en un proceso de la invención

[0075] Polinucleótidos aislados pueden comprender o consistir en secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que tienen actividad potenciadora amilolítica para su uso en un proceso de la presente invención.

[0076] En un aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en SEC ID n°: 3. En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 3. En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en los nucleótidos 55 a 1214 de SEC ID n°: 3. La presente invención también abarca secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n°: 4 o el polipéptido maduro de la misma, que difiere de la SEC ID n°: 3 o de la secuencia de codificación del polipéptido maduro de la misma en virtud de la degeneración del código genético. La presente invención también se refiere a subsecuencias de SEC ID n°: 3 que codifican fragmentos de SEC ID n°: 4 que tienen actividad potenciadora amilolítica.

[0077] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen el aislamiento a partir de ADN genómico, la preparación de ADNc o una combinación de los mismos. La clonación de los polinucleótidos de la presente invención a partir de tal ADN genómico se puede efectuar, por ejemplo, usando la bien conocida reacción en cadena de polimerasa (PCR) o las bibliotecas de selección de anticuerpo de expresión para detectar fragmentos de ADN clonado con características estructurales compartidas. Véase, por ejemplo, Inniset *al.*, 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), transcripción activada ligada (LAT) y amplificación basada en secuencias de nucleótidos (NASBA) se pueden utilizar. Los polinucleótidos se pueden clonar a partir de una cepa de *Aspergillus* o *Neurospora* u otro organismo u organismo relacionado y así, por ejemplo, puede ser una variante de especies o alélica del polipéptido que codifica la región de la secuencia de nucleótidos.

[0078] Polinucleótidos aislados pueden comprender o consistir en secuencias de nucleótidos que tengan un grado de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 3 de al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, e incluso de la forma más preferible al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%, que codifica un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica.

[0079] La modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido para su uso en un proceso de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido. El término "sustancialmente similar" al polipéptido se refiere a formas del polipéptido que no se producen de forma natural. Estos polipéptidos pueden diferir de alguna forma diseñada del polipéptido aislado a partir de su fuente nativa, por ejemplo, variantes artificiales que difieren en la actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo o similares. La secuencia variante se puede construir basándose en la secuencia de nucleótidos presentada como la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 3, por ejemplo, una subsecuencia de la misma y/o por introducción de sustituciones de nucleótidos que no den lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos, pero que correspondan al uso de codón del organismo huésped destinado a la producción de la enzima, o por introducción de sustituciones de nucleótidos que puedan dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de sustitución de nucleótidos véase, por ejemplo, Ford *et al.*, 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

[0080] Es evidente para los expertos en la técnica que tales sustituciones se pueden hacer fuera de las regiones críticas para la función de la molécula y seguir resultando un polipéptido activo. Residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificado por un polinucleótido aislado y, por lo tanto, preferiblemente no sujetos a sustitución, se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (véase, por ejemplo, Cunningham and Wells, 1989, *supra*). En la última técnica, se introducen mutaciones en cada residuo positivamente cargado de la molécula y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad potenciadora amilolítica para identificar los residuos de aminoácido que son fundamentales

para la actividad de la molécula. Sitios de interacción enzima-sustrato se pueden determinar también por análisis de la estructura tridimensional según se determina por técnicas tales como el análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcaje por fotoafinidad (véase, por ejemplo, de Vos *et al.*, 1992, *supra*; Smith *et al.*, 1992, *supra*; Wlodaver *et al.*, 1992, *supra*).

5

Constructos de ácidos nucleicos

10

[0081] Constructos de ácidos nucleicos pueden comprender un polinucleótido aislado operativamente enlazado a una o más (diferentes) secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

15

[0082] Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido para su uso en un proceso de la presente invención se puede manipular de varias formas para facilitar la expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia del polinucleótido antes de la inserción en un vector puede ser deseable o necesaria, dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias polinucleótidas utilizando métodos de ADN recombinante se conocen bien en la técnica.

20

[0083] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, una secuencia de nucleótidos que sea reconocida por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcionales que intervienen en la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestre actividad transcripcional en la célula huésped elegida, incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y se puede obtener a partir de genes que codifican polipéptidos intracelulares o extracelulares bien homólogos o heterólogo de la célula huésped.

25

[0084] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención, especialmente en una célula huésped bacteriana, son los promotores obtenidos a partir del operón lac de *E. coli*, el gen de agarasa (*dagA*) de *Streptomyces coelicolor*, el gen de levansucrasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis*, el gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, el gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, el gen de alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, el gen de penicilinas (*penP*) de *Bacillus licheniformis*, los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus* y el gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 3727-3731), al igual que el promotor *tac* (DeBoer *et al.*, 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80: 21-25). Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242: 74-94 y en Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.

30

35

[0085] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son los promotores obtenidos a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa (*glaA*) de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, al igual que un promotor NA2-*tpi* (un promotor modificado que incluye un gen que codifica una alfa-amilasa neutra en los *Aspergilli* en los que el líder no traducido se ha sustituido por un líder no traducido de un gen que codifica triosa fosfato isomerasa en los *Aspergilli*; ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados que incluyen el gen que codifica la alfa-amilasa neutra en *Aspergillus niger* en el que el líder no traducido se ha sustituido por un líder no traducido del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa en *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*) y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

40

45

50

55

[0086] En un huésped de levadura, los promotores útiles se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, ADH2/GAP), triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae* (TPI), metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1) y 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, Yeast 8: 423-488.

60

[0087] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está operativamente enlazada al 3' terminal de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

- [0088] Terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.
- 5 [0089] Terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae* y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.
- 10 [0090] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que sea importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está operativamente enlazada al 5' terminal de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.
- 15 [0091] Los líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.
- [0092] Líderes adecuados para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*.
- 20 [0093] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al 3' terminal de la secuencia de nucleótidos y, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.
- 25 [0094] Secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.
- 30 [0095] Secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.
- 35 [0096] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante del péptido señal que codifica un péptido señal enlazado al amino terminal de un polipéptido y dirige el polipéptido codificado en la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos puede contener intrínsecamente una secuencia codificante del péptido señal naturalmente enlazada en el marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido segregado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante de péptido señal que sea foránea a la secuencia codificante. La secuencia codificante del péptido señal foráneo puede ser necesaria donde la secuencia codificante no contiene de forma natural una secuencia codificante del péptido señal. Alternativamente, la secuencia codificante del péptido señal foráneo puede simplemente reemplazar la secuencia codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. No obstante, cualquier secuencia codificante del péptido señal que dirija el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula huésped de elección, es decir, segregado en un medio de cultivo, se puede utilizar en la presente invención.
- 40 [0097] Secuencias de codificación de péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias de codificación de péptido señal obtenidas a partir de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutras de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM) y prsA de *Bacillus subtilis*. Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.
- 45 [0098] Secuencias de codificación de péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias de codificación de péptido señal obtenidas a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens* y lipasa de *Humicola lanuginosa*.
- 50 [0099] Péptidos señal útiles para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias de codificación de péptido señal útiles son descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.
- 55 [0100] El péptido señal puede comprender o consistir en los aminoácidos 1 a 18 de SEC ID n°: 4. En otro aspecto preferido, la secuencia codificante del péptido señal comprende o consiste en los nucleótidos 1 a 54 de SEC ID n°: 3.
- 60 [0101] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante de propéptido que codifica un propéptido situado en el amino terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como proenzima o propolipéptido (o

un zimógeno en algunos casos). Un propéptido es generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo maduro por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido a partir del propropéptido. La secuencia codificante de propéptido se puede obtener a partir de los genes para proteasa alcalina (*aprE*) de *Bacillus subtilis*, proteasa neutra (*nprT*) de *Bacillus subtilis*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

[0102] Donde tanto el péptido señal como las secuencias de propéptido están presentes en el amino terminal de un polipéptido, la secuencia de propéptido está situada junto al amino terminal de un polipéptido y la secuencia de péptido señal está situada junto al amino terminal de la secuencia de propéptido.

[0103] También puede ser deseable añadir secuencias reguladores que permitan la regulación de la expresión del polipéptido con respecto al crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que provocan que la expresión del gen se active o desactive en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en sistemas procarionóticos incluyen los sistemas operadores *lac*, *tac* y *trp*. En levadura, se puede utilizar el sistema ADH2 o sistema GAL1. En hongos filamentosos, el promotor de TAKA alfa-amilasa, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* se pueden utilizar como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son las que permiten amplificación de genes. En los sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido estaría operativamente enlazada con la secuencia reguladora.

#### Vectores de expresión

[0104] Vectores de expresión recombinantes pueden comprender un polinucleótido, un promotor y señales de parada traduccional y transcripcional. Los diferentes ácidos nucleicos y secuencias de control descritos aquí se pueden unir para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más (diferentes) sitios de restricción adecuados para permitir la inserción o la sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en tales sitios. Alternativamente, una secuencia polinucleótida se puede expresar por inserción de la secuencia de nucleótidos o un constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se encuentra en el vector de modo que la secuencia codificante está operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0105] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus) que se pueda someter convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y pueda provocar la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector dependerá normalmente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector se debe introducir. Los vectores pueden ser plásmidos circulares lineales o cerrados.

[0106] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser un vector que, cuando se introduzca en la célula huésped, se integre en el genoma y replique junto con el cromosoma o cromosomas en los que se ha integrado. Además, se puede utilizar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contengan el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula huésped o un transposón.

[0107] Los vectores contienen preferiblemente uno o más (diferentes) marcadores seleccionables que permiten la selección fácil de células transformadas, modificadas, transducidas o similares. Una etiqueta seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a los metales pesados, prototofia a auxótrofos y similares.

[0108] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*, o los marcadores que confieren resistencia antibiótica tales como resistencia a la ampicilina, canamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Marcadores adecuados para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrito-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa) y *trpC* (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos. Se prefiere para su uso en una célula de *Aspergillus* los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

[0109] Los vectores preferiblemente contienen un elemento o elementos que permitan la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0110] Para su integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma por

recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una ubicación o ubicaciones precisas del cromosoma o cromosomas. Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales debería contener preferiblemente un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10.000 pares de bases, preferiblemente de 400 a 10.000 pares de bases, y de la forma más preferible de 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencia con la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga de la secuencia objetivo del genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos no codificantes o codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

[0111] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita al vector replicar de manera autónoma en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador plásmido que medie la replicación autónoma que funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador plásmido" se define aquí como una secuencia de nucleótidos que permite que un plásmido o vector se replique *in vivo*.

[0112] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en el *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAMB1 que permiten la replicación en el *Bacillus*.

[0113] Ejemplos de orígenes de replicación para su uso en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micrones, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3 y la combinación de ARS4 y CEN6.

[0114] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son AMA1 y ANS1 (Gems *et al.*, 1991, Gene 98: 61-67; Cullen *et al.*, 1987, Nucleic Acids Research 15: 9163-9175; WO 00/24883). El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de los plásmidos o vectores que comprenden el gen se puede realizar según los métodos descritos en la WO 00/24883.

[0115] Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido en una célula huésped para aumentar la producción del producto génico. Un aumento en el número de copias del polinucleótido se puede obtener integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable, y por lo tanto las copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar por cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0116] Los procedimientos usados para enlazar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

#### Células huésped

[0117] Las células huésped recombinantes, incluyendo un polinucleótido aislado de la presente invención operativamente enlazado a una o más (diferentes) secuencias de control que dirigen la producción de un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica. Un constructo o vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el constructo o vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico que se duplique como se describe anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no sea idéntica a la célula madre debido a mutaciones que se producen durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá, en gran parte, del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

[0118] La célula huésped puede ser cualquier célula útil para la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, un procarionta o un eucariota.

[0119] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria gram positiva o una bacteria gram negativa. Bacterias gram positivas incluyen, pero de forma no limitada, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Geobacillus* y *Oceanobacillus*. Bacterias gram negativas incluyen, pero de forma no limitada, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Neisseria* y *Ureaplasma*.

[0120] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus*. Células de *Bacillus* útiles para la práctica de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, células de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*.

[0121] En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. En un aspecto más preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus amyloliquefaciens*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus clausii*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus licheniformis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus subtilis*.

[0122] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus*. Células de *Streptococcus* útiles para la práctica de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus equi spp. Zooepidemicus*.

[0123] En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Streptococcus equisimilis*. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Streptococcus pyogenes*. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Streptococcus uberis*. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Streptococcus equi spp. Zooepidemicus*.

[0124] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces*. Células de *Streptomyces* útiles para la práctica de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces lividans*.

[0125] En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Streptomyces achromogenes*. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Streptomyces avermitilis*. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Streptomyces coelicolor*. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Streptomyces griseus*. En otro aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Streptomyces lividans*.

[0126] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* se puede realizar, por ejemplo, por transformación de protoplasto (véase, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111- 115), usando células competentes (véase, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823- 829 o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221), por electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751) o por conjugación (véase, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* se puede realizar, por ejemplo, por transformación de protoplasto (véase, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (véase, por ejemplo, Dower *et al.*, 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* se puede efectuar, por ejemplo, por transformación de protoplasto y electroporación (véase, por ejemplo, Gong *et al.*, 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405) por conjugación (véase, por ejemplo, Mazodier *et al.*, 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585) o por transducción (véase, por ejemplo, Burke *et al.*, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* se puede efectuar, por ejemplo, por electroporación (véase, por ejemplo, Choi *et al.*, 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397) o por conjugación (véase, por ejemplo, Pinedo and Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* se puede efectuar, por ejemplo, por competencia natural (véase, por ejemplo, Perry and Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), por transformación de protoplasto (véase, por ejemplo, Catt and Jollick, 1991, Microbios. 68: 189-207), por electroporación (véase, por ejemplo, Buckley *et al.*, 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804) o por conjugación (véase, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436). No obstante, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para introducción de ADN en una célula huésped.

[0127] La célula huésped también puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, de insecto, vegetal o fúngica.

[0128] En un aspecto preferido, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongo", como se utiliza en este caso, incluye los filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota* (como los definen Hawksworth *et al.*, en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) al igual que los hongos *Oomycota* (como se citan en Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*).

[0129] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura", como se utiliza en este caso, incluye levadura ascoesporógena (*Endomycetales*), levadura basidioesporogénea y levadura de los *Fungi Imperfecti* (blastomicetos). Dado que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe definirse como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M., and Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

[0130] En un aspecto incluso más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

[0131] En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es

una célula de *Kluyveromyces lactis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

[0132] En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula fúngica filamentosa. "Hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (tal y como se definen en Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0133] En un aspecto incluso más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyposcladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

[0134] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

[0135] Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplasto, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de forma conocida *per se*. Procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en la EP 238 023 y Yelton *et al.*, 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470- 1474. Métodos adecuados para transformar de especies de *Fusarium* son descritos por Malardier *et al.*, 1989, Gene 78: 147-156 y la WO 96/00787. La levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito *et al.*, 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

Métodos de producción

[0136] Métodos de producción de un polipéptido para su uso en un proceso de la presente invención comprenden: (a) cultivo de una célula, que en su forma de tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido y (b) recuperación del polipéptido. En un aspecto preferido, la célula es del género *Aspergillus*. En otro aspecto más preferido, la célula es *Aspergillus nidulans*. En otro aspecto más preferido, la célula es *Aspergillus nidulans* FGSC A1000. Métodos de producción de un polipéptido para su uso en un proceso de la presente invención comprenden: (a) cultivo de una célula huésped recombinante, como se describe en este caso, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido y (b) recuperación del polipéptido.

[0137] Métodos de producción de un polipéptido para su uso en un proceso de la presente invención comprenden: (a) cultivo de una célula de huésped recombinante bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido, donde la célula huésped comprende una secuencia de nucleótidos mutante que tiene al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 3, donde la secuencia de nucleótidos mutante codifica un polipéptido que comprende o consiste en el polipéptido maduro de SEC ID n°: 4 y (b) recuperación del polipéptido.

[0138] En los métodos de producción, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación y fermentación a gran escala o pequeña escala (incluyendo, lote continuo, lote alimentado o fermentaciones en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales llevadas a cabo en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan al polipéptido ser expresado y/o aislado. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y de carbono y sales inorgánicas, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles de proveedores comerciales o se pueden preparar según

composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, el polipéptido se puede recuperar directamente del medio. Si el polipéptido no se segrega en el medio, se puede recuperar a partir de lisatos celulares.

5 [0139] Los polipéptidos se pueden detectar usando métodos conocidos en la técnica que sean específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, formación de un producto enzimático o desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, un ensayo enzimático se puede utilizar para determinar la actividad del polipéptido, como se describe en este caso.

10 [0140] El polipéptido resultante se puede recuperar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar a partir del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitados a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

15 [0141] Los polipéptidos para su uso en un proceso de la presente invención se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, cromatografía (p. ej., intercambio iónico, afinidad, exclusión hidrofóbica, de cromatoenfoco y de tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., isoelectroenfoco preparativo), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (véase, por ejemplo, purificación de proteína, Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

20 Composiciones

[0142] Composiciones que comprenden un polipéptido para su uso en un proceso de la presente invención pueden ser enriquecidas en tal polipéptido. El término "enriquecido" indica que la actividad potenciadora amilolítica de la composición se ha aumentado, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1,1.

[0143] La composición puede comprender un polipéptido para su uso en un proceso de la presente invención como el componente enzimático principal, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender actividades enzimáticas múltiples, tales como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, glicosiltransferasa de ciclodextrina, desoxiribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasa. La enzima o enzimas adicionales se pueden producir, por ejemplo, por un microorganismo perteneciente al género *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*; *Fusarium*, preferiblemente *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium toruloseum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*; *Humicola*, preferiblemente *Humicola insolens* o *Humicola lanuginosa*; o *Trichoderma*, preferiblemente *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

[0144] Las composiciones de polipéptido se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden ser en forma de un líquido o de una composición seca. Por ejemplo, la composición de polipéptido puede ser en forma de un granulado o un microgranulado. El polipéptido que se va a incluir en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

Usos

50 [0145] La presente invención se refiere a procesos para el uso de los polipéptidos que tienen actividad potenciadora amilolítica o composiciones de los mismos. Un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica para su uso en un proceso de la presente invención en combinación con otras enzimas amilolíticas, por ejemplo, alfa amilasas, glucoamilasas, pululanastas, etc., se pueden usar en aplicaciones varias. Tales aplicaciones incluyen, pero de forma no limitativa, tratamiento de almidón, molienda en húmedo de maíz, producción de alcohol, elaboración de cerveza, desencolado de almidón, aplicaciones detergentes, aplicaciones de panadería, industria de la bebida, procesos de extracción de petróleo, destintado de papel reciclado y piensos para animales.

[0146] En un aspecto, la presente invención se refiere a procesos para degradar un material que contiene almidón que incluyen: tratamiento del material que contiene almidón con una composición enzimática que comprende una o más (diferentes) enzimas amilolíticas en presencia de un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica seleccionado de:

(i) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID n°: 4;

65

(ii) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 3.

[0147] La presencia del polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica aumenta la degradación del material que contiene almidón en comparación con la ausencia del polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica. En un aspecto preferido, los procesos además comprenden recuperación o purificación del material que contiene almidón degradado. El material que contiene almidón degradado se puede recuperar o purificar utilizando cualquier método conocido en la técnica. El material que contiene almidón degradado puede ser glucosa, maltosa, maltodextrina o combinaciones de las mismas.

[0148] En otro aspecto, la presente invención se refiere a procesos para producir un producto sacarificado a partir de un material que contiene almidón, que incluye:

(a) licuefacción del material que contiene almidón con una alfa-amilasa; y

(b) sacarificación del material que contiene almidón licuado con una composición enzimática que comprende una o más (diferentes) enzimas amilolíticas;

donde el paso (a), el paso (b) o los pasos (a) y (b) se realizan en presencia de un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica seleccionado del grupo que consiste en:

(i) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID nº: 4;

(ii) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 3.

[0149] En un aspecto preferido, los procesos comprenden además la recuperación o purificación del producto sacarificado. El producto sacarificado se puede recuperar o purificar utilizando cualquier método conocido en la técnica. El producto sacarificado puede ser glucosa, maltosa, maltodextrina o combinaciones de las mismas. En la situación donde el producto sacarificado es glucosa, los procesos puede comprender además isomerización de la glucosa a fructosa con una glucosa (xilosa) isomerasa. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. nº 5.935.837 y la patente de EE. UU. nº 4.687.742. Un ejemplo de una xilosa isomerasa disponible comercialmente es SWEETZYME® (Novozymes A/S).

[0150] En otro aspecto, la presente invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación, que comprenden:

(a) sacarificación de un material que contiene almidón con una composición enzimática que comprende una o más (diferentes) enzimas amilolíticas en presencia de un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica seleccionado de:

(i) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID nº: 4;

(ii) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 3; y

(b) fermentación del material que contiene almidón sacarificado con uno o más (diferentes) microorganismos fermentativos para producir un producto de fermentación.

[0151] La presencia del polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica aumenta la sacarificación del material que contiene almidón en comparación con la ausencia del polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica. En un aspecto preferido, los procesos comprenden además (c) la recuperación del producto de fermentación a partir de la fermentación.

[0152] En otro aspecto, la presente invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación a partir de un material que contiene almidón, que comprende:

(a) licuefacción del material que contiene almidón con una alfa-amilasa;

(b) sacarificación del material que contiene almidón licuado con una composición enzimática que comprende una o más (diferentes) enzimas amilolíticas; y

(c) fermentación del material que contiene almidón sacarificado en presencia de uno o más (diferentes) organismos fermentativos para producir el producto de fermentación;

donde el paso (a), el paso (b) o los pasos (a) y (b) se llevan a cabo en presencia del polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica seleccionado de:

5 (i) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID n°: 4;

(ii) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 3.

10 [0153] En un aspecto preferido, los procesos comprenden además (d) la recuperación del producto de fermentación a partir de la fermentación.

15 [0154] En los procesos de la presente invención, un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica se puede utilizar conjuntamente con una o más (diferentes) enzimas amilolíticas en un número de aplicaciones, tales como las descritas más adelante. Cualquier materia prima adecuada que contenga almidón se puede utilizar. La materia prima se selecciona generalmente basada en la aplicación y/o el producto deseado.

20 [0155] Jarabe de maíz rico en fructosa. La conversión del almidón en fructosa puede consistir en cuatro pasos: licuefacción de almidón granulado, sacarificación del almidón licuado en dextrosa, purificación e isomerización de la dextrosa en fructosa. Se utilizan amilasas para producir jarabes de dextrosa de alto PM (oligosacáridos que tienen un PM firmemente agrupado en alrededor de 20.000 PM). Los fragmentos de aproximadamente 20.000 PM se pueden convertir rápida y completamente en glucosa por glucoamilasa y pululanasa. Véase, por ejemplo, la WO 2004/091544.

25 [0156] Molienda húmeda de maíz. La molienda húmeda de maíz es un proceso que produce aceite de maíz, harina de gluten, alimento de gluten y almidón. La amilasa alcalina se usa en la licuefacción de almidón y la glucoamilasa se usa en la sacarificación para producir glucosa. Un proceso de aceite de maíz a modo de ejemplo comprende remojo, desgerminación, desfibrado y separación del gluten, seguido de licuefacción usando, por ejemplo, una alfa amilasa, y de sacarificación usando, por ejemplo, una glucoamilasa. Véase, por ejemplo, la WO 2004/091544.

30 [0157] Procesos de molienda en seco. En la molienda en seco, el grano entero se muele y se combina con agua. El germen se retira opcionalmente por separación de flotación o técnicas equivalentes. La mezcla resultante, que contiene almidón, fibra, proteína y otros componentes del grano se licúa usando amilasa. Véase, por ejemplo, la WO 2004/091544.

35 [0158] Industria textil. El desencolado retira almidón de los tejidos. Después de tejer un tejido, el recubrimiento de almidón se debe retirar antes de tratamiento adicional del tejido para asegurar un resultado homogéneo a prueba de lavados. Se aplican amilasas durante o después de tejer las telas, o durante la fase de desencolado, o uno o más (diferentes) pasos adicionales de tratamiento del tejido. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n° 6.077.316.

40 [0159] Procesos para producir maltodextrinas homogéneas. Las amilasas están implicadas en el proceso para producir maltodextrinas homogéneas. Las maltodextrinas homogéneas se pueden usar en una amplia variedad de alimentos, medicamentos y aplicaciones de revestimiento. Las maltodextrinas homogéneas producidas tienen una distribución de PM homogénea y se pueden usar en una variedad de productos que contienen maltodextrina, dando como resultado una viscosidad inferior, soluciones claras (sin niebla), mejores propiedades de recubrimiento, mejores propiedades de formación de película y similares. Véase, por ejemplo, la WO 2004/091544.

50 [0160] Procesos de antiendurecimiento de productos horneados. El endurecimiento de un producto horneado, por ejemplo pan, se debe a cambios indeseable para el consumidor en las propiedades del producto horneado, tal como un aumento de la firmeza de la miga, una reducción de la elasticidad de la miga y cambios en la corteza, que se pone dura y correosa. Se utilizan amilasas maltogénicas para retardar el endurecimiento. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. números 6.197.352, 2.615.810 y 3.026.205; Silberstein, 1964, Baker's Digest 38: 66- 72.

55 [0161] Goma de fibra de maíz. Se puede producir goma de fibra de maíz de alta calidad por tratamiento de fibra de maíz con una amilasa seguido de tratamiento con peróxido de hidrógeno para obtener un extracto de fibra de maíz molido. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n° 6.147.206.

60 [0162] Piensos para animales y aditivos. El tratamiento de piensos para animales y aditivos con amilasas puede dar como resultado la liberación de azúcares de fácil digestión y fácil absorción, aumentando así la capacidad digestiva de animales y pájaros. Se puede añadir amilasa como aditivos alimenticios para animales o los piensos para animales se pueden tratar con amilasas antes del consumo animal. Véase, por ejemplo, la WO 2004/091544.

65 [0163] Tratamiento de papel o de pulpa. Se pueden utilizar amilasas para modificar el almidón de la pulpa o el papel convirtiéndolo así en una forma licuada. Véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. números 6.241.849, 6.066.233 y 5.582.681. También se pueden usar amilasas en la producción de materiales lignocelulósicos tales como pulpa, papel y cartón, y a partir de cartón y papel de desecho reforzado con almidón (las amilasas facilitan la desintegración del

material de residuo a través de la degradación del almidón de refuerzo). Las amilasas pueden ser útiles en un proceso para producir una pasta de fabricación de papel a partir de papel impreso revestido de almidón. Véase, por ejemplo, la WO 95/14807.

5 [0164] Destintado de pulpa de papel reciclado. Los procesos de destintado implican la desintegración del papel para producir una pulpa, tratamiento con una enzima de degradación de almidón antes, durante o después de la desintegración, y separación de partículas de tinta de la pulpa después de la desintegración y el tratamiento enzimático. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n° 6.309.871.

10 [0165] Tratamiento de desechos. Las amilasas se pueden usar en el tratamiento de desechos. En un proceso de digestión de residuos sólidos, los residuos sólidos se pueden tratar con amilasas para reducir la masa y el volumen de los residuos sólidos. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n° 5.709.796.

15 [0166] Productos de cuidado bucal. Se pueden usar amilasas en productos de cuidado bucal. Productos de cuidado bucal a modo de ejemplo incluyen pastas dentales, cremas dentales, geles o polvos dentales, elementos odontológicos, enjuagues bucales, formulaciones de enjuague pre- o post-cepillado, gomas de mascar, grajeas o caramelos. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n° 6.264.925.

20 [0167] Operaciones de perforaciones de pozos y mineras. Las amilasas se pueden usar en operaciones de perforación y pozos, por ejemplo, gas, petróleo, etc. Por ejemplo, las amilasas se utilizan para aumentar el flujo de producción de fluidos desde una formación subterránea y para eliminar fluidos viscosos que contienen almidón que pueden ser dañinos para operaciones de producción. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n° 6.581.687.

25 [0168] Elaboración de cerveza. Se pueden utilizar amilasas en el proceso de elaboración de cerveza (por ejemplo, fermentación). Las materias primas que contienen almidón se desintegran y procesan para formar malta. La acción de la amilasa produce un aumento de los azúcares reductores fermentables. Véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. números 5.762.991, 5.536.650, 5.405.624, 5.021.246, 4.788.066.

Enzimas amilolíticas

30 [0169] Al poner en práctica los procesos de la presente invención, esa una o más (diferentes) enzimas amilolíticas pueden ser una alfa-amilasa, una amiloglucosidasa, una alfa-amilasa maltogénica, una beta-amilasa, una pululanasa o combinaciones de las mismas.

35 [0170] Alfa-amilasas. La alfa-amilasa puede ser cualquier alfa-amilasa útil en los procesos de la presente invención. En un aspecto, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, por ejemplo, una alfa-amilasa ácida fúngica o una alfa-amilasa ácida bacteriana. El término "alfa-amilasa ácida" se refiere a una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que tiene actividad óptima en un pH en el rango de preferiblemente 3 a 7, más preferiblemente de 3,5 a 6 y de la forma más preferible de 4 a 5.

40 [0171] Una alfa-amilasa bacteriana se deriva preferiblemente del género *Bacillus*. En un aspecto preferido, la alfa-amilasa de *Bacillus* se deriva de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* o *B. stearothermophilus*, pero también se puede derivar de otras especies de *Bacillus*. Ejemplos de alfa-amilasas incluyen alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (WO 99/19467), alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (WO 99/19467) y alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (WO 99/19467). En otro aspecto, la alfa-amilasa puede ser una enzima que tiene un grado de identidad de al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferido al menos 80%, más preferido incluso al menos 90%, tal y como al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% para cualquiera de las secuencias mostradas en la WO 99/19467.

50 [0172] Una alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrido, tal como las variantes e híbridos descritos en la WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059 y WO 02/10355. Ejemplos de otra variantes de alfa-amilasa se describen en las patentes de EE. UU. números 6.093.562, 6.297.038 y 6.187.576. Las variantes incluyen variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (alfa-amilasa de BSG) que tienen una eliminación de uno o dos aminoácidos en las posiciones R179 a G182, preferiblemente una eliminación doble descrita en la WO 1996/023873 (véase, por ejemplo, página 20, líneas 1-10), preferiblemente correspondiente a delta(181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa de tipo salvaje de BSG descrita en la WO 99/19467 o eliminación de los aminoácidos R179 y G180 según la WO 99/19467. Incluso más preferidas son las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente las alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus*, que tienen una eliminación doble que se corresponde con delta(181-182) y además comprenden una sustitución N193F (también denominada I181\* + G182\* + N193F) en comparación con la alfa-amilasa de BSG de tipo salvaje descrita en la WO 99/19467.

60 [0173] La alfa-amilasa también puede ser una alfa-amilasa híbrida. En un aspecto, la alfa-amilasa híbrida comprende 445 residuos de aminoácidos de C-terminal de la amilasa alfa de *Bacillus licheniformis* (WO 99/19467) y los 37 residuos de aminoácidos de N-terminal de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (WO 99/19467), con una o más (diferentes), especialmente todas, de las siguientes sustituciones: G48A + T49I + G107A + H156Y + A181T + N 190F + I201 F + A209V + Q264S (utilizando la numeración de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* descrita en la WO 99/19467). También se prefieren variantes que tienen una o más (diferentes) de las siguientes mutaciones (o

mutaciones correspondientes en otra estructura de alfa-amilasa de *Bacillus*): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o eliminación de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferiblemente eliminación de E178 y G179 (WO 99/19467).

5 [0174] La actividad de la alfa-amilasa se puede determinar usando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición de almidón de patata modificado por la enzima y la reacción está seguida de muestras de mezcla de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo. Inicialmente, se forma un color azul negruzco, pero durante la descomposición del almidón el color azul se hace más débil y gradualmente cambia a un marrón rojizo, que se compara con un vidrio coloreado estándar. Una Unidad Kilo Novo (KNU) de amilasa alfa se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (es decir, a 37°C +/- 0,05; 0,0003 M Ca<sup>2+</sup>; y pH 5,6) dextriniza 5260 mg de sustancia seca de almidón Merck Amylum soluble. Una carpeta EB-SM-0009.02/01 que describe este método analítico está disponible bajo pedido en Novozymes A/S, Dinamarca.

15 [0175] Una alfa-amilasa bacteriana se dosifica en una cantidad de 0,0005-5 KNU por g de DS (sólidos secos), preferiblemente 0,001-1 KNU por g DS, tal como alrededor de 0,050 KNU por g DS.

20 [0176] La alfa-amilasa también puede ser una alfa-amilasa fúngica. Las alfa-amilasas fúngicas incluyen alfa-amilasas obtenidas a partir de cepas del género *Aspergillus*, tales como, alfa-amilasas de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus kawachii*.

25 [0177] Una alfa-amilasa ácida preferida se obtiene a partir de una cepa de *Aspergillus niger*. En un aspecto preferido, la alfa-amilasa fúngica ácida es la alfa-amilasa descrita como "AMYA\_ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TeEMBL bajo el n° de registro P56271 y descrita en la WO 89/01969 (ejemplo 3). Una alfa-amilasa fúngica ácida disponible comercialmente derivada de *Aspergillus niger* es SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

30 [0178] Otras alfa-amilasas de tipo salvaje útiles incluyen las obtenidas de cepas de los géneros *Rhizomucor* y *Meripilus*, preferiblemente una cepa de *Rhizomucor pusillus* (WO 2004/055178) o *Meripilus giganteus*.

[0179] En un aspecto preferido, la alfa-amilasa se deriva de *Aspergillus kawachii* descrita por Kaneko *et al.*, 1996, J. Ferment. Bioeng. 81: 292-298, y además como EMBL #AB008370.

35 [0180] La alfa-amilasa fúngica también puede ser una enzima de tipo salvaje que comprenda un dominio de unión al almidón (SBD) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir, no híbrido), o una variante de la misma. En un aspecto, la alfa-amilasa de tipo salvaje se deriva de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

40 [0181] La alfa-amilasa también puede ser una alfa-amilasa híbrida fúngica. Ejemplos preferidos de alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen las descritas en la WO 2005/003311, solicitud de patente de EE. UU. 2005/0054071, o solicitud de patente de EE. UU. n° 2006/0148054. Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico (CD) de alfa-amilasa y un dominio/módulo de enlace de carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión al almidón, y opcionalmente un enlazador.

45 [0182] Ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas incluyen las descritas en las tablas 1-5 de la solicitud de patente de EE. UU. n° 2006/0148054, incluyendo una variante de alfa-amilasa de *Aspergillus oryzae* con un dominio catalítico JA118 y un SBD de *Athelia rolfsii* (solicitud de patente de EE. UU. n° 2006/0148054), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con un enlazador AMG y un SBD de *Athelia rolfsii* (solicitud de patente de EE. UU. n° 2006/0148054), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con un enlazador de glucoamilasa y un SBD de *Aspergillus niger* (que se describe en la tabla 5 de la solicitud de patente de EE. UU. n° 2006/0148054) o como V039 en la tabla 5 de la WO 2006/069290, y una alfa-amilasa de *Meripilus giganteus* con un enlazador de glucoamilasa y un SBD de *Athelia rolfsii* (solicitud de patente de EE. UU. n° 2006/0148054). Otras alfa-amilasas híbridas útiles son las catalogadas en las tablas 3, 4, 5 y 6 de la solicitud de patente de EE. UU. n° 2006/0148054 y la WO 2006/069290.

50 [0183] Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas incluyen las descritas en la solicitud de patente de EE. UU. 2005/0054071, incluyendo las descritas en la tabla 3 de la misma, tal como la alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con un enlazador de *Aspergillus kawachii* y un dominio de unión al almidón.

55 [0184] Composiciones comerciales preferidas que comprenden alfa-amilasa incluyen MYCOLASE™ de DSM (Gist Brocades); BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X, SAN™ SUPER y SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S); CLARASE™ L-40,000, DEX-LO™, SPEZYME™ FRED, SPEZYME™ AA, SPEZYME™ DELTA AA y SPEZYME XTRA™ (Genencor Int.); FUELZYME™ (Verenium Corp.); y la alfa-amilasa fúngica ácida conocida como SP288 disponible de Novozymes A/S.

60 [0185] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (Unidades de alfa-amilasa fúngica ácida), que se determinan con respecto a un estándar enzimático. Una AFAU se define como la cantidad de enzima que degrada 5,260 mg de sustancia seca de almidón por hora bajo condiciones estándar. Una carpeta EB-SM-0259.02/01 que describe este método analítico está disponible bajo pedido en Novozymes A/S, Dinamarca.

- [0186] Las Unidades de alfa-amilasa fúngica (FAU-F) se miden con respecto a un estándar enzimático de una resistencia declarada. Una carpeta (EB-SM-0216.02) que describe este método estándar está disponible bajo pedido en Novozymes A/S, Dinamarca.
- 5 [0187] En los procesos de la presente invención, se puede añadir una alfa-amilasa ácida en una cantidad de preferiblemente 0,1 a 10 AFAU/g DS, más preferiblemente de 0,10 a 5 AFAU/g DS y de la forma más preferible de 0,3 a 2 AFAU/g DS o preferiblemente de 0,001 a 1 FAU-F/g DS y más preferiblemente de 0,01 a 1 FAU-F/g DS.
- 10 [0188] Glucoamilasas. La glucoamilasa puede ser cualquier glucoamilasa útil en los procesos de la presente invención. La glucoamilasa se puede obtener a partir de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, un microorganismo o una planta. Las glucoamilasas preferidas son de origen bacteriano o fúngico. Ejemplos de glucoamilasa fúngica son glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular, glucoamilasa G1 o G2 de *A. niger* (Boel *et al.*, 1984, EMBO J. 3: 1097-1102) o variantes de las mismas, tal como las descritas en la WO 92/00381, WO 00/04136 y WO 01/04273; glucoamilasa de *A. awamori* descrita en la WO 84/02921, glucoamilasa de *A. oryzae* (Hata *et al.*, 1991, Agric. Biol. Chem. 55: 941-949) o variantes o fragmentos de las mismas. Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes con termoestabilidad mejorada: G137A y G139A (Chen *et al.*, 1996, Prot. Eng. 9: 499-505); D257E y D293E/Q (Chen *et al.*, 1995, Prot. Eng. 8: 575-582); N182 (Chen *et al.*, 1994, Biochem. J. 301: 275-281); enlaces de disulfuro, A246C (Fierobe *et al.*, 1996, Biochemistry 35: 8698-8704) e introducción de residuos Pro en la posición A435 y S436 (Li *et al.*, 1997, Protein Eng. 10: 1199-1204).
- 15 20 [0189] Otras glucoamilasas útiles incluyen glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (previamente denominada *Corticium rolfsii*) (véase la patente de EE. UU. n° 4.727.026 y Nagasaka *et al.*, 1998, Appl. Microbiol. Biotechnol. 50:323-330), glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular, glucoamilasas obtenidas a partir de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente de EE. UU. n° Re. 32.153), *Talaromyces duponti* y *Talaromyces thermophilus* (patente de EE. UU. n° 4.587.215).
- 25 [0190] Otras glucoamilasas bacterianas útiles incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135.138) y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831) y *Trametes cingulata* descritas en la WO 2006/069289.
- 30 [0191] También se pueden usar glucoamilasas híbridas en los procesos de la presente invención. Ejemplos de glucoamilasas híbridas se describen en la WO 2005/045018. Ejemplos específicos incluyen las glucoamilasas híbridas descritas en las tablas 1 y 4 del ejemplo 1.
- 35 [0192] Composiciones disponibles comercialmente que comprenden glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SAN<sup>™</sup> SUPER, SAN<sup>™</sup> EXTRA L, SPIRIZYME<sup>™</sup> PLUS, SPIRIZYME<sup>™</sup> FUEL, SPIRIZYME<sup>™</sup> B4U, SPIRIZYME ULTRA<sup>™</sup> y AMG<sup>™</sup> E (de Novozymes A/S); OPTIDEX<sup>™</sup> 300, GC480<sup>™</sup> y GC147<sup>™</sup> (de Genencor Int.); AMIGASE<sup>™</sup> y AMIGASE<sup>™</sup> PLUS (de DSM); y G-ZYME<sup>™</sup> G900, G-ZYME<sup>™</sup> y G990 ZR (de Genencor).
- 40 [0193] La unidad Novo de glucoamilasa (AGU) se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo condiciones estándar de 37°C, pH 4,3, usando 23,2 mM de maltosa como sustrato en 0,1 M de tampón de acetato durante un tiempo de reacción de 5 minutos. Se puede utilizar un sistema autoanizador donde se añade mutarotasa al reactivo de glucosa deshidrogenasa de modo que cualquier alfa-D-glucosa presente se convierta en beta-D-glucosa. La glucosa deshidrogenasa reacciona específicamente con beta-D-glucosa en la reacción mencionada anteriormente, formando NADH que se determina en 340 nm como medida de la concentración de glucosa original. Una carpeta (EB-SM-0131.02/01) que describe este método analítico está disponible bajo pedido en Novozymes A/S, Dinamarca.
- 45 [0194] Las glucoamilasas se añaden preferiblemente en una cantidad de 0,0001-20 AGU/g DS, más preferiblemente 0,001-10 AGU/g DS, 0,02-10 AGU/g DS, más preferiblemente 0,1-10 AGU/g DS, incluso más preferiblemente 0,1-5 AGU/g DS, y de la forma más preferible 0,1-2 AGU/g DS, incluso.
- 50 [0195] Beta-amilasas. Las beta-amilasas pueden ser cualquier beta-amilasa útil en los procesos de la presente invención. Beta-amilasas se han aislado de plantas y microorganismos varios (W.M. Fogarty and C.T. Kelly, 1979, Progress in Industrial Microbiology 15: 112-115). Estas beta-amilasas se caracterizan por el hecho de que tienen temperaturas óptimas en el rango de 40°C a 65°C y un pH óptimo en el rango de 4,5 a 7. Las beta-amilasas disponibles comercialmente son NOVOZYM<sup>™</sup> WBA de Novozymes A/S, Dinamarca y SPEZYME<sup>™</sup> BBA 1500 de Genencor Int., EE. UU.
- 55 [0196] Una Unidad de beta-amilasa (BAMU) se define como la cantidad de enzima que degrada un μmol de maltohexosa por minuto, o se define como la actividad presentada por 1 mg de enzima de beta-amilasa pura. Una BAMU se define con respecto a la BAMU de una enzima estándar. Una carpeta (EB-SM- 0516.02/01) que describe este método analítico está disponible en la solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca.
- 60 [0197] Alfa-amilasas maltogénicas. La alfa-amilasa maltogénica puede ser cualquier alfa-amilasa maltogénica útil en los procesos de la presente invención. Alfa-amilasas maltogénicas (glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa, E.C. 3,2,1,133)
- 65

hidrolizan amilosa y amilopectina en maltosa en la alfa-configuración. Una amilasa maltogénica de la cepa NCIB 11837 de *Bacillus stearothermophilus* está comercialmente disponible en Novozymes A/S. Alfa-amilasas maltogénicas se describen en las patentes de EE. UU. números 4.598.048, 4.604.355 y 6.162.628.

5 [0198] Una MANU (Unidad Novo de amilasa maltogénica) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar un micromol de maltosa por minuto en una concentración de 10 mg de sustrato de maltotriosa (Sigma M 8378; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.) por ml de 0,1 M tampón de citrato pH 5,0 a 37°C durante 30 minutos.

10 [0199] La amilasa maltogénica se añade preferiblemente en una cantidad de 0,05-5 mg proteína/gramo total DS o 0,05-5 MANU/g DS.

15 [0200] Pululanasa. La pululanasa puede ser cualquier pululanasa útil en los procesos de la presente invención. Pululanasa (E.C. 3,2,1,41), también conocidas como pululano-6-glucanohidrolasa, degradan enlaces alfa-1,6 de pululano, amilopectina y otros sustratos ramificados. En la industria del grano, las pululanasa bacterianas se han usado para la eliminación de enlaces alfa-1,6 en el almidón, que pueden provocar la formación indeseable de panosa en el proceso de sacarificación.

20 [0201] Se conocen varias pululanasa bacterianas. Kelly *et al.*, 1994, FEMS Microbiology Letters 115: 97-106, describen el gen B de pululanasa de *Bacillus acidopulluliticus*. La WO 96/35794 describe una pululanasa de la especie *Bacillus*.

[0202] Ejemplos de productos de pululanasa comerciales que se pueden usar en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, DEXTROZYME<sup>®</sup>, PROMOZYME<sup>®</sup> D2 y ATTENUZYME<sup>®</sup> de Novozymes A/S.

25 [0203] La actividad de la pululanasa se puede determinar con respecto a un sustrato de pululano. El pululano es un polímero de D-glucosa lineal que consiste esencialmente en unidades de maltotriosil unidas por enlaces 1,6-alfa. Las endo-pululanasa hidrolizan los enlaces 1,6-alfa al azar, liberando maltotriosa, 6<sup>3</sup>-alfa-maltotriosil-maltotriosa, 6<sup>3</sup>-alfa-(63-alfa-maltotriosil-maltotriosil)-maltotriosa. Una Unidad Novo de pululanasa nueva (NPUN) es una unidad de actividad de endo-pululanasa y se mide con respecto a un PROMOZYME de Novozyme A/S estándar. Condiciones estándar son 30 minutos de tiempo de reacción a 40°C y pH 4,5 y con 0,7% de pululano como sustrato. La cantidad de producto de degradación de sustrato rojo se mide espectrofotométricamente en 510 nm y es proporcional a la actividad de la endo-pululanasa de la muestra. Una NPUN iguala la cantidad de enzima que bajo las condiciones estándar libera carbohidratos reductores con un equivalente de poder reductor a 2,86 micromoles de glucosa por minuto.

35 [0204] La pululanasa se añade preferiblemente en una cantidad de 0,05-5 NPUN/g DS.

40 [0205] En los procesos de la presente invención, el polipéptido que tiene actividad amilolítica potenciadora y otras proteína(s) amilolíticas se pueden suplementar por una o más (diferentes) actividades enzimáticas adicionales para mejorar la degradación del material que contiene almidón. Las enzimas adicionales preferidas son celulasas, hemicelulasas, esterasas (p. ej., lipasas, fosfolipasas y/o cutinasas), proteasas, lacasas, peroxidasa o mezclas derivadas.

[0206] En los procesos de la presente invención, la enzima o enzimas adicionales se pueden añadir antes o durante la fermentación, incluyendo durante o después de la propagación del microorganismo o microorganismos de fermentación.

45 [0207] En los procesos de la presente invención, las cantidades óptimas de un polipéptido que tiene actividad amilolítica potenciadora y enzima o enzimas amilolíticas dependen de diferentes factores incluyendo, pero no limitados a, la mezcla de enzimas amilolíticas, el material que contiene almidón, la concentración de material que contiene almidón, temperatura, tiempo y pH.

50 [0208] En un aspecto, la cantidad de polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica por g de material que contiene almidón es preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg, más preferiblemente aproximadamente de 0,1 a aproximadamente 20 mg y de la forma más preferible de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg por g de material que contiene almidón.

55 [0209] En otro aspecto, la cantidad de polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica por g de enzima o enzimas amilolíticas es preferiblemente aproximadamente de 0,005 a aproximadamente 20 g, más preferiblemente aproximadamente de 0,05 a aproximadamente 20 g, y de la forma más preferible aproximadamente de 0,5 a aproximadamente 10 g por g de enzima o enzimas amilolíticas.

60 Fermentación

65 [0210] Los azúcares fermentables obtenidos del material que contiene almidón pueden ser fermentados por uno o más microorganismos fermentativos capaces de fermentar los azúcares directa o indirectamente en un producto de fermentación deseado. "Fermentación" o "proceso de fermentación" se refiere a cualquier proceso de fermentación o cualquier proceso que comprenda un paso de fermentación. Procesos de fermentación también incluyen procesos de fermentación usados en la industria del alcohol de consumo (p. ej., cerveza y vino), la industria lechera (p. ej., productos

lácteos fermentados), la industria del cuero y la industria del tabaco. Las condiciones de fermentación dependen del producto de fermentación deseado y del organismo fermentador y pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la técnica.

5 [0211] En el paso de fermentación, azúcares, liberados del material que contiene almidón como resultado de la hidrólisis enzimática, se fermentan en un producto de fermentación por un organismo fermentador, tal como la levadura. La fermentación puede también efectuarse simultáneamente con la sacarificación enzimática en el mismo vaso, nuevamente bajo pH, temperatura y condiciones de mezcla controlados. Cuando la sacarificación y la fermentación se realizan simultáneamente en el mismo vaso, el proceso se denomina generalmente sacarificación simultánea y fermentación o SSF.

10 [0212] Se puede utilizar cualquier material que contenga almidón adecuado en un proceso de fermentación de la presente invención. El sustrato se selecciona generalmente basado en el producto de fermentación deseado, es decir, el producto de fermentación que se va a obtener de la fermentación, y el proceso empleado, como bien se conoce en la técnica.

15 [0213] El término "medio de fermentación" se refiere a un medio antes de añadir el microorganismo o microorganismos de fermentación, tal como, un medio que resulta de un proceso de sacarificación, al igual que un medio usado en una sacarificación simultánea y un proceso de fermentación (SSF).

20 [0214] "Microorganismo de fermentación" se refiere a cualquier microorganismo adecuado para su uso en un proceso de fermentación deseado. Los microorganismos fermentativos adecuados pueden fermentar, es decir, convertir, azúcares, tales como glucosa, maltosa o maltodextrinas directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado.

25 [0215] Ejemplos de etanol de producción de organismos fermentativos fúngicos y bacterianos son descritos por Lin *et al.*, 2006, Appl. Microbiol. Biotechnol. 69: 627-642.

30 [0216] Ejemplos de microorganismos fermentativos que pueden fermentar azúcares C6 incluyen organismos fúngicos y bacterianos, tales como levadura. La levadura preferida incluye cepas de la *Saccharomyces spp.*, preferiblemente *Saccharomyces cerevisiae*.

35 [0217] En un aspecto preferido, la levadura es una *Saccharomyces spp.* En un aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces distaticus*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Saccharomyces uvarum*. En otro aspecto preferido, la levadura es un *Kluyveromices*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Kluyveromices marxianus*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Kluyveromices fragilis*. En otro aspecto preferido, la levadura es una *Candida*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida boidinii*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida brassicae*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida diddensii*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida pseudotropicalis*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Candida utilis*. En otro aspecto preferido, la levadura es una *Clavispora*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Clavispora lusitaniae*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Clavispora opuntiae*. En otro aspecto preferido, la levadura es un *Pachysolen*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Pachysolen tannophilus*. En otro aspecto preferido, la levadura es un *Pichia*. En otro aspecto más preferido, la levadura es una *Pichia stipitidis*. En otro aspecto preferido, la levadura es un *Bretannomyces*. En otro aspecto más preferido, la levadura es *Bretannomyces clausenii* (Philippidis, G. P., 1996, Cellulose bioconversion technology, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212).

45 [0218] Bacterias que pueden fermentar de forma eficaz hexosa a etanol incluyen, por ejemplo, *Zymomonas mobilis* y *Clostridium thermocellum* (Philippidis, 1996, *supra*).

50 [0219] En un aspecto preferido, la bacteria es *Zymomonas*. En un aspecto más preferido, la bacteria es *Zymomonas mobilis*. En otro aspecto preferido, la bacteria es un *Clostridium*. En otro aspecto más preferido, la bacteria es *Clostridium thermocellum*.

55 [0220] Levadura disponible comercialmente adecuada para la producción de etanol incluye, por ejemplo, levadura ETHANOL RED™ (disponible de Fermentis/Lesaffre, EE. UU.), FALI™ (disponible de Fleischmann's Yeast, EE. UU.), levadura fresca SUPERSTART™ y THERMOSACC™ (disponible de Ethanol Technology, WI, EE. UU.), BIOFERM™ AFT y XR (disponible de NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, EE. UU.), GERT STRAND™ (disponible de Gert Strand AB, Suecia) y FERMIOL™ (disponible de DSM Specialties).

60 [0221] El microorganismo fermentador se añade típicamente al material que contiene almidón degradado o hidrolizado y la fermentación se realiza durante aproximadamente 8 a aproximadamente 96 horas, tal como aproximadamente 24 a aproximadamente 60 horas. La temperatura es típicamente entre aproximadamente 26°C a aproximadamente 60°C, en particular aproximadamente 32°C o 50°C y en alrededor de pH 3 a alrededor de pH 8, tal como alrededor de pH 4-5, 6 o 7.

65

[0222] En un aspecto preferido, la levadura y/u otro microorganismo se aplica al material que contiene almidón degradado y la fermentación se realiza durante aproximadamente 12 a aproximadamente 96 horas, tal como típicamente 24-60 horas. En un aspecto preferido, la temperatura es preferiblemente entre aproximadamente 20°C a aproximadamente 60°C, más preferiblemente aproximadamente 25°C a aproximadamente 50°C, y de la forma más preferible aproximadamente 32°C a aproximadamente 50°C, en particular aproximadamente 32°C o 50°C, y el pH es generalmente de aproximadamente pH 3 a aproximadamente pH 7, preferiblemente alrededor de pH 4-7. No obstante, algunos organismos fermentativos, por ejemplo, bacterias, tienen temperatura de fermentación óptima más alta. Levadura u otro microorganismo se aplican preferiblemente en cantidades de aproximadamente  $10^5$  a  $10^{12}$ , preferiblemente de aproximadamente  $10^7$  a  $10^{10}$ , especialmente aproximadamente  $2 \times 10^8$  de recuento de células viables por ml de caldo de fermentación. Más información sobre el uso de levadura para la fermentación se puede encontrar en, por ejemplo, "The Alcohol Textbook" (Editors K. Jacques, T.P. Lyons and D.R. Kelsall, Nottingham University Press, United Kingdom 1999).

[0223] Para la producción de etanol, tras la fermentación el lodo fermentado se destila para extraer el etanol. El etanol obtenido según los métodos de la invención se puede usar como, por ejemplo, etanol combustible, etanol potable, es decir, licores neutros potables, o etanol industrial.

[0224] Un estimulador de fermentación se puede usar en combinación con cualquiera de los procesos descritos aquí para mejorar más el proceso de fermentación, y en particular, el rendimiento del microorganismo fermentador, tal como, mejora de la tasa y rendimiento de etanol. Un "estimulador de fermentación" se refiere a estimuladores para el crecimiento de los microorganismos fermentativos, en particular, levadura. Estimuladores de fermentación preferidos para el crecimiento incluyen vitaminas y minerales. Ejemplos de vitaminas incluyen multivitaminas, biotina, pantotenato, ácido nicotínico, meso-inositol, tiamina, piridoxina, ácido para-aminobenzoico, ácido fólico, riboflavina y vitaminas A, B, C, D y E. Véase, por ejemplo, Alfenore *et al.*, Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process, Springer-Verlag (2002). Ejemplos de minerales incluyen minerales y sales minerales que puedan suministrar nutrientes incluyendo P, K, Mg, S, Ca, Fe, Zn, Mn y Cu.

[0225] Productos de fermentación: un producto de fermentación pueden ser cualquier sustancia derivada de la fermentación. El producto de fermentación puede ser, sin limitación, un alcohol (p. ej., arabinol, butanol, etanol, glicerol, metanol, 1,3-propanodiol, sorbitol y xilitol); un ácido orgánico (p. ej., ácido acético, ácido acetónico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 2,5-diqueto-D-glucónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucárico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutárico, ácido 3-hidroxiopropiónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido propiónico, ácido succínico y ácido xilónico); una cetona (p. ej., acetona); un aminoácido (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina y treonina); y un gas (p. ej., metano, hidrógeno (H<sub>2</sub>), dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y monóxido de carbono (CO)). El producto de fermentación puede ser también proteína como un producto de valor alto.

[0226] En un aspecto preferido, el producto de fermentación es un alcohol. Se entiende que el término "alcohol" abarca una sustancia que contiene una o más fracciones de hidroxilo. En un aspecto más preferido, el alcohol es arabinol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es butanol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es etanol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es glicerol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es metanol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es 1,3-propanodiol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es sorbitol. En otro aspecto más preferido, el alcohol es xilitol. Véase, por ejemplo, Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., and Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241; Silveira, M. M., and Jonas, R., 2002, The biotechnological production of sorbitol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 400-408; Nigam, P., and Singh, D., 1995, Processes for fermentative production of xylitol - a sugar substitute, *Process Biochemistry* 30 (2): 117-124; Ezeji, T. C., Qureshi, N. and Blaschek, H. P., 2003, Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and in situ recovery by gas stripping, *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 19 (6): 595-603.

[0227] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es un ácido orgánico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido acético. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido acetónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido adípico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido ascórbico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido cítrico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido 2,5-diqueto-D-glucónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido fórmico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido fumárico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glucárico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glucónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glucurónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido glutárico. En otro aspecto preferido, el ácido orgánico es ácido 3-hidroxiopropiónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido itacónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido láctico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido málico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido malónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido oxálico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido propiónico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido succínico. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido xilónico. Véase, por ejemplo, Chen, R., and Lee, Y. Y., 1997, Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65: 435-448.

- 5 [0228] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es una cetona. Se entiende que el término "cetona" abarca una sustancia que contiene una o más fracciones de cetona. En otro aspecto más preferido, la cetona es acetona. Véase, por ejemplo, Qureshi and Blaschek, 2003, *supra*.
- 10 [0229] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es un aminoácido. En otro aspecto más preferido, el ácido orgánico es ácido aspártico. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es ácido glutámico. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es glicina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es lisina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es serina. En otro aspecto más preferido, el aminoácido es treonina. Véase, por ejemplo, Richard, A., and Margaritis, A., 2004, Empirical modeling of batch fermentation kinetics for poly(glutamic acid) production and other microbial biopolymers, *Biotechnology and Bioengineering* 87 (4): 501-515.
- 15 [0230] En otro aspecto preferido, el producto de fermentación es un gas. En otro aspecto más preferido, el gas es metano. En otro aspecto más preferido, el gas es H<sub>2</sub>. En otro aspecto más preferido, el gas es CO<sub>2</sub>. En otro aspecto más preferido, el gas es CO. Véase, por ejemplo, Kataoka, N., A. Miya, and K. Kiriya, 1997, Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria, *Water Science and Technology* 36 (6-7): 41-47; and Gunaseelan V.N. in *Biomass and Bioenergy*, Vol. 13 (1-2), pp. 83-114, 1997, Anaerobic digestion of biomass for methane production: A review.
- 20 [0231] Recuperación. El producto o productos de fermentación se pueden recuperar opcionalmente del medio de fermentación utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero de forma no limitativa, cromatografía, procedimientos electroforéticos, solubilidad diferencial, destilación o extracción. Por ejemplo, el alcohol se separa del material fermentado y purificado por métodos convencionales de destilación. Se puede obtener etanol con una pureza de hasta aproximadamente 96 vol.%, que se puede usar como, por ejemplo, etanol combustible, etanol potable, es decir, licores neutros potables, o etanol industrial.

### Ejemplos

- 30 [0232] Los productos químicos que se usaron como tampones y los sustratos fueron productos comerciales de al menos calidad reactiva.

#### Cepas

- 35 [0233] La cepa JaL250 de *Aspergillus oryzae* (WO 99/61651) se usó para la expresión del polipéptido de *Neurospora crassa* que tiene actividad potenciadora amilolítica. La cepa JaL355 de *Aspergillus oryzae* (WO 2005/070962) se usó para la expresión del polipéptido de *Aspergillus nidulans* que tiene actividad potenciadora amilolítica. La cepa BECh2 de *Aspergillus oryzae* (WO 2000/039322) se usó para la expresión del polipéptido de *Aspergillus oryzae* que tiene actividad potenciadora amilolítica.

#### Medios

- [0234] Se compusieron placas de PDA de 39 gramos de agar de dextrosa de patata y agua desionizada a 1 litro.
- 45 [0235] Medio mínimo + placas de sacarosa se compusieron por litro de 6 g de NaNO<sub>3</sub>, 0,52 g de KCl, 1,52 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 ml de solución de oligoelementos COVE y 342,3 g de sacarosa; el pH se ajustó a 6,5 con un 1 N de solución NaOH y luego 20 g de Agar Noble se añadieron. La suspensión se sometió luego a autoclave y se dejó enfriar a 55°C antes de añadir 20 ml de una solución de glucosa al 50%, 20 ml de solución de biotina al 0,02% y 25 ml de una solución MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O al 20% antes hacer las placas.
- 50 [0236] Se compuso la solución de oligoelementos CPVE de 0,04 g de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 0,4 g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1,2 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,7 g de MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,8 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10 g de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y agua desionizada a 1 litro.
- [0237] Se compuso el medio MDU2BP de 45 g de maltosa, 1 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1 g de NaCl, 2 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g de urea, 500 µl de solución de metales traza AMG y agua desionizada a 1 litro; el pH se ajustó a 5,0 y luego se esterilizó por filtro con una unidad de filtración de 0,22 µm.
- [0238] Medio YPM se compuso por 10 g de extracto de levadura, 20 g de bacto-peptona, 20 g de maltosa y agua desionizada a 1 litro.
- 60 [0239] Medio YP se compuso por 10 g de extracto de levadura, 20 g de bacto-peptona y agua desionizada a 1 litro.
- [0240] Medio YEG se compuso por 5 g de extracto de levadura, 20 g de dextrosa y agua desionizada a 1 litro.
- 65 [0241] Solución de metales traza AMG se compuso por 14,3 g de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2,5 g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,5 g de NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 13,8 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 8,5 g de MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3 g de ácido cítrico y agua desionizada a 1 litro.

- [0242] Medio SOC se compuso por 2% de triptona, 0,5% de extracto de levadura, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MLCI<sub>2</sub> y 10 mM de MgSO<sub>4</sub>; esterilizado por autoclave y luego la glucosa esterilizada por filtro se añadió a 20 mM.
- 5 [0243] STC se compuso por 1 M de sorbitol, 50 mM de Tris-HCl pH 6,5 y 50 mM de CaCl<sub>2</sub>.
- [0244] Solución PEG se compuso por 50% (p/v) PEG 4000, 50 mM Tris-HCl pH 6,5 y 50 mM CaCl<sub>2</sub>.
- 10 [0245] Medio de selección COVE se compuso por 342,3 g de sacarosa, 20 ml de solución de sales COVE, 10 mM de acetamida, 0,03 M de CsCl, 30 g de agar noble y agua desionizada a 1 litro.
- [0246] Agarosa superior COVE se compuso por 342,3 g de sacarosa, 20 ml de solución de sales COVE, 10 mM de acetamida, 0,03 M de CsCl, 10 g de agarosa de fusión baja y agua desionizada a 1 litro.
- 15 [0247] COVE-2 se compuso por 30 g de sacarosa, 20 ml de solución de sales COVE, 10 mM de acetamida, 30 g de agar noble y agua desionizada a 1 litro.
- [0248] Solución de sales COVE se compuso por 26 g de KCl, 26 g de MgSO<sub>4</sub>, 76 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 ml de solución de metales traza COVE y agua desionizada a 1 litro.
- 20 [0249] COVE-N-gly se compuso por 218 g de sorbitol, 10 g de glicerol, 2,02 g de KNO<sub>3</sub>, 50 ml de solución de sales COVE, 25 g de agar BA10 y agua desionizada a 1 litro.
- [0250] Medio MLC se compuso por 40 g de glucosa, 50 g de polvo de soja, 4 g de ácido cítrico, unas gotas de ácido plurónico y agua desionizada a 1 litro; el pH se ajustó a 5,0.
- 25 [0251] Medio MSS se compuso por 70 g de glucosa, 100 g de polvo de soja, unas gotas de ácido plurónico y agua desionizada a 1 litro; el pH se ajustó a 6,0.
- 30 [0252] Medio MU-1 se compuso por 260 g de dextrina de malta, 3 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 6 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, unas gotas de ácido plurónico y agua desionizada a 1 litro; el pH se ajustó a 4,5.
- [0253] MU1-MLC/MSS fue una mezcla de 1000 ml de medio MU-1, 40 ml de 50% urea, 100 ml de medio MLC y 100 ml de medio MSS.
- 35 [0254] Medio M410 se compuso por 50 g de glucosa, 50 g de maltosa, 2 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 g de ácido cítrico, 8 g de extracto de levadura, 2 g de urea, 0,5 g de CaCl<sub>2</sub>, 0,5 ml de AMG solución de metales traza y agua desionizada a 1 litro; pH a 6,0 con hidróxido sódico; filtro estéril a través de una membrana de 0,22 µm.
- 40

### Ejemplo 1: aislamiento de ADN genómico de *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*

- [0255] *Neurospora crassa* se obtuvo del Fungal Genetics Stock Center (Kansas City, MO, EE. UU.) como FGSC 2489 y se mantuvo en placas de PDA. Cien ml de medio YEG en un matraz de 500 ml se inocularon con un tapón de agarosa de una placa de PDA y se dejaron crecer durante 2 días a 34°C con agitación a 200 r.p.m. Se cosechó la biomasa sobre un prefiltro de fibra de vidrio Nalgene 281-5000 (Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, EE. UU.), enjuagado exhaustivamente con 10 mM de Tris-0,1 mM de EDTA pH 7,4 (TE), congelado en nitrógeno líquido y se molió hasta hacer polvo con un mortero y una mano de mortero. Unos gramos de polvo se suspendieron en 20 ml de 20 mM CAPS-NaOH pH 11,0, 0,5% de LDS, 1 mM de EDTA y se incubaron a 60°C durante 60 minutos con mezcla periódica por inversión. Un volumen igual de neutralizado fenol:cloroformo (1:1) se añadió y la extracción se continuó durante 2 horas en cámara 37°C con mezcla continua en un agitador Belly Dancer (Fotodyne Incorporated, Hartland WI, EE. UU.). Después del centrifugado a 1300 x g durante 10 minutos en un rotor de cubo oscilante, la fase acuosa se retiró y se volvió a extraer por agitación breve con neutralizado fenol:cloroformo (1:1). El centrifugado se repitió y la fase acuosa se llevó a 2,5 M de acetato amónico, congelado, descongelado y centrifugado a 13.000 x g durante 20 minutos a 6°C. Al sobrenadante se le añadió un 0,7 volumen de isopropanol y los ácidos nucleicos precipitados se granularon por centrifugado a 17.000 x g durante 20 minutos. El granulado resultante se enjuagó dos veces con 70% de etanol, se secó al aire y se disolvió en 1,0 ml de 0,1X TE. ARN fue digerido por adición de 100 µg de ARNasa A (Promega, Madison, WI, EE. UU.) e incubación a temperatura ambiente durante 30 minutos. ADN fue precipitado y granulado por adición de acetato amónico a 2,0 M y 2 volúmenes de etanol seguido de centrifugado a 13.000 x g durante 15 minutos. El granulado fue enjuagado dos veces con 70% de etanol, secado al aire y disuelto en 0,75 ml de 0,1X TE.
- 45
- 50
- 55
- 60

- [0256] La cepa de tipo salvaje de *Aspergillus nidulans* se obtuvo del Fungal Genetics Stock Center (FGSC A1000; Kansas City, MO, EE. UU.) y se mantuvo en placas de PDA. Cien ml de medio YEG en un matraz de 500 ml se inocularon con un tapón de agarosa de una placa de PDA y se dejaron crecer durante 2 días a 37°C con agitación a 200 r.p.m. Se cosechó la biomasa en un prefiltro de fibra de vidrio Nalgene 281-5000, enjuagado exhaustivamente con TE, congelado en nitrógeno líquido y molido hasta obtener un polvo con un mortero y una mano de mortero. Unos gramos
- 65

de polvo se suspendieron en 30 ml de 10 mM de CAPS-NaOH pH 11,0, 0,5% LDS, 1 mM de EDTA, dividido en dos tubos de centrifugado de 50 ml, y se incubaron a 60°C durante 30 minutos con mezcla periódica por inversión. Un volumen igual de neutralizado fenol:cloroformo (1:1) se añadió y la extracción se continuó durante toda la noche a temperatura ambiente con mezcla continua en un agitador Belly Dancer. Después del centrifugado a 1300 x g durante 10 minutos en un rotor de cubo oscilante, la fase acuosa se retiró y se volvió a extraer por agitación breve con neutralizado fenol:cloroformo (1:1). El centrifugado se repitió y la fase acuosa se llevó a 2,5 M de acetato amónico, congelado, descongelado y centrifugado a 13,000 x g durante 20 minutos a 6°C. Al sobrenadante se añadió un 0,8 volumen de isopropanol y los ácidos nucleicos precipitados se granularon por centrifugado a 17.000 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. El granulado resultante se enjuagó tres veces con 70% de etanol, se secó al aire y se disolvió en 2,0 ml de 0,5X TE. ARN fue digerido por adición de 100 µg de ARNasa e incubación a 37°C durante 30 minutos. ADN fue precipitado por adición de acetato amónico a 2,0 M y 2 volúmenes de etanol seguido de centrifugado a 13,000 x g durante 15 minutos a 4°C. El granulado fue enjuagado tres veces con 70% de etanol, secado al aire y disuelto en 0,5 ml de 0,1X TE. Cuando estuvo completamente disuelto, KCl se añadió a una concentración final de 20 mM.

### 15 **Ejemplo 2: clonación de un polipéptido de *Neurospora crassa* que tiene gen (*aepA*) de actividad potenciadora amilolítica**

20 [0257] Basado en un gen previsto en la secuencia genómica de *Neurospora crassa* (nombre del gen B24N4.140), dos cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados más adelante fueron diseñados para amplificación por PCR de un gen *aepA* de *Neurospora crassa* del ADN genómico preparado en el ejemplo 1. Un equipo de clonación por PCR IN-FUSION™ (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE. UU.) se usó para clonar el fragmento directamente en el vector de expresión pALo2 (WO 2004/099228) sin necesidad de digestión de restricción y ligamiento.

25 NCB24N4140 sentido:

5'-ACTGGATTTACCATGAAGTTCTCCATCATCTCGGTT-3' (SEC ID n°: 7)

NCB24N4140 anti:

5'-TCACCTCTAGTTAATTAATACTTCCACGACGACTCAA-3' (SEC ID n°: 8)

Las letras en negrita representan secuencia codificante. La secuencia restante es homóloga a los sitios de inserción de pALo2.

30 [0258] Treinta picomoles de cada uno de los cebadores anteriores se usaron en una reacción de amplificación que contenía 400 ng de ADN genómico de *Neurospora crassa*, 1X Pfx de tampón de amplificación (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), 1,7 µl de una mezcla de 10 mM de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 2,5 unidades de polimerasa de ADN PLATINUM® Pfx (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) y 1 µl de 50 mM de MgSO<sub>4</sub> en un volumen final de 50 µl. La reacción de amplificación se incubó en un EPPENDORF® MASTERCYCLER® 5333 (Eppendorf Scientific, Inc., Westbury, NY, EE. UU.) programado durante 1 ciclo a 96°C durante 3 minutos; y 33 ciclos cada uno a 94°C durante 50 segundos, 60°C durante 50 segundos y 68°C durante 2 minutos. El bloque de calor luego fue a un ciclo de remojo a 4°C.

40 [0259] Los productos de reacción fueron aislados por 1,2% de electroforesis en gel de agarosa usando 40 mM de Tris base-20 mM de sodio acetato-1 mM tampón de EDTA disódico (TAE) donde una banda de producto de 1,3 kb se cortó del gel y se purificó utilizando un equipo de extracción en gel QIAQUICK® (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante.

45 [0260] El fragmento luego se clonó en el vector de expresión pALo2 utilizando un equipo de clonación por PCR IN-FUSION™. El vector fue digerido con *Nco* I y *Pac* I. El fragmento fue purificado por electroforesis en gel y un equipo de extracción en gel QIAQUICK® como por encima. El fragmento de gen y el vector digerido se incubaron juntos en una reacción que da como resultado el plásmido de expresión pPH48 (figura 1) donde la transcripción del gen *aepA* estaba bajo el control de un promotor NA2-tpi (un promotor modificado incluyendo el gen que codifica la alfa-amilasa neutra en *Aspergillus niger* en el que la guía sin traducir ha sido sustituido por una guía no traducida del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa en *Aspergillus nidulans*). La reacción IN-FUSION™ (50 µl) estaba compuesta por 1X tampón IN-FUSION™ (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE. UU.), 1X BSA (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE. UU.), 1 µl de enzima IN-FUSION™ (diluido 1:10) (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE. UU.), 150 ng de pALo2 digerido con *Nco* I y *Pac* I, y 50 ng del producto de PCR purificado *aepA* de *Neurospora crassa*. La reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 30 minutos. Un µl de la reacción se usó para transformar células XL10 SOLOPACK® Gold de *E. coli* (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU.). Un transformante de *E. coli* que contiene el plásmido pPH48 fue detectado por análisis de digestión de restricción y ADN plásmido se preparó utilizando un BIOROBOT® 9600 (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE. UU.).

### 60 **Ejemplo 3: caracterización del polipéptido de *Neurospora crassa* que tiene gen (*aepA*) de actividad potenciadora amilolítica**

65 [0261] Secuenciación del ADN del fragmento de PCR 1,3 kb fue realizada con un secuenciador de ADN automatizado Perkin-Elmer Applied Biosystems Modelo 377 XL (Perkin-Elmer/Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, EE. UU.) utilizando química de terminador de coloración (Giesecke *et al.*, 1992, Journal of Virology Methods 38: 47-60). Los siguientes cebadores de vector se usaron para la secuenciación:

795((TPI)sentido:

5'-CCACACTTCTCTTCCTTCCTC-3' (SEC ID nº: 9)

796antisentido:

5'-CCCCATCCTTTAACTATAGCG-3' (SEC ID nº: 10)

10 [0262] Los datos de la secuencia de nucleótidos se escrutaron para calidad y todas las secuencias se compararon entre sí con ayuda del software PHRED/PHRAP (University of Washington, Seattle, WA, EE. UU.). La secuencia se comparó y alineó con la secuencia de la base de datos original (EMBL ID CAE75704) y hubo un 100% de correspondencia.

15 [0263] Un modelo de gen para la secuencia de ADN genómico de *Neurospora crassa* fue construido basado en la similitud de la proteína codificada con las proteínas homólogas predichas en las bases de datos públicas. La secuencia de nucleótidos (SEC ID nº: 1) y secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID nº: 2) de la secuencia de ADN genómico de *N. crassa* se muestran en las figuras 2A y 2B. El fragmento genómico de 1276 pares de bases (incluyendo el codón de terminación) codifica un polipéptido de 385 aminoácidos, interrumpido por 2 intrones de 58 y 60 pares de bases. El % de contenido G+C del gen y la secuencia codificante madura son 57,4% y 59,1%, respectivamente. Un dominio de unión al almidón (familia de módulo de unión a los carbohidratos 20, número de acceso de Prosite PS51166) estaba presente desde aproximadamente los residuos 278 a 385 del pre-polipéptido. Usando el programa de software SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, Protein Engineering 10: 1-6), un péptido señal de 18 residuos se predijo. La proteína madura prevista contiene 367 aminoácidos con una masa molecular prevista de 39,2 kDa y un pI de 5,1.

25 [0264] Un alineamiento global por pares comparativo de secuencias de aminoácidos fue determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como implementado en el programa Needle de EMBOSS con penalización por abertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5, y la matriz EBLOSUM62. El alineamiento mostró que la secuencia de aminoácidos deducida del gen de *Neurospora crassa* que codifica el polipéptido maduro que tiene actividad potenciadora amilolítica compartía 99,7% y 97,8% de identidad (excluyendo espacios) con las secuencias de aminoácidos deducidas de dos polipéptidos hipotéticos previstos de *Neurospora crassa* (números de registro de UniProt Q6MWQ3 y Q7SCE9, respectivamente). Ambos son modelos de gen alternativos (y probablemente incorrectos) para la misma secuencia de genes como *aepA*. La siguiente proteína más relacionada es un polipéptido hipotético previsto de *Aspergillus clavatus* (número de registro de Uniprot A1CN59) con 71,6% de identidad.

35 **Ejemplo 4: expresión del polipéptido de *Neurospora crassa* que tiene actividad potenciadora amilolítica (AepA) en JaL250 de *Aspergillus oryzae***

40 [0265] Los protoplastos JaL250 de *Aspergillus oryzae* (WO 99/61651) se prepararon según el método de Christensen *et al.*, 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422. Un total de 2,71 µg de pPH48 se usó para transformar los protoplastos JaL250 de *Aspergillus oryzae*.

45 [0266] La transformación de JaL250 de *Aspergillus oryzae* con pPH48 (ejemplo 2) liberó aproximadamente 50 transformantes. Ocho transformantes fueron aislados a placas de PDA individuales e incubados durante cinco días a 34°C.

50 [0267] Placas de esporas confluyentes fueron lavadas con 3 ml de 0,01% de TWEEN® 80 y la suspensión de esporas fue usada para inocular 25 ml de medio MDU2BP en frascos de agitación de vidrio de 125 ml. Cultivos de transformantes se incubaron a 34°C con agitación constante a 200 r.p.m.

55 El día cinco post-inoculación, una parte alícuota de 1,5 ml de cada cultivo fue recogida y centrifugada a 12.000 x g. Una muestra de 7,5 µl de cada sobrenadante fue mezclada con un volumen igual de 2X tampón de carga (10% beta-mercaptoetanol) y cargada sobre un 1,5 mm 8%-16% Tris-Glicina gel de SDS-PAGE y tintado con SIMPLYBLUE™ Safe Stain (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Los perfiles SDS-PAGE de los caldos de cultivo mostraron que siete de cada ocho transformantes tenían una banda proteínica nueva de aproximadamente 50 kDa. El peso molecular aparente de la nueva banda proteínica es aproximadamente 10 kDa mayor que el peso molecular previsto de 39,2 kDa. Este diferencial de tamaño se puede deber a modificaciones postraduccionales tales como glicosilación. El transformante número 2 se seleccionó para otros estudios y se denominó JaL250PH48 de *Aspergillus oryzae*. Experimentos posteriores demostraron que la expresión de la proteína AepA en esta cepa fue superior en el medio YPM, y este medio se usó para expresión posterior.

60 **Ejemplo 5: clonación de un polipéptido de *Aspergillus nidulans* que tiene gen (*aepA*) de actividad potenciadora amilolítica**

65 [0268] Basado en un gen previsto en la secuencia genómica de *Aspergillus nidulans* (nombre del gen AN5463.2), dos cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados debajo fueron diseñados para amplificar por PCR un gen de

*Aspergillus nidulans* aepA a partir de ADN genómico preparado en el ejemplo 1. Un equipo de clonación por PCR IN-FUSION™ se usó para clonar el fragmento directamente en el vector de expresión pALo2 sin necesidad de digestión de restricción y ligamiento.

5 AN5463 sentido:

5'-ACTGGATTTACCATGAAGTCTCTCCTCGCCCTTGTG-3' (SEC ID nº: 11)

AN5463 anti:

10 5'-TCACCTCTAGTTAATTAACCTACCGCCATGCACCACTCT-3' (SEC ID nº: 12)

Las letras en negrita representan la secuencia codificante. La secuencia restante es homóloga de los sitios de inserción de pALo2.

15 [0269] Treinta picomoles de cada uno de los cebadores anteriores se usaron en una reacción de amplificación que contenía 400 ng de ADN genómico de *Aspergillus nidulans*, 1X tampón de amplificación Pfx, 1,7 µl de una mezcla de 10 mM de dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 2,5 unidades de polimerasa de ADN PLATINUM® Pfx y 1 µl de 50 mM de MgSO<sub>4</sub> en un volumen final de 50 µl. La reacción de amplificación se incubó en un MASTERCYCLER® 5333 de EPPENDORF® programado durante 1 ciclo a 96°C durante 3 minutos; y 33 ciclos cada una a 94°C durante 50 segundos, 60°C durante 50 segundos y 68°C durante 2 minutos. El bloque de calor luego fue a un ciclo húmedo de 4°C.

20 [0270] Los productos reactivos fueron aislados por 1,2% de electroforesis en gel de agarosa usando tampón TAE donde un 1,2 kb de banda de producto fue cortado del gel y purificado utilizando un equipo de extracción en gel QIAQUICK® según las instrucciones del fabricante.

25 [0271] El fragmento se clonó luego en pALo2 utilizando un equipo de clonación por PCR IN-FUSION™. El vector fue digerido con *Nco* I y *Pac* I. El fragmento fue purificado por electroforesis en gel y un equipo de extracción en gel QIAQUICK® como se ha mencionado anteriormente. El fragmento de gen y el vector digerido fueron incubados juntos en una reacción que dio como resultado el plásmido de expresión pPH49 (figura 3) donde la transcripción del gen aepA estaba bajo el control de un promotor NA2-tpi (un promotor modificado que incluye el gen que codifica la alfa-amilasa neutra en *Aspergillus niger* donde el líder no traducido se ha sustituido por un líder no traducido del gen que codifica triosa fosfato isomerasa en *Aspergillus nidulans*). La reacción de IN-FUSION™ (50 µl) estaba compuesta por 1X tampón IN-FUSION™, 1X BSA, 1 µl de enzima IN-FUSION™ (diluida 1:10), 150 ng de pALo2 digerido con *Nco* I y *Pac* I, y 50 ng del producto purificado por PCR aepA de *Aspergillus nidulans*. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Un µl de la reacción se usó para transformar células SOLOPACK® Gold XL10 de *E. coli*. Un transformante de *E. coli* con el plásmido pPH49 fue detectado por digestión de restricción y ADN plásmido se preparó utilizando un BIOROBOT® 9600.

40 **Ejemplo 6: caracterización del polipéptido de *Aspergillus nidulans* que tiene gen (aepA) de actividad potenciadora amilolítica**

45 [0272] La secuenciación del ADN del fragmento de PCR de 1,2 kb se realizó como se describe en el ejemplo 3. La secuencia de 1,2 kb fue comparada y alineada con la secuencia de la base de datos original (número de registro del GenBank NT\_107010) y fue un 100% de correspondencia.

50 [0273] Un modelo de gen para la secuencia de ADN genómico de *Aspergillus nidulans* se construyó basado en el modelo de gen previsto para esta secuencia de ADN (número de registro de UniProt Q5B1W7). La secuencia de nucleótidos (SEC ID nº: 3) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID nº: 4) de la secuencia de ADN genómico de *A. nidulans* se muestran en las figuras 4A y 4B. El fragmento genómico de 1.217 pares de bases (incluyendo codón de terminación) codifica un polipéptido de 385 aminoácidos, interrumpido por un intrón de 59 pares de bases. El % de contenido G+C del gen y la secuencia codificante madura es 53,3% y 53,8%, respectivamente. Un dominio de unión al almidón (familia de módulo de unión a carbohidratos 20, número de registro de Prosite PS51166) estaba presente desde aproximadamente los residuos 278 a 385 del pre-polipéptido. Uso del programa de software SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *supra*), se predijo un péptido señal de 18 residuos. La proteína madura predicha contiene 367 aminoácidos con una masa molecular predicha de 39.1 kDa y un pI de 4,5.

60 [0274] Un alineamiento global por pares comparativo de secuencias de aminoácidos fue determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) tal y como se realiza en el programa Needle de EMBOSS con penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión del espacio de 0,5 y la matriz EBLOSUM62. El alineamiento mostró que la secuencia de aminoácidos deducida del gen de *Aspergillus nidulans* que codifica el polipéptido maduro que tiene actividad potenciadora amilolítica compartía 100% y 80,0% de identidad (excluyendo espacios) con las secuencias de aminoácidos deducidas de dos polipéptidos hipotéticos predichos de *Aspergillus nidulans* y *Neosartorya fischeri* (números de registro de UniProt Q5B1W7 y A1D1F9, respectivamente).

65

**Ejemplo 7: expresión del polipéptido de *Aspergillus nidulans* que tiene actividad potenciadora amilolítica (aepA) en JaL355 de *Aspergillus oryzae***

5 [0275] Los protoplastos JaL355 de *Aspergillus oryzae* se prepararon según el método de Christensen *et al.*, 1988, *supra*. Los protoplastos JaL355 de *Aspergillus oryzae* fueron transformados con 2,71 µg de pPH49 (descrito en el ejemplo 5).

[0276] La transformación de JaL355 de *Aspergillus oryzae* con pPH49 liberó aproximadamente 40 transformantes. Ocho transformantes fueron aislados en placas de PDA individuales e incubados durante cinco días a 34°C.

10 [0277] Placas de esporas confluyentes se lavaron con 3 ml de 0,01% de TWEEN<sup>®</sup> 80 en el medio MDU2BP y la suspensión de esporas se usó para inocular 25 ml de medio MDU2BP en frascos de agitación de vidrio de 125 ml. Cultivos de transformantes se incubaron a 34°C con agitación constante a 200 r.p.m. A día cinco después de la inoculación, 1,5 ml de partes alícuotas de cada cultivo se recogió y centrifugó a 12.000 x g. Una muestra de 7,5 µl de cada sobrenadante se mezcló con un volumen igual de 2X tampón de carga (10% β-mercaptoetanol) y se cargó sobre un 1,5 mm 8%-16% Tris-Glicina gel de SDS-PAGE y te tiñó con SIMPLYBLUE<sup>™</sup> Safe Stain.

15 [0278] Los perfiles de SDS-PAGE de los caldos de cultivo mostraron que siete de cada ocho transformantes produjeron una banda proteínica nueva de aproximadamente 55 kDa. El peso molecular aparente de la nueva banda proteínica fue aproximadamente 14 kDa mayor que el peso molecular predicho de 39,1 kDa. Esta diferencia de tamaño se puede deber a modificaciones postraduccionales tales como glicosilación. El transformante número 5 se seleccionó para otros estudios y se denominó clon #5 de JaL250PH49 de *Aspergillus oryzae*.

**Ejemplo 8: aislamiento monoespórico del clon #5 de JaL355PH49 de *Aspergillus oryzae***

25 [0279] Para asegurar la homogeneidad del genotipo y determinar si un aislado puro podría producir polipéptido de *Aspergillus nidulans* más recombinante que tenga actividad potenciadora amilolítica (aepA), se generaron cultivos monoespóricos a partir del clon #5 de JaL250PH49 de *Aspergillus oryzae* original. Doscientos microlitros de 0,01% de TWEEN<sup>®</sup> 80 en el medio MDU2BP se añadieron a un área pequeña de una placa de esporas confluyentes del clon #5 de JaL250PH49 de *Aspergillus oryzae*. Las esporas de esta área se resuspendieron con un distribuidor Arber estéril (Arber Bioscience, Rochester, NY, EE. UU.) de modo que el área resuspendida no fuera mayor de 13 mm de diámetro. Un 100 µl de partes alícuotas de la suspensión de esporas se recogió y diluyó en 5 ml de 0,01% de solución TWEEN<sup>®</sup> 80. La concentración de esporas se determinó utilizando un hemocitómetro (Hausser Scientific, Horsham, PA, EE. UU.) por recuento de 5 de los 0,2<sup>2</sup> mm cuadrados del milímetro cuadrado central (cuatro esquinas más el central) en cada lado de la cámara. El valor medio de estos recuentos se determinó y se multiplicó por 5 para determinar el número total de esporas por milímetro cuadrado y luego se multiplicó por 10<sup>4</sup> para obtener el número de esporas por microlitro. Las esporas fueron luego diluidas en 0,01% de TWEEN<sup>®</sup> 80 en el medio MDU2BP a una concentración final de 0,1 de esporas por microlitro. Trescientos microlitros de la suspensión de esporas que contenía 30 esporas se colocaron en palcas sobre 150 mm de medio mínimo + placas de sacarosa y se incubaron durante 2 a 3 días a 34°C. Una vez las colonias fueron claramente visibles, 10 colonias se seleccionaron al azar y se transfirieron individualmente a 100 mm de placas de PDA y se incubaron durante cinco días a 34°C.

**Ejemplo 9: análisis de expresión de los aislados monoespóricos del clon #5 JaL355PH49 de *Aspergillus oryzae* JaL355PH49**

45 [0280] Placas de esporas confluyentes de los diez aislados monoespóricos del clon #5 de JaL355PH49 de *Aspergillus oryzae* se lavaron con 3 ml de 0,01% de TWEEN<sup>®</sup> 80 en el medio MDU2BP y la suspensión de esporas se usó para inocular 25 ml del medio MDU2BP en frascos de agitación de vidrio de 125 ml. Cultivos transformantes se incubaron a 34°C con agitación constante a 200 r.p.m. El día cinco después de la inoculación, una parte alícuota de 1,5 ml de cada cultivo se recogió y centrifugó a 12.000 x g. Una muestra de 7,5 µl de cada sobrenadante se mezcló con un volumen igual de 2X tampón de carga (10% beta-mercaptoetanol) y se cargó sobre un 1,5 mm 8%-16% Tris-Glicina gel de SDS-PAGE y se tiñó con SIMPLYBLUE<sup>™</sup> Safe Stain.

50 [0281] Los perfiles de SDS-PAGE de los caldos de cultivo mostraron que los diez transformantes tenían un modelo de proteína similar al clon #5 de JaL355PH49 de *Aspergillus oryzae* original. Cuatro de cada diez tuvieron una banda proteínica más intensa de aproximadamente 55 kDa lo que sugiere que estos aislados fueron capaces de producir más AepA de *Aspergillus nidulans*. De estos cuatro aislados, el aislado #8 fue seleccionado para otros estudios y se denominó JaL355PH49 de *Aspergillus oryzae*.

**Ejemplo 10: cultivos en frasco de agitación grande del polipéptido de *Neurospora crassa* que tiene actividad potenciadora amilolítica expresada en JaL250PH48 de *Aspergillus oryzae***

60 [0282] Las esporas de JaL250PH48 de *Aspergillus oryzae* se extendieron sobre una placa de PDA y se incubaron durante cinco días a 34°C. La placa de esporas confluyentes se lavó dos veces con 5 ml de 0,01% de TWEEN<sup>®</sup> 20 para maximizar el número de esporas recogidas. La suspensión de esporas se usó luego para inocular 100 ml de medio YPM en un matraz 500 ml. El cultivo transformante fue incubado a 34°C con agitación constante a 200 r.p.m. El cuarto día después de la inoculación, se recogió el caldo de cultivo por filtración a través de una membrana EXPRESS<sup>™</sup> Plus de

0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.). Una muestra de 5  $\mu\text{l}$  del caldo se analizó por SDS-PAGE como se ha descrito anteriormente para confirmar que el modelo de proteína era el mismo que el obtenido antes. Una vez que el caldo mostró que contenía la banda proteínica prevista de aproximadamente 55 kDa por SDS-PAGE, el caldo se sometió a purificación y caracterización enzimática.

5

**Ejemplo 11: cultivos en frasco de agitación grande del polipéptido de *Aspergillus nidulans* que tiene actividad potenciadora amilolítica expresada en el Jal355PH49 de *Aspergillus oryzae***

[0283] Las esporas de Jal250PH49 de *Aspergillus oryzae* se extendieron sobre una placa de PDA y se incubaron durante cinco días a 34°C. Se generó caldo de cultivo como se describe en el ejemplo 10.

10

**Ejemplo 12: construcción del vector de expresión de pHUda666 para amiloglucosidasa de *Trametes cingulata***

[0284] El gen que codifica una amiloglucosidasa de *Trametes cingulata* se clonó a partir de ADN genómico y posteriormente se subclonó en un vector de expresión y se transformó en *Aspergillus oryzae* como se describe en la WO 2006/069289. La cepa de expresión resultante de *A. oryzae* NC000651 se fermentó en frascos de agitación durante 3 días con maltosa como única fuente de carbono para inducir expresión del gen. Los micelios se cosecharon y el ARN total se aisló utilizando un equipo RNEASY<sup>®</sup> Mini (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE. UU.). ADNc para el gen de amiloglucosidasa se sintetizó utilizando un sistema 3' RACE (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante y los cebadores mostrados a continuación.

15

20

Cebador sentido:

5'-tttgatccaccatgctgttcacgctcctcacc-3' (SEC ID n°: 13)

25

Cebador antisentido:

5'-tttctcgagctaccgccaggtgtcgttctg-3' (SEC ID n°: 14)

[0285] El fragmento de 1,7 kb amplificado fue digerido con *Bam* HI y *Xho* I y ligado en un sitio *Bam* HI y *Xho* I del plásmido pT7Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). La mezcla de ligamiento se transformó luego en el DH12 $\alpha$  de *E. coli* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Muestras de ADN plásmido fueron preparadas para secuenciación utilizando un equipo QIAPREP<sup>®</sup> Spin Miniprep (QIAGEN Inc., Valencia, CA, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Un único clon que contiene un plásmido con el gen de ADNc de amiloglucosidasa de *Trametes cingulata* fue aislado. El inserto fue cortado por digestión con *Bam* HI y *Xho* I y ligado en el pJal790 digerido por *Bam* HI y *Xho* I (WO 2007/045248). Un único clon que contiene un plásmido con el gen de ADNc de amiloglucosidasa de *Trametes cingulata* fue aislado y designado pHUda666 (figura 5).

30

35

**Ejemplo 13: expresión de amiloglucosidasa de *Trametes cingulata* expresada en *Aspergillus niger***

40

[0286] La cepa BO1 de *Aspergillus niger* fue inoculada en 25 ml del medio YP que contenía 2% de glucosa y 1 M de sacarosa y se dejó crecer durante toda la noche a 30°C con agitación a 150 r.p.m. Los micelios se recogieron por filtración a través de una membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  STERICUP EXPRESS<sup>™</sup> Plus (Millipore Corporation, Billerica, MA, EE. UU.), enjuagada con 250 ml de 1 M de sorbitol y filtrada de nuevo. Los micelios se suspendieron en 30 ml de 1 M de sorbitol que contenía por ml 20 mg de GLUCANEX<sup>®</sup> 200 G (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) y 0,33 mg de quitinasa (Sigma, St. Lewis, MO, EE. UU.) en un matraz de 125 ml y se incubó a 34°C durante 45 minutos a 100 r.p.m. La solución se enfrió en hielo, se filtró a través de dos capas de MIRACLOTH<sup>®</sup> (Calbiochem, La Jolla, CA, EE. UU.), se diluyó hasta 50 ml con 1 M de sorbitol y se centrifugó durante 5 minutos a 1500 r.p.m. en un rotor de cubo oscilante Sorvall 7500. El granulado fue resuspendido en 1 M de sorbitol y la centrifugación y la resuspensión se repitió tres veces. El granulado final fue suspendido en solución STC:PEG: DMSO (2.7:0.5:0.035) a una concentración de  $3 \times 10^7$  protoplastos por ml y almacenado a -80°C. Para transformación, 5-10  $\mu\text{g}$  de ADN plásmido pHUda666 fue mezclado con un volumen igual de solución de heparina (5 mg por ml de 50 mM de  $\text{CaCl}_2$  -1,2 M de sorbitol) y 100  $\mu\text{l}$  de protoplastos preparados como se ha descrito anteriormente. La solución se mezcló suavemente y se incubó en hielo durante 20 minutos. Un ml de 40% de PEG 4000, 0,8 M de sorbitol, 50 mM de  $\text{CaCl}_2$  se añadió y la solución se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Luego 7-10 ml de agarosa superior COVE a 50°C se añadió y la solución se vertió sobre una placa de medio de selección de COVE, se dejó endurecer, y se incubó a 34°C durante 3-7 días. Cincuenta transformantes de cada cepa se subcultivaron a medio COVE-2 y los aislados monoclonales se transfirieron a medio COVE-N-gly y se incubaron a 32°C durante aproximadamente 3 semanas. Se recogieron esporas en 3-5 ml de 0,01% de TWEEN<sup>®</sup> 20 y se congelaron en 10% de glicerol. Las suspensiones de esporas fueron posteriormente descongeladas y 40  $\mu\text{l}$  de cada suspensión se inoculó en 4 ml de medio MU1-MLC/MSS en un tubo de fondo redondo de 14 ml se incubó a 30°C durante hasta 10 días a 200 r.p.m. Los sobrenadantes del cultivo fueron analizados por SDS-PAGE para la expresión de una banda de aproximadamente 70 kDa. El transformante superior (CKIe43) fue elegido para escalar la fermentación.

45

50

55

60

[0287] El medio de matraz de agitación estaba compuesto por litro de 70 g de sacarosa y 100 g de concentrado de soja. Cien ml de medio de matraz de agitación se añadió a un matraz de agitación de 500 ml. El matraz de agitación fue

65

inoculado con 300 µl de un caldo de esporas en glicerol a 30°C en un agitador orbital a 220 r.p.m. durante 72 horas. Cincuenta ml del caldo de matraz de agitación de cada uno de los cuatro frascos de agitación separados se usó para inocular un vaso de fermentación de 3 litros.

5 [0288] El medio de lote de fermentación estaba compuesto por 50 g de maltodextrina, 8,5 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3 g de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,1 g de ácido cítrico, 0,5 ml de anti espuma, 1 ml de solución de metales traza #1, 0,5 ml de solución de metales traza #2 y agua desionizada a 1 litro. La solución de metales traza #1 estaba compuesta por 13,8 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 14,3 g de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 11,6 g de MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 2,5 g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0,5 g de NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 3,3 g de monohidrato de ácido cítrico y agua desionizada a 1 litro. La solución de metales traza #2 estaba compuesta por 400 g de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10 g de NaNO<sub>3</sub> y agua desionizada a 1 litro. El medio de alimentación de fermentación estaba compuesto por kilogramo de 690 g de glucosa, 1,5 g de monohidrato de ácido cítrico, 0,9 ml de solución de metales traza #2 y 1 ml de anti espuma.

15 [0289] Un total de 2 litros del medio de lote de fermentación se añadió a un fermentador cubierto de vidrio de 2 litros Applikon Biotechnology (Applikon Biotechnology, Schiedam, Países Bajos). El medio de alimentación de fermentación se dosificó a razón de 0 a 5,4 g/l/hr durante un periodo de 185 horas. El vaso de fermentación se mantuvo a una temperatura de 34°C y el pH fue controlado usando un sistema de control Applikon 1010 (Applikon Biotechnology, Schiedam, Países Bajos) en un punto de ajuste de 4,85 +/- 0,1. Se añadió aire al vaso a razón de 1,2 vvm y el caldo fue agitado por impulsor Rushton rotando a 1100 r.p.m. Después de 8 días, todo el caldo se cosechó del vaso y se centrifugó a 3000 x g para retirar la biomasa. El sobrenadante se filtró de forma estéril y se almacenó en 5 a 10°C.

#### **Ejemplo 14: purificación del polipéptido de *Neurospora crassa* que tiene actividad potenciadora amilolítica**

25 [0290] El sobrenadante del caldo que contiene el polipéptido de *Neurospora crassa* que tiene actividad potenciadora amilolítica, obtenido según el ejemplo 10, fue desalado cargando 50 ml del sobrenadante del caldo en 4 columnas HIPREP<sup>®</sup> 26/10 conectadas en serie (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EE. UU.), con cada columna con un volumen de 13 ml, y luego eluyendo con 20 mM de Tris pH 8,0. Se recogieron fracciones de 8 ml y las fracciones 1-8 se agruparon basadas en análisis SDS-PAGE de las fracciones utilizando un 8-16% de gel Tris-HCl (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU.). Las fracciones agrupadas se purificaron luego más utilizando una columna de 20 ml MonoQ HIPREP<sup>®</sup> 16/10 (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EE. UU.). Un volumen de 50 ml de las fracciones agrupadas se cargó en la columna MonoQ HIPREP<sup>®</sup> 16/10 y luego se eluyó utilizando un gradiente de volumen de columna 20 de 0 a 0,25 M de NaCl en 20 mM de Tris-HCl pH 8,0. Se recogieron fracciones de 5 ml y 33 fracciones de 37 se sometieron a análisis SDS-PAGE. SDS-PAGE en un gel Tris-HCl al 8-16% con coloración azul Coomassie mostró que las muestras son más de 95% puras.

#### **Ejemplo 15: efecto del polipéptido de *Neurospora crassa* que tiene actividad potenciadora amilolítica en la hidrólisis de amilopectina**

40 [0291] El polipéptido de *Neurospora crassa* que tiene actividad potenciadora amilolítica fue evaluado para su capacidad para mejorar la hidrólisis de amilopectina por alfa-amilasa ácida de *Aspergillus niger* y amiloglucosidasa de *Trametes cingulata*, cada una sola y en combinación. La hidrólisis de amilopectina se realizó con 5 g de amilopectina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA; Sigma A8515, lot 102k3775) por litro de 1,75 mM de CaCl<sub>2</sub>-50 mM de citrato sódico pH 4,0. Amiloglucosidasa de *Trametes cingulata* se añadió a 1,3 mg por litro de concentración de proteína final. Alfa-amilasa ácida de *Aspergillus niger* (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca; SP288), disuelta a una concentración de 10 g por litro de 50 mM de tampón de citrato sódico pH 4,0, se añadió a 20 mg por litro de concentración de proteína final. Las reacciones hidrolíticas se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche con o sin 7,6 mg de polipéptido de *Neurospora crassa* que tiene actividad potenciadora amilolítica por litro. Para cada reacción, una única mezcla reactiva de 800 µl se preparó y luego se dividió en partes alícuotas por triplicado a 200 µl por pocillo en una placa de pocillos profundos de 1 ml (Axygen Scientific, Union City, CA, EE. UU.; #P-DW- 11-C, lot 080102-112). Estándares de glucosa a 100, 75, 50, 25, 12,5 y 0 mg por litro de 50 mM de tampón de citrato sódico pH 4,0 se añadieron por duplicado a 200 µl por pocillo. La placa se selló luego utilizando un sellador de placa ALPS-300 (ABgene, Rochester, NY, EE. UU.) y se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente.

55 [0292] Después de la incubación durante toda la noche, la placa se evaluó para reducir la concentración de azúcar utilizando un ensayo PHBAH (4-hidroxi-benzhidrido). Cincuenta microlitros de 0,5 M de NaOH fueron adicionados a cada pocillo de la placa (incluyendo estándares de glucosa) para parar las reacciones. Las muestras que contienen amilopectina se diluyeron 40 veces en diluyente compuesto por una parte de 0,5 M de NaOH con 4 partes de 50 mM de tampón de citrato sódico pH 4,0 mediante la mezcla de 12,5 µl de muestra con 87,5 µl del diluyente, seguido de mezcla 20 µl de la muestra diluida 8 veces con 80 µl del diluyente. Ambas diluciones fueron preparadas en placas de 96 pocillos de fondo en V de Thermowell (Corning, Inc., Oneonta, NY, EE. UU.; Corning #6511). Una muestra de 100 µl de cada estándar de glucosa (con NaOH) se añadió a los pocillos de la placa de dilución final, y luego 50 µl de 1,5% (p/v) de PHBAH (Sigma H9882, lot #054k1344) en 0,5 M de NaOH se añadieron a cada pocillo. La placa se calentó luego a 95°C en un bloque de calentamiento Omega CN76000 (Ameri Technology Group, Inc., Sacramento, CA, EE. UU.) durante 10 minutos. Después del calentamiento, 50 µl de agua desionizada se añadió a cada pocillo y 100 µl de cada muestra se transfirió a una placa de 96 pocillos de fondo plano (Corning, Inc., Oneonta, NY, EE. UU.; Corning #9017). La absorbancia a 410 nm se midió luego utilizando un lector de placa espectrofotométrico SPECTRAMAX<sup>®</sup> 340pc

(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EE. UU.). La concentración de glucosa fue determinada a partir de una línea recta ajustada a la concentración de glucosa contra la absorbancia a 410 nm para los estándares de glucosa.

[0293] Los resultados mostrados en la figura 6 mostraron que el polipéptido de *Neurospora crassa* tiene hidrólisis mejorada de actividad potenciadora amilolítica de amilopectina por la amiloglucosidasa de *Trametes cingulata*, la alfa-amilasa ácida de *Aspergillus niger* y una combinación de la amiloglucosidasa y la alfa-amilasa. El polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica solo produjo hidrólisis de amilopectina no medible.

#### **Ejemplo 16: purificación del polipéptido de *Aspergillus nidulans* que tiene actividad potenciadora amilolítica**

[0294] El sobrenadante del caldo que contenía el polipéptido de *Aspergillus nidulans* con actividad potenciadora amilolítica, obtenido según el ejemplo 11, se desaló por carga de 50 ml del sobrenadante del caldo en 4 columnas HIPREP® 26/10 conectadas en serie, teniendo cada columna un volumen de 13 ml, y eluyendo luego con 20 mM de Tris HCl pH 8,0. Se recogieron fracciones de 8 ml y se agruparon las fracciones 3-8 basadas en el análisis SDS-PAGE de las fracciones utilizando un 8-16% de gel Tris-HCl. Las fracciones agrupadas se purificaron luego utilizando 20 ml de una columna MonoQ HIPREP® 16/10. Un volumen de 48 ml de las fracciones agrupadas se cargó en la columna MonoQ HIPREP® 16/10 y luego se eluyó utilizando un gradiente de volumen de columna 20 de 0 a 0,5 M de NaCl en 20 mM de Tris-HCl pH 8,0. Se recogieron fracciones de 5 ml y se sometieron las fracciones 50 y 53 de 59 a análisis SDS-PAGE. SDS-PAGE en un 8-16% gel Tris-HCl con coloración azul Coomassie mostró que las muestras son más de 95% puras.

#### **Ejemplo 17: efecto del polipéptido de *Aspergillus nidulans* que tiene actividad potenciadora amilolítica y el polipéptido de *Neurospora crassa* que tiene actividad potenciadora amilolítica en la hidrólisis de amilosa**

[0295] Los polipéptidos de *Aspergillus nidulans* y de *Neurospora crassa* que tienen actividad potenciadora amilolítica fueron evaluados para su capacidad para mejorar la hidrólisis de la amilosa por alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca, estándar TERMAMYL™, lote 19-1197). La hidrólisis de amilosa se realizó con 5 g de amilosa tipo III de patata (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.) por litro de 1,75 mM de CaCl<sub>2</sub> -50 mM de citrato sódico pH 4,0 o 1,75 mM de CaCl<sub>2</sub> -50 mM de citrato sódico pH 6,0. La amilosa estaba esencialmente libre de amilopectina. La alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*, disuelta a una concentración de 5 g por litro de 50 mM de tampón Tris HCl pH 8,0, se añadió a 20 mg por litro de concentración de proteína final. Las reacciones hidrolíticas se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche con o sin 7,6 mg de polipéptido de *Neurospora crassa* que tiene actividad potenciadora amilolítica o 3,6 mg de polipéptido de *Aspergillus nidulans* que tiene actividad potenciadora amilolítica por litro. Para cada reacción, una única mezcla reactiva de 1300 µl se preparó y luego se dividió en partes alícuotas por triplicado en 125 µl por pocillo en tres placas de pocillos profundos de 1 ml AXYGEM®. Para la placa de pH 4,0, estándares de glucosa a 100, 75, 50, 25, 12,5 y 0 mg por litro de 50 mM de tampón de citrato sódico pH 4,0 se añadieron por duplicado a 125 µl por pocillo. Para la placa de pH 6,0, estándares de glucosa a 100, 75, 50, 25, 12,5 y 0 mg por litro de 50 mM de tampón de citrato sódico pH 6,0 se añadieron por duplicado a 125 µl por pocillo. Las placas se sellaron luego por calor utilizando un sellador de placa ALPS-300 y se dejaron durante toda la noche a temperatura ambiente, 40°C o 50°C.

[0296] Después de la incubación durante toda la noche, las placas se evaluaron para concentración de azúcar reductor utilizando el ensayo PHBAH descrito en el ejemplo 15, excepto 31,3 µl de 0,5 M de NaOH se añadieron a cada pocillo de la placa (incluyendo estándares de glucosa) para parar las reacciones; y las muestras que contenían amilosa se diluyeron 20 veces en el diluyente compuesto por una parte de 0,5 M de NaOH con 4 partes de 50 mM de tampón de citrato sódico pH 4,0 mediante la mezcla de 5 µl de muestra con 95 µl del diluyente.

[0297] Los resultados mostrados en la figura 7 demostraron que los polipéptidos que tienen actividad potenciadora amilolítica de tanto *Aspergillus nidulans* y *Neurospora crassa* mejoraron la hidrólisis de amilosa por alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* a pH 6,0 y temperatura ambiente. Los resultados mostrados en la figura 8 mostraron que el polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica de *Neurospora crassa* mejoró la hidrólisis de la amilosa por la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* a pH 4,0 y temperatura ambiente, 40°C y 50°C.

#### **Ejemplo 18: efecto de los polipéptidos de *Aspergillus nidulans* y de *Neurospora crassa* que tienen actividad potenciadora amilolítica en la hidrólisis de amilopectina con las amiloglucosidasas de *Talaromyces emersonii* y *Trametes cingulata***

[0298] Los polipéptidos de *Aspergillus nidulans* y de *Neurospora crassa* que tienen actividad potenciadora amilolítica se evaluaron para su capacidad para mejorar la hidrólisis de amilopectina por la amiloglucosidasa de *Trametes cingulata* o la amiloglucosidasa de *Talaromyces emersonii*. La hidrólisis de la amilopectina se realizó con 5 g de amilopectina por litro de 1,75 mM de CaCl<sub>2</sub> -50 mM citrato sódico pH 5,0. La amiloglucosidasa de *Trametes cingulata*, obtenida como se describe en el ejemplo 13, se añadió a 1,3 mg por litro de concentración de proteína final. La amiloglucosidasa de *T. emersonii* (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca; combustible SPIRIZYME®, lote NAP00204) se diluyó 8,250 veces en 1,75 mM de CaCl<sub>2</sub> -50 mM de citrato sódico pH 5,0, y luego se diluyó otras 20 veces en la mezcla reactiva final. Las reacciones hidrolíticas se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche con o sin 7,6 mg de polipéptido de *Neurospora crassa* o *Aspergillus nidulans* con actividad potenciadora amilolítica por litro. Para cada reacción, una única mezcla reactiva de 800 µl se preparó y luego se dividió en partes alícuotas por triplicado a 200 µl por pocillo en una

placa de pocillos profundos de 1ml AXYGEN®. Estándares de glucosa a 100, 75, 50, 25, 12,5 y 0 mg por litro de 50 mM de tampón de citrato sódico pH 5,0 fueron añadidos por duplicado a 200 µl por pocillo. La placa se selló luego con una tapa de placa de 96 pocillos de silicona (Nalgene, Rochester, NY, EE. UU.) y se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente.

[0299] Después de la incubación durante toda la noche, la placa se evaluó para reducir la concentración de azúcar reductor utilizando el ensayo PHBAH descrito en el ejemplo 15.

[0300] Los resultados mostrados en la figura 9 demostraron que cada uno de los polipéptidos que tenía actividad potenciadora amilolítica de *Neurospora crassa* y de *Aspergillus nidulans* mejoró la hidrólisis de amilopectina por amiloglucosidasa de *Trametes cingulata* y por amiloglucosidasa de *Talaromyces emersonii*.

**Ejemplo 19: efecto del polipéptido de *Aspergillus nidulans* que tiene actividad potenciadora amilolítica en la hidrólisis de almidón de maíz**

[0301] El polipéptido de *Aspergillus nidulans* que tiene actividad potenciadora amilolítica fue evaluado para su capacidad para mejorar la hidrólisis de almidón de maíz por amiloglucosidasa de *Trametes cingulata*. La hidrólisis de almidón de maíz se realizó con 50 g de almidón de maíz (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.) por litro de 1,75 mM de CaCl<sub>2</sub> -50 mM citrato sódico pH 5,0. Amiloglucosidasa de *Trametes cingulata*, obtenida como se describe en el ejemplo 13, se añadió a 2,0 mg por litro de concentración de proteína final. Las reacciones hidrolíticas fueron incubadas a temperatura ambiente durante toda la noche con o sin 10 mg de polipéptido de *Aspergillus nidulans* con actividad potenciadora amilolítica por litro. Para cada reacción, una única mezcla reactiva de 800 µl fue preparada y luego se dividió en partes alícuotas por triplicado a 200µl por pocillo en una placa de pocillos de 1ml de profundo AXYGEN®. Estándares de glucosa a 1000, 500, 250, 125, 62,5 y 0 mg por litro de 50 mM de tampón de citrato sódico pH 5,0 se adicionaron por duplicado a 200 µl por pocillo. La placa se selló luego por calor utilizando un sellador de placa ALPS-300 y se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente.

[0302] Después de la incubación durante toda la noche, la placa se evaluó para glucosa utilizando un ensayo de glucosa-oxidasa. Cien microlitros de 0,5 M de NaOH se añadieron a cada pocillo de la placa (incluyendo estándares de glucosa) para parar las reacciones. Luego 20 µl de cada pocillo se transfirieron a una placa de 96 pocillos de fondo plano que contenía 200 µl por pocillo de reactivo de glucosa-oxidasa líquida (Pointe Scientific, Canton, MI, EE. UU., #G7521, lot # 815601-182) y se incubó durante 7 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia a 490 nm se midió luego utilizando un lector de placa espectrofotométrico SPECTRAMAX® 340pc. La concentración de glucosa se determinó a partir de una línea recta ajustada a la concentración de glucosa contra la absorbancia a 490 nm para los estándares de glucosa.

[0303] Los resultados mostrados en la figura 10 demostraron que el polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica de *Neurospora crassa* mejoraba la hidrólisis de almidón de maíz por la amiloglucosidasa de *Trametes cingulata*.

**Ejemplo 20: clonación de una secuencia de ADNc de *Aspergillus oryzae* de un gen que codifica un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica**

[0304] Se realizó la clonación y la secuenciación de la secuencia de ADNc de un gen que codifica un polipéptido IFO 4177 de *Aspergillus oryzae* que tiene actividad potenciadora amilolítica (aepA) como se describe en la WO 2000/56762. El ADNc aepA de *Aspergillus oryzae* se subclonó en el vector de expresión pMStr57 de *Aspergillus* (WO 2004/032648) por amplificación por PCR de la secuencia codificante de proteína del clon NN00055-12-D05-045 con los dos cebadores oligonucleótidos sintéticos mostrados a continuación.

AoPL2.1:  
5'-CGAGGATCCAACATAATGAAGGTCTTCG-3' (SEC ID n°: 15)

AoPL2.2:  
5'-AGCAAGCTTCAGTGACGAAATGCCAT-3' (SEC ID n°: 16)

[0305] Los cebadores tienen sitios de restricción apropiados añadidos a sus extremidades 5' para facilitar la subclonación del producto PCR. La amplificación por PCR se realizó utilizando el Extensor Hi-Fidelity PCR Master Mix (ABgene, Surrey, U.K.) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando una temperatura de recocido de 50°C y una temperatura de extensión de 60°C y tiempo de extensión de 1 minuto durante 20 ciclos.

[0306] El fragmento de PCR fue restringido con *Bam* HI y *Hind* III y clonado en pMStr57 utilizando técnicas estándar para producir pMStr80 (figura 11).

**Ejemplo 21: caracterización del gen que codifica el polipéptido de *Aspergillus oryzae* que tiene actividad potenciadora amilolítica**

[0307] La secuencia de nucleótidos (SEC ID nº: 5) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID nº: 6) de la secuencia de ADNc del gen de *Aspergillus oryzae* que codifica un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica (aepA) se muestran en la figura 12. La secuencia de ADNc de 756 pares de bases (incluyendo codón de terminación) codifica un polipéptido de 251 aminoácidos. El % de contenido G+C del gen y la secuencia codificante madura son 55,4% y 55,6%, respectivamente. Usando el programa de software SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *supra*), se predijo un péptido señal de 18 residuos. La proteína madura predicha contiene 233 aminoácidos con una masa molecular predicha de 25,7 kDa y un pI de 4,16.

[0308] Un alineamiento global por pares comparativo de secuencias de aminoácidos se determinó utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) tal y como se realiza en el programa Needle de EMBOSS con penalización de apertura de espacio de 10, penalización de extensión de espacio de 0,5 y la matriz EBLOSUM62. El alineamiento mostró que la secuencia de aminoácidos deducida del gen de *Aspergillus oryzae* que codifica el polipéptido maduro que tiene actividad potenciadora amilolítica compartía 100% y 99,6% de identidad (espacios excluidos) con las secuencias de aminoácidos deducidas de dos polipéptidos hipotéticos predichos de *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus flavus* (números de registro de UniProt Q2U8Y3 y B8NDE4, respectivamente).

**Ejemplo 22: construcción de MSTR212 *Aspergillus oryzae***

[0309] La cepa BECh2 de *Aspergillus oryzae* (WO 2000/39322) se transformó con pMStr80 según Christensen *et al.*, 1988, *supra* y la WO 2004/032648. Veinte transformantes fueron aislados por rayado de dilución con conidios en medio selectivo amdS (Christensen *et al.*, 1988, *supra*) que contenía 0,01 % de Tritón X-100 para limitar el tamaño de la colonia y se cultivaron en 10 ml de medio YPM a 30°C con agitación a 275 r.p.m. Las muestras se tomaron después de 1 y 2 días y la expresión del polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica se monitorizó por SDS-PAGE. Trece transformantes produjeron una banda proteínica nueva de aproximadamente 34 kDa. Nueve de estos transformantes se aislaron de nuevo por rayado de dilución con conidios en el mismo medio selectivo que contenía 0,01% de Tritón X-100 para limitar el tamaño de colonia, y posteriormente se cultivaron en 100 ml de medio YPM en matraces 500 ml con deflectores a 30°C con agitación a 275 r.p.m. Se tomaron muestras después de 3 días y la expresión del polipéptido que tenía actividad potenciadora amilolítica se monitorizó por SDS-PAGE. El transformante de mayor rendimiento se seleccionó para caracterización adicional y se denominó MSTR212 de *Aspergillus oryzae*.

**Ejemplo 23: cultivos en frasco de agitación grande del polipéptido de *Aspergillus oryzae* que tiene actividad potenciadora amilolítica expresado en MSTR212 de *Aspergillus oryzae***

[0310] Las esporas de MSTR212 de *Aspergillus oryzae* se extendieron sobre una placa de PDA y se incubaron durante cinco días a 34°C. La placa de esporas confluyentes se lavó dos veces con 5 ml de 0,01% de TWEEN<sup>®</sup> 20 para maximizar el número de esporas recogidas. La suspensión de esporas se usó luego para inocular 100 ml del medio M410 por matraz en cinco matraces de 500 ml. El cultivo se incubó a 34°C con agitación constante a 250 r.p.m. El día cinco después de la inoculación, el caldo de cultivo se recogió por filtración a través de una membrana de 0,22 µm EXPRESS<sup>™</sup> à Plus. Una muestra de 5 µl del caldo se analizó por SDS-PAGE como se ha descrito anteriormente para confirmar que el modelo de proteína era del tamaño previsto. Una vez que el caldo demostró contener la banda proteínica prevista de 37 kDa por SDS-PAGE, el caldo se sometió a purificación y evaluación.

**Ejemplo 24: purificación del polipéptido de *Aspergillus oryzae* que tiene actividad potenciadora amilolítica**

[0311] Aproximadamente 250 ml del sobrenadante del caldo que contenía el polipéptido de *Aspergillus oryzae* con actividad potenciadora amilolítica, obtenido según el ejemplo 23, se desaló mediante concentración a 50 ml utilizando una membrana de ultrafiltración con un corte de peso molecular nominal de 10 kDa (Millipore Corporation, Billerica, MA, EE. UU.). Luego 250 ml de 20 mM de Tris pH 8,5 se volvió a añadir. La mezcla resultante se concentró de nuevo a 50 ml y 250 ml de 20 mM de Tris pH 8,5 se añadió otra vez de nuevo. La mezcla resultante se concentró luego a 25 ml.

[0312] La muestra con el tampón cambiado se purificó utilizando una columna de 20 ml MonoQ HIPREP<sup>®</sup> 16/10. Un volumen de 25 ml de la muestra con el tampón cambiado se cargó en la columna MonoQ HIPREP<sup>®</sup> 16/10. La columna se lavó con 2 volúmenes de columna de 20 mM Tris pH 8,0 y luego se eluyó utilizando un gradiente de volumen de columna 20 de 0 a 0,6 M de NaCl en 20 mM de Tris-HCl pH 8,0. Se recogieron fracciones de 10 ml para el paso de lavado y se recogieron fracciones de 6 ml del paso de elución. Las fracciones 40 de 54 fueron sometidas a análisis SDS-PAGE. SDS-PAGE en un 8-16% de gel sin manchas Tris-HCl (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU.) demostró que las muestras eran más de 95% puras.

**Ejemplo 25: efecto del polipéptido de *Aspergillus oryzae* que tiene actividad potenciadora amilolítica en la hidrólisis del almidón de maíz**

[0313] El polipéptido de *Aspergillus oryzae* que tiene actividad potenciadora amilolítica se evaluó para su capacidad para mejorar la hidrólisis del almidón de maíz por amiloglucosidasa de *Trametes cingulata*. La hidrólisis del almidón de

maíz se realizó con 5 g de almidón de maíz por litro de 1,75 mM de CaCl<sub>2</sub> -50 mM citrato sódico pH 5,0. Amiloglucosidasa de *Trametes cingulata*, obtenida como se describe en el ejemplo 13, se añadió a 2,0 mg por litro de concentración de proteína final. Las reacciones hidrolíticas se incubaron a temperatura ambiente durante toda la noche con o sin 45 mg de polipéptido de *Aspergillus oryzae* con actividad potenciadora amilolítica por litro. Para cada reacción, se preparó una única mezcla reactiva de 800 µl y luego se dividió en partes alícuotas por triplicado a 200 µl por pocillo en una placa de pocillos de 1ml de profundo AXYGEN<sup>®</sup>. Estándares de glucosa a 1000, 500, 250, 125, 62,5 y 0 mg por litro de 50 mM de tampón de citrato sódico pH 5,0 se añadieron por duplicado a 200 µl por pocillo. La placa se selló luego con una tapa de placa de 96 pocillos de silicona (Nalgene, Rochester, NY, EE. UU.) y se dejó durante toda la noche a temperatura ambiente.

[0314] Después de la incubación durante toda la noche, la placa se evaluó para glucosa utilizando un ensayo de glucosa-oxidasa. Cien microlitros de 0,5 M de NaOH se añadieron a cada pocillo de la placa (incluyendo estándares de glucosa) para parar las reacciones. Luego 20 µl de cada pocillo se transfirió a una placa de 96 pocillos de fondo plano, transparente, que contenía 200 µl por pocillo de reactivo de glucosa-oxidasa líquida y se incubó durante 7 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia a 490 nm se midió luego utilizando un lector de placa espectrofotométrico SPECTRAMAX<sup>®</sup> 340pc. La concentración de glucosa se determinó a partir de una línea recta ajustada a la concentración de glucosa contra la absorbancia a 490 nm para los estándares de glucosa.

[0315] Los resultados mostrados en la figura 13 demuestran que el polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica de *Aspergillus oryzae* mejoró la hidrólisis del almidón de maíz por la amiloglucosidasa de *Trametes cingulata*.

Listado de secuencias

[0316]

<110> Novozymes, Inc. Harris, Paul Wogulis, Mark

<120> Polipéptidos que tienen actividad potenciadora amilolítica y polinucleótidos que codifican los mismos

<130> 10929.204-WO

<150> US 61/116,605

<151> 2008-11-20

<160> 16

<170> Versión de patentIn 3.5

<210> 1

<211> 1276

<212> ADN

<213> *Neurospora crassa*

<400> 1

ES 2 526 867 T3

atgaagttct ccatcatctc ggttgccctt gcatcggcca taacggtcga cgcccatgga 60  
 tatttgacca ttccattcag tcgtacaaga cttggcgcag aggtaaaca ataccctgaa 120  
 gatcgttaga agattgatcg tgctgatttg tgttttctag gccggcttgg acacttgctc 180  
 cgagtgctcc attctggagc ccgtgacggc atggcccaac gttacggaag ccaaggctcg 240  
 cagaagcggc ccttgccggt acaatgcccg cgtcagcatc gactacaacc agcctgcgac 300  
 taactggggc aactctcctg tcgtgacgta cactgccggc gacactgtcg atgtccagtg 360  
 gtgcggtgac cacaacggcg accacgggtg catgttctcc taccgtatct gccaaacca 420  
 agagctggtc aacaaattcc tcaactcctg atatctccc accgaggcgg agaagcaggc 480  
 tgctgaggat tgcttcgaga agggcaccct tccctgcaca gatgtgaatg gccaatcttg 540  
 cgacttcagc cctgactgcc agcaaggcca ggcatgctgg aggaacgact ggttcagtaa 600  
 gttagcctgc atcagtagga agaagcatcc tgctaatcgt cgtgtgactt acttagcctg 660  
 caacgccttt caagctgaca gccgcggtg ctgccagggc gtcgacaacg ctgctctcgg 720  
 atcttgcttc accaccatcg ctggcggcta caccgtcacc aagaagatca agatacccaa 780  
 ctacatctcc ggccacacct tgctctcctt ccggtggaac tccttccaaa ctgctcaggt 840  
 ctacctctcg tgcgccgaca tcgccattgt cggcgacagc gcctccacca ccaaagtctc 900  
 tgccaccgcc acgactcttg tcaccagcag caagactgcc agcgcctctt gcacccccgc 960  
 cgccaccgtc gctgtgactt tcaaccacct cgccagcacc agctacggcg agtccatcaa 1020  
 gatcgttggc tcgatctcgc agctcggcag ctggagcgcc tcgtccggcg ttgccttgtc 1080  
 tgcgtcgcag tacaccacca gcaaccgct ttggactgcc acggtcagtc tcccggcggg 1140  
 caccaagttc gagtacaagt tcgtcaaggt gtctagcgaa ggcagtgccg tgacatggga 1200  
 gagcgatccc aataggtcgt atactgttcc tcagagctgc gctgagtcgg tagctgttga 1260  
 gtcgtcgtgg aagtag

5 <210> 2  
 <211> 385  
 <212> PRT  
 <213> *Neurospora crassa*

10 <400> 2

ES 2 526 867 T3

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

Asp Ala His Gly Tyr Leu Thr Ile Pro Phe Ser Arg Thr Arg Leu Gly  
20 25 30

Ala Glu Ala Gly Leu Asp Thr Cys Pro Glu Cys Ser Ile Leu Glu Pro  
35 40 45

Val Thr Ala Trp Pro Asn Val Thr Glu Ala Lys Val Gly Arg Ser Gly  
50 55 60

Pro Cys Gly Tyr Asn Ala Arg Val Ser Ile Asp Tyr Asn Gln Pro Ala  
65 70 75 80

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

Val Asp Val Gln Trp Cys Val Asp His Asn Gly Asp His Gly Gly Met  
100 105 110

Phe Ser Tyr Arg Ile Cys Gln Asp Gln Glu Leu Val Asn Lys Phe Leu  
115 120 125

Thr Pro Gly Tyr Leu Pro Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Ala Glu Asp  
130 135 140

Cys Phe Glu Lys Gly Thr Leu Pro Cys Thr Asp Val Asn Gly Gln Ser  
145 150 155 160

Cys Asp Phe Ser Pro Asp Cys Gln Gln Gly Gln Ala Cys Trp Arg Asn  
165 170 175

Asp Trp Phe Thr Cys Asn Ala Phe Gln Ala Asp Ser Arg Arg Gly Cys  
180 185 190

Gln Gly Val Asp Asn Ala Ala Leu Gly Ser Cys Phe Thr Thr Ile Ala  
195 200 205

Gly Gly Tyr Thr Val Thr Lys Lys Ile Lys Ile Pro Asn Tyr Ile Ser

ES 2 526 867 T3

Gly His Thr Leu Leu Ser Phe Arg Trp Asn Ser Phe Gln Thr Ala Gln  
 225 230 235 240

Val Tyr Leu Ser Cys Ala Asp Ile Ala Ile Val Gly Asp Ser Ala Ser  
 245 250 255

Thr Thr Lys Val Ser Ala Thr Ala Thr Thr Leu Val Thr Ser Ser Lys  
 260 265 270

Thr Ala Ser Ala Ser Cys Thr Pro Ala Ala Thr Val Ala Val Thr Phe  
 275 280 285

Asn His Leu Ala Ser Thr Ser Tyr Gly Glu Ser Ile Lys Ile Val Gly  
 290 295 300

Ser Ile Ser Gln Leu Gly Ser Trp Ser Ala Ser Ser Gly Val Ala Leu  
 305 310 315 320

Ser Ala Ser Gln Tyr Thr Thr Ser Asn Pro Leu Trp Thr Ala Thr Val  
 325 330 335

Ser Leu Pro Ala Gly Thr Lys Phe Glu Tyr Lys Phe Val Lys Val Ser  
 340 345 350

Ser Glu Gly Ser Ala Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Ser Tyr  
 355 360 365

Thr Val Pro Gln Ser Cys Ala Glu Ser Val Ala Val Glu Ser Ser Trp  
 370 375 380

Lys

5 385

<210> 3

<211> 1217

<212> ADN

10 <213> *Aspergillus nidulans*

<400> 3

ES 2 526 867 T3

atgaagtctc tcctcgccct tgtggcagga aatctcgtca ctgctgtgtc tggatcatggg 60  
tatttgactg tccccgcaag ccgtaccogt ctgggcttcg aggtaagcaa atctcagtct 120  
gtttcagtat gcaccaggtt ctaatgcgtg cgtgagtata ggctggaata gatacgtgcc 180  
cggaatgctc gatcctcgag ccggtatctg catggccaga tctgaactgcg gccaggttg 240  
gtagaagtgg tccctgcggt tacaacgctc gggtagagtgt ggattacaat cagcctggag 300  
attactgggg aaacgagccg gtggctctct atactgctgg tgatgtcgtt gaagtacagt 360  
ggtagttaga ccacaatggg gatcatgggt gaatgtttac atatggtatc tgccagaacc 420  
aaaccttggg ggacctgttc ttgacctctg gctatctgcc acaaacgaa gagaagcaag 480  
ctgcagaaga ctgcttctta gaagggaac tcagttgcct tcatgtccc ggacagacct 540  
gcaattacaa ccccgattgc agtgcagggt agccatgta tcaaacgac tggttcacct 600  
gcaatgcttt ccaggcagac aacaatcgcg catgccaaagg ggtcgacggg gcagcgttga 660  
actcctgcat gaccacgatc gccggtggat acaccgtgac caagaagatc aagatccccg 720  
attactcatc cagccatacc ctctcctgat tcagatggaa ttcgctccag acagcccagg 780  
tgtatctgca ctgcgctgat attgctattg tgggtggtag tggttcatca cctagcccta 840  
cttcgaccac atccactgct acctcaacga ctacacctc ttccaccagc tgcgcgtccg 900  
caatctctat accggtgacg ttcaacgcgc ttgttacaac tacctatggt gagaacgtgt 960  
accttgccgg atccatcagc cagctagggt cctggctgac tagctctgcc gttgctctat 1020  
ctgccagcaa atatagttcg tccagcccac tatggaccgt gacagtcgac ctcccagtcg 1080  
gggccacatt cgaatacaag tatatcaaga aggagtcgga tggaagtatt gtctgggaga 1140  
gtggcccga caggagctac actgtgccga ctggctgttc ggggacaacc gccacagaga 1200  
gtggtgcatg gcggtag 1217

5 <210> 4  
<211> 385  
<212> PRT  
<213> *Aspergillus nidulans*

10 <400> 4

ES 2 526 867 T3

Met Lys Ser Leu Leu Ala Leu Val Ala Gly Asn Leu Val Thr Ala Val  
 1 5 10 15

Ser Gly His Gly Tyr Leu Thr Val Pro Ala Ser Arg Thr Arg Leu Gly  
 20 25 30

Phe Glu Ala Gly Ile Asp Thr Cys Pro Glu Cys Ser Ile Leu Glu Pro  
 35 40 45

Val Ser Ala Trp Pro Asp Leu Thr Ala Ala Gln Val Gly Arg Ser Gly  
 50 55 60

Pro Cys Gly Tyr Asn Ala Arg Val Ser Val Asp Tyr Asn Gln Pro Gly  
 65 70 75 80

Asp Tyr Trp Gly Asn Glu Pro Val Val Ser Tyr Thr Ala Gly Asp Val  
 85 90 95

Val Glu Val Gln Trp Cys Val Asp His Asn Gly Asp His Gly Gly Met



ES 2 526 867 T3

355 360 365

Val Pro Thr Gly Cys Ser Gly Thr Thr Ala Thr Glu Ser Gly Ala Trp  
 370 375 380

Arg  
 385

<210> 5  
 <211> 756  
 <212> ADN  
 <213> *Aspergillus oryzae*

<400> 5

atgaaggtct tgcgccatt actctccctc agtttagcta cctccgtagc aggccatggc 60  
 tacatgtaca tcccttctag ccgaaccggt cttgggtcagc aggccggtat cgactcatgc 120  
 cctgagtggtg cgatcctcga gcccgtttcc tcttggtccag acctcgatgc ggcaccagtt 180  
 ggccgcagtg gaccctgcgg ttacaacgcc cgtgacagta tcgactacaa ccagccaacc 240  
 accaactggg gctccgacgc tgtgcaaagc tacagccccg gcgaagagat cgaagtacag 300  
 tgggtgtgttg accacaacgg tgaccatggt ggcatgttca cgtaccggat ctgtcaagac 360  
 cagagcattg tcgacaagtt tctcgaccog tcttaoctgc ccaccaacga cgagaagcag 420  
 gctgctgagg attgtttcga cgcaggtctg ctaccctgca cggatgtcag tggccaggag 480  
 tgtgggtaca gtgctgattg taccgagggc gaggcctgct ggcgtaatga ttggtttacg 540  
 tgcaatggct tcgaggcttc tgaccggcct aagtgccagg gtgttgacaa tgcagagttg 600  
 aactcctgct ataccagtat tgctggtgga tacacggtga ccaagaaggt caagctgccg 660  
 gagtacactt ccaaccatac cttgatttcg ttcaagtgga actcgttcca gactggccag 720  
 10 atttacctgt cttgtgctga tattgccatt cagtga 756

<210> 6  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 15 <213> *Aspergillus oryzae*

<400> 6





<210> 7  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> *Neurospora crassa*  
 5  
 <400> 7  
 actggattta ccatgaagtt ctccatcatc tcggtt 36  
 <210> 8  
 10 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> *Neurospora crassa*  
 <400> 8  
 15 tcacctctag ttaattaact actccacga cgactcaa 38  
 <210> 9  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 20 <213> *Neurospora crassa*  
 <400> 9  
 ccacacttct cttccttct c 21  
 25 <210> 10  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> *Neurospora crassa*  
 30 <400> 10  
 ccccatcctt taactatagc g 21  
 <210> 11  
 <211> 36  
 35 <212> ADN  
 <213> *Aspergillus nidulans*  
 <400> 11  
 40 actggattta ccatgaagtc tctcctgcc ctgtg 36  
 <210> 12  
 <211> 38  
 <212> ADN  
 <213> *Aspergillus nidulans*  
 45 <400> 12  
 tcacctctag ttaattaact accgcatgc accactct 38  
 <210> 13  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> *Trametes cingulata*  
 50 <400> 13  
 55 ttggatcca ccatgcggtt cacgctctc acc 33  
 <210> 14  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 60 <213> *Trametes cingulata*  
 <400> 14  
 ttctcgagc taccgccagg tgcgttctg 30  
 65 <210> 15  
 <211> 28

<212> ADN  
<213> *Aspergillus oryzae*

<400> 15  
5 cgaggatcca acataatgaa ggtcttcg 28

<210> 16  
<211> 26  
<212> ADN  
10 <213> *Aspergillus oryzae*

<400> 16  
agcaagcttc agtgacgaaa tgccat 26

15

**REIVINDICACIONES**

1. Proceso para degradar un material que contiene almidón, que comprende: tratamiento del material que contiene almidón con una composición enzimática que comprende una o más (diferentes) enzimas amilolíticas en presencia de un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica seleccionado de:
- 5
- (i) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID n°: 4;
  - 10 (ii) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n°: 3.
2. Proceso según la reivindicación 1, que comprende además la recuperación del material que contiene almidón degradado.
- 15
3. Proceso para producir un producto sacarificado a partir de un material que contiene almidón, que comprende:
- (a) licuefacción del material que contiene almidón con una alfa-amilasa; y
  - 20 (b) sacarificación del material que contiene almidón licuado con una composición enzimática que comprende una o más (diferentes) enzimas amilolíticas;
- donde el paso (a), el paso (b) o los pasos (a) y (b) se realizan en presencia de un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica seleccionado del grupo que consiste en:
- 25
- (i) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID n°: 4;
  - 30 (ii) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEC ID n°: 3.
4. Proceso según la reivindicación 3, que comprende además (c) recuperación del producto sacarificado a partir del material que contiene almidón sacarificado.
- 35
5. Proceso para producir un producto de fermentación, que comprende:
- (a) sacarificación de un material que contiene almidón con una composición enzimática que comprende una o más (diferentes) enzimas amilolíticas en presencia de un polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica seleccionado de:
  - 40 (i) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID n°: 4;
  - 45 (ii) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 3; y
- (b) fermentación del material que contiene almidón sacarificado con uno o más (diferentes) microorganismos fermentativos para producir un producto de fermentación.
- 50
6. Proceso según la reivindicación 5, que comprende además (c) recuperación del producto de fermentación a partir de la fermentación.
7. Proceso para producir un producto de fermentación a partir de un material que contiene almidón, que comprende:
- 55
- (a) licuefacción del material que contiene almidón con una alfa-amilasa;
  - (b) sacarificación del material que contiene almidón licuado con una composición enzimática que comprende una o más (diferentes) enzimas amilolíticas; y
  - 60 (c) fermentación del material que contiene almidón sacarificado en presencia de uno o más (diferentes) organismos fermentativos para producir el producto de fermentación;
- donde el paso (a), el paso (b) o los pasos (a) y (b) se realizan en presencia del polipéptido que tiene actividad potenciadora amilolítica seleccionado de:
- 65

(i) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID n°: 4;

5 (ii) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n°: 3.

8. Proceso según la reivindicación 7, que comprende además (d) recuperación del producto de fermentación a partir de la fermentación.

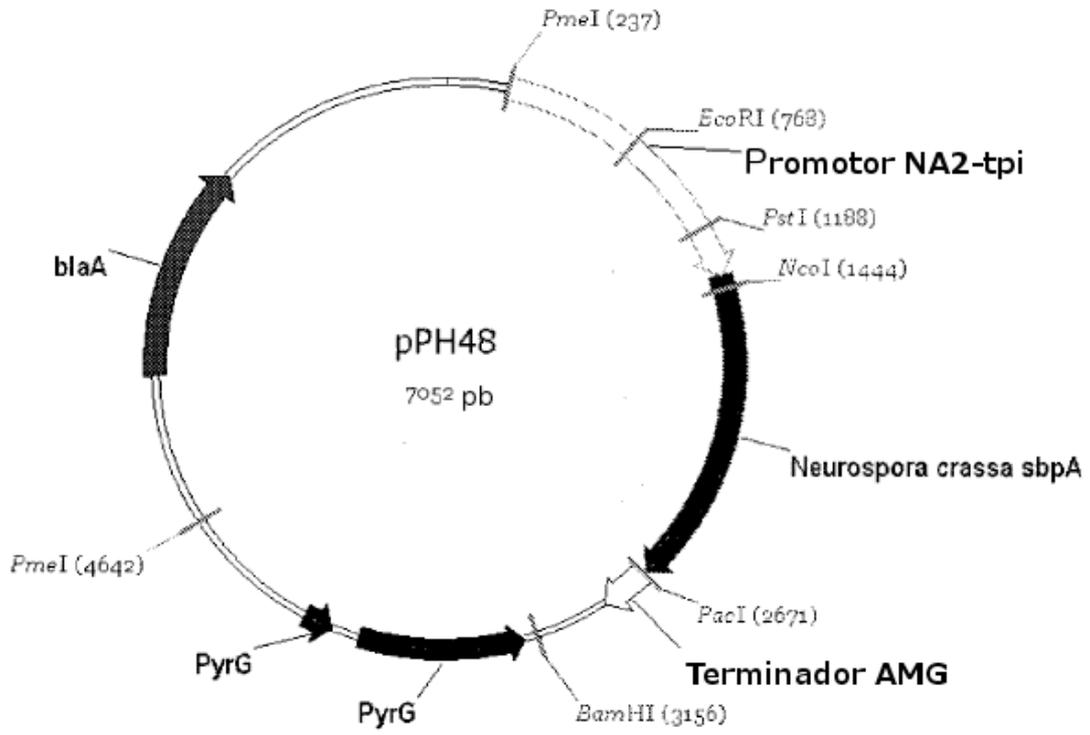


Fig. 1

ATGAAGTTCTCCATCATCTCGGTTGCCCTTGCATCGGCCATAACGGTCGACGCCCATGGATATTTGACCATTCCA 75  
 M K F S I I S V A L A S A I T V D A H G Y L T I P  
 TTCAGTCGTACAAGACTTGGCGCAGAGGTAACAAATACCCTGAAGATCGTTAGAAGATTGATCGTGCTGATTTG 150  
 F S R T R L G A E  
 TGTTTTCTAGGCCGGCTTGGACACTTGTCCCGAGTGCTCCATTCTGGAGCCCGTGACGGCATGGCCCAACGTTAC 225  
 A G L D T C P E C S I L E P V T A W P N V T  
 GGAAGCCAAGGTCGGCAGAAGCGGTCCTTGGCGGCTACAATGCCCGCGTCAGCATCGACTACAACCAGCCTGCGAC 300  
 E A K V G R S G P C G Y N A R V S I D Y N Q P A T  
 TAACTGGGGTAACTCTCCTGTGCTGACGTACTGCGCGGACACTGTCGATGTCCAGTGGTGGTGGTGGACACAA 375  
 N W G N S P V V T Y T A G D T V D V Q W C V D H N  
 CGGCGACCCGGTGGCATGTTCTCCTACCGTATCTGCCAAGACCAAGAGCTGGTCAACAAATTCCTCACTCCTGG 450  
 G D H G G M F S Y R I C Q D Q E L V N K F L T P G  
 ATATCTCCCGACCGAGGCGAGAAGCAGGCTGCTGAGGATTGCTTCGAGAAGGGCACCCCTCCCTGCACAGATGT 525  
 Y L P T E A E K Q A A E D C F E K G T L P C T D V  
 GAATGGCCAATCTTGCAGCTTCCAGCCTGACTGCCAGCAAGGCCAGGCATGCTGGAGGAACGACTGGTTTCAGTAA 600  
 N G Q S C D F S P D C Q Q G Q A C W R N D W F  
 GTTAGCCTGCATCAGTAGGAAGAAGCATCCTGCTAATCGTCGTGTGACTTACTTAGCCTGCAACGCCCTTTCAAGC 675  
 T C N A F Q A  
 TGACAGCCCGCGTGGCTGCCAGGGCGTCGACAAAGCTGCTCTCGGATCTTGCTTCACCACCATCGCTGGCGGCTA 750  
 D S R R G C Q G V D N A A L G S C F T T I A G G Y  
 CACCGTCACCAAGAAGATCAAGATACCCAACCTACATCTCCGGCCACACCTTGCTCTCCTTCCGGTGGAACTCCTT 825  
 T V T K K I K I P N Y I S G H T L L S F R W N S F  
 CCAAAGTCTCAGGTCTACCTCTCGTGGCGGACATCGCCATTGTGCGCGACAGCGCCTCCACCACCAAGTCTC 900  
 Q T A Q V Y L S C A D I A I V G D S A S T T K V S  
 TGCCACCGCCACGACTCTTGTGACCAGCAGCAAGACTGCCAGCGCCTCTTGACCCCCGCGCCACCGTTCGCTGT 975  
 A T A T T L V T S S K T A S A S C T P A A T V A V  
 GACTTTCACCAACCTCGCCAGCACCAGCTACGGCGAGTCCATCAAGATCGTTGGTTCGATCTCGCAGCTCGGCAG 1050  
 T F N H L A S T S Y G E S I K I V G S I S Q L G S  
 CTGGAGCGCCTCGTCCGGCGTTGCCTTGTCTGCGTTCGAGTACACCACCAGCAACCCGCTTGGACTGCCACGGT 1125  
 W S A S S G V A L S A S Q Y T T S N P L W T A T V  
 CAGTCTCCCGCGGGCACCAAGTTCGAGTACAAGTTCGTCGAAGGTGTCTAGCGAAGGCAGTCCCGTGACATGGGA 1200  
 S L P A G T K F E Y K F V K V S S E G S A V T W E  
 GAGCGATCCCAATAGGTCGTATACTGTTCTCCTCAGAGCTGCGCTGAGTCGGTAGCTGTTGAGTCGTCGTGGAAGTA 1275  
 S D P N R S Y T V P Q S C A E S V A V E S S W K .  
 G 1276

Fig. 2

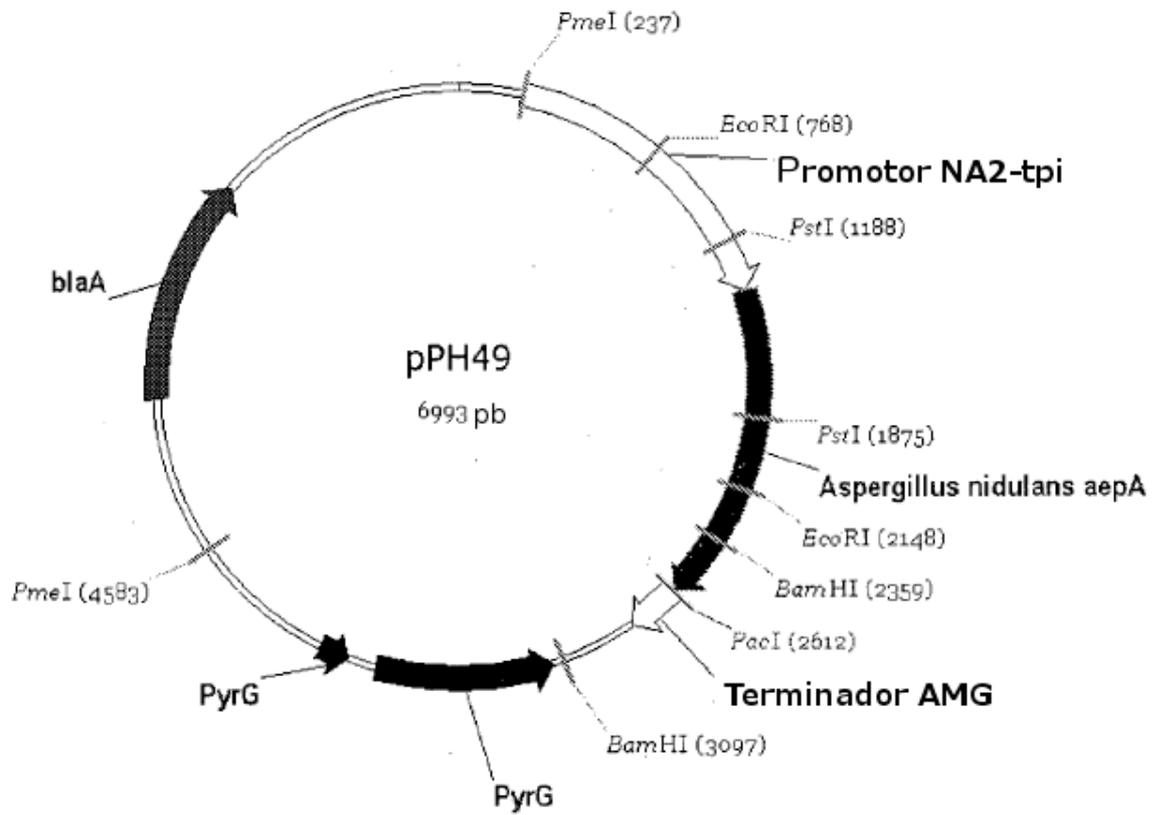


Fig. 3

ATGAAGTCTCTCCTCGCCCTTGTGGCAGGAAATCTCGTCACTGCTGTGTCTGGTCATGGGTATTTGACTGTCCCC 75  
 M K S L L A L V A G N L V T A V S G H G Y L T V P  
 GCAAGCCGTACCCGTCTGGGCTTCGAGGTAAGCAAATCTCAGTCTGTTTCAGTATGCACCAGGTTCTAATGCCGTG 150  
 A S R T R L G F E  
 CGTGAGTATAGGCTGGAATAGATACGTGCCCGGAATGCTCGATCCTCGAGCCGGTATCTGCATGGCCAGATCTGA 225  
 A G I D T C P E C S I L E P V S A W P D L  
 CTGCGGCCAGGTTGGTAGAAGTGGTCCCTGCGGTTACAACGCTCGGGTGAGTGTGGATTACAATCAGCCTGGAG 300  
 T A A Q V G R S G P C G Y N A R V S V D Y N Q P G  
 ATTACTGGGGAAACGAGCCGGTGGTCTCTATACTGCTGGTGTGTCGTTGAAGTACAGTGGTGTGTAGACCACA 375  
 D Y W G N E P V V S Y T A G D V V E V Q W C V D H  
 ATGGGATCATGGTGAATGTTACATATGGTATCTGCCAGAACCAAACCTTGGTGGACCTGTTCTTGACCCCTG 450  
 N G D H G G M F T Y G I C Q N Q T L V D L F L T P  
 GCTATCTGCCAACAAGAGAAGCAAGCTGCAGAAGACTGCTTCTTAGAAGGTGAACCTCAGTTGCCTCATG 525  
 G Y L P T N E E K Q A A E D C F L E G E L S C L H  
 TCCCCGACAGACCTGCAATTACAACCCCGATTGCAGTGCAGGTGAGCCATGTTATCAAAACGACTGGTTCACCT 600  
 V P G Q T C N Y N P D C S A G E P C Y Q N D W F T  
 GCAATGCTTTCCAGGCAGACAACAATCGCGCATGCCAAGGGGTGACCGGGGCAGCGTTGAACTCCTGCATGACCA 675  
 C N A F Q A D N N R A C Q G V D G A A L N S C M T  
 CGATCGCCGGTGGATAACCCGTGACCAAGAAGATCAAGATCCCCGATTACTCATCCAGCCATAACCTCCTCCGAT 750  
 T I A G G Y T V T K K I K I P D Y S S S H T L L R  
 TCAGATGGAATTCGTTCCAGACAGCCCAGGTGTATCTGCACTGCGCTGATATTGCTATTGTGGGTGGTAGTGGTT 825  
 F R W N S F Q T A Q V Y L H C A D I A I V G G S G  
 CATCACCTAGCCCTACTTCGACCACATCCACTGCTACCTCAACGACTACACCTTCTTCCACCAGCTGCGCGTCCG 900  
 S S P S P T S T T S T A T S T T T P S S T S C A S  
 CAATCTCTATACCCGGTGACGTTCAACGCGCTTGTTAACTACCTATGGTGAGAACGTGTACCTTGCCGGATCCA 975  
 A I S I P V T F N A L V T T T Y G E N V Y L A G S  
 TCAGCCAGCTAGGTTCTGGTTCGACTAGCTCTGCCGTTGCTCTATCTGCCAGCAAATATAGTTCGTCCAGCCCAC 1050  
 I S Q L G S W S T S S A V A L S A S K Y S S S S P  
 TATGGACCGTGACAGTCGACCTCCCAGTCGGGGCCACATTCGAATACAAGTATATCAAGAAGGAGTCGGATGGAA 1125  
 L W T V T V D L P V G A T F E Y K Y I K K E S D G  
 GTATTGTCTGGGAGAGTGGCCGAACAGGAGCTACACTGTGCCGACTGGCTGTTCGGGGACACCCGCCACAGAGA 1200  
 S I V W E S G P N R S Y T V P T G C S G T T A T E  
 GTGGTGCATGGCCGGTAG 1217  
 S G A W R .

Fig. 4

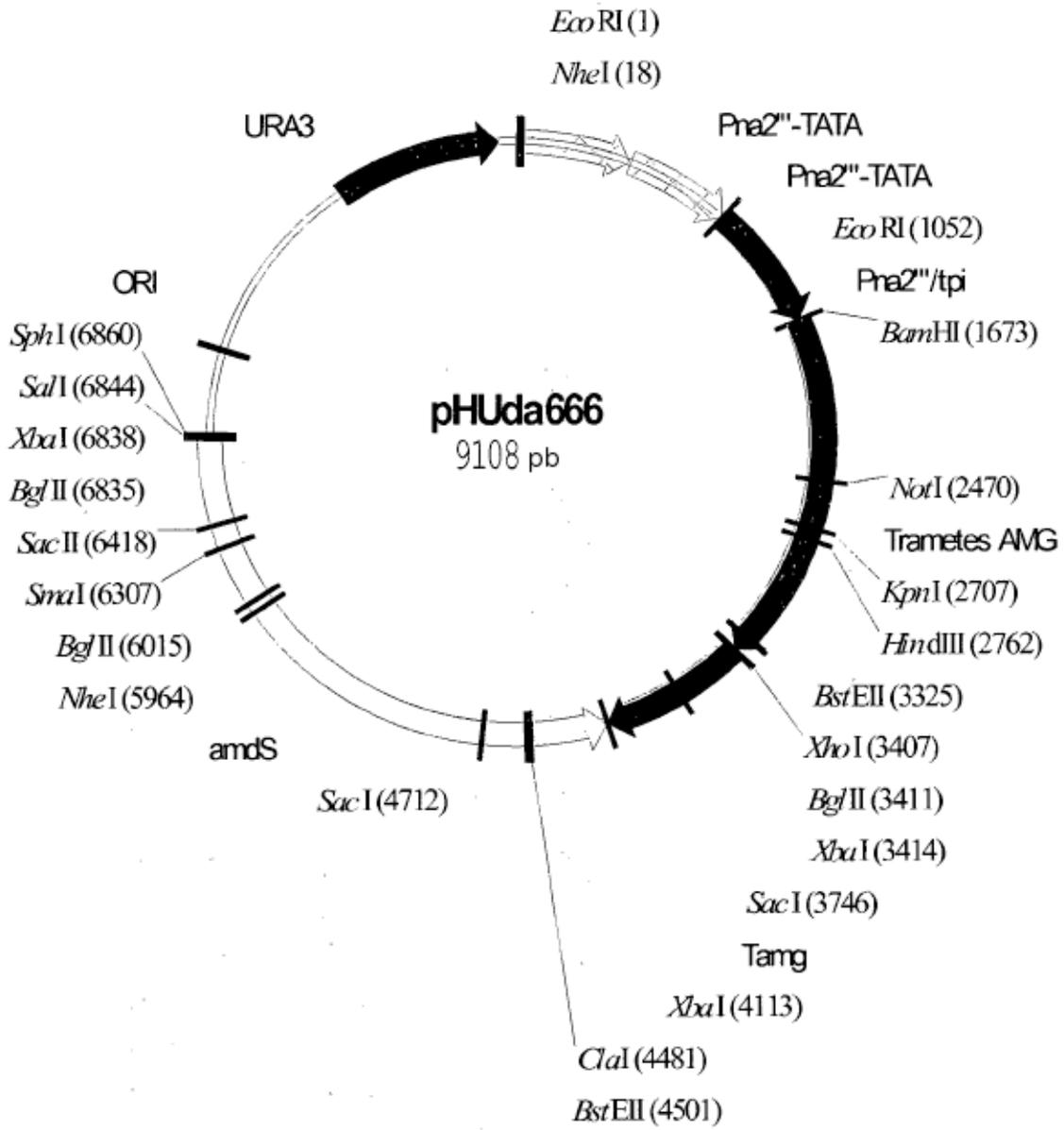


Fig. 5

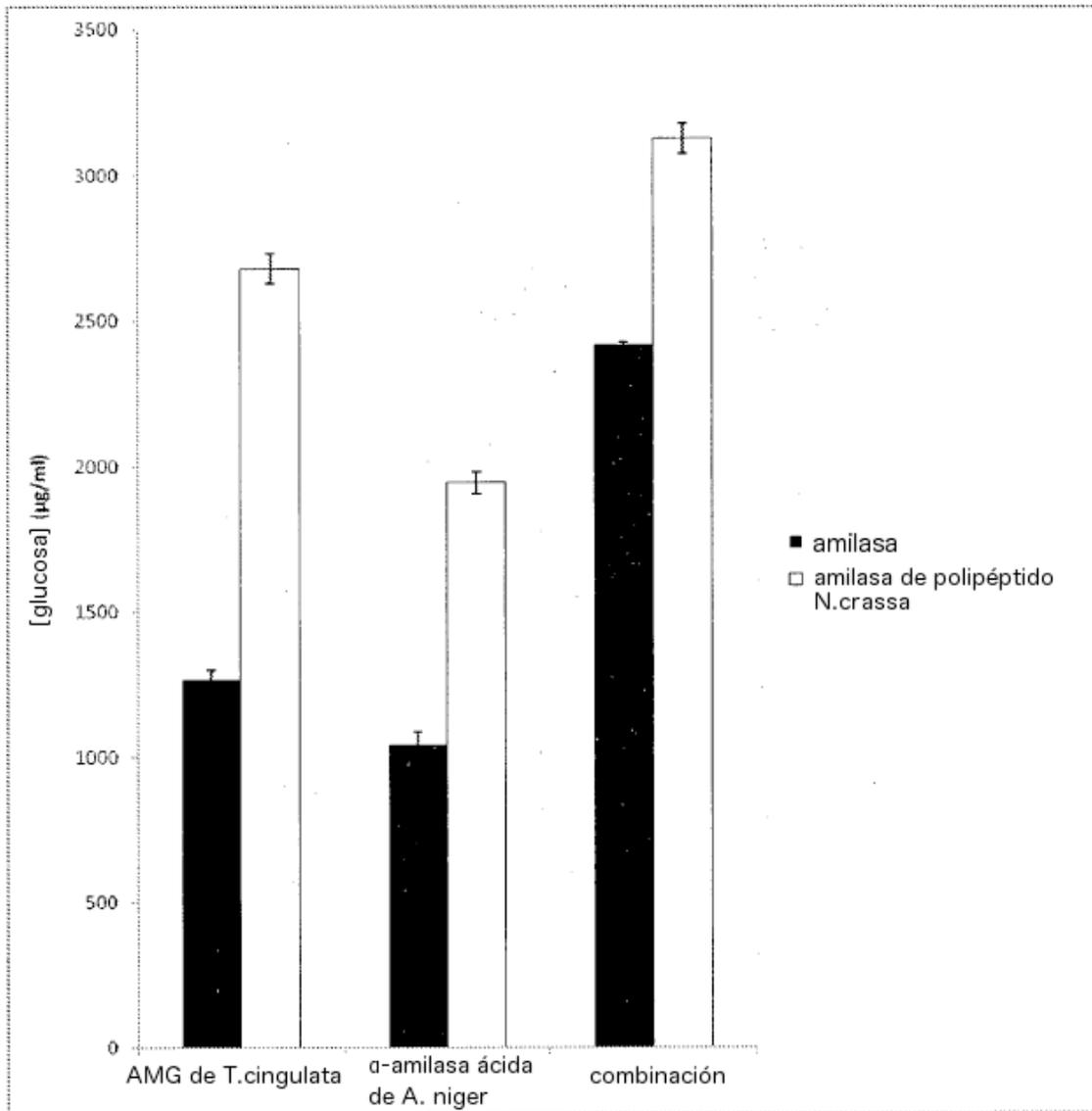


Fig. 6

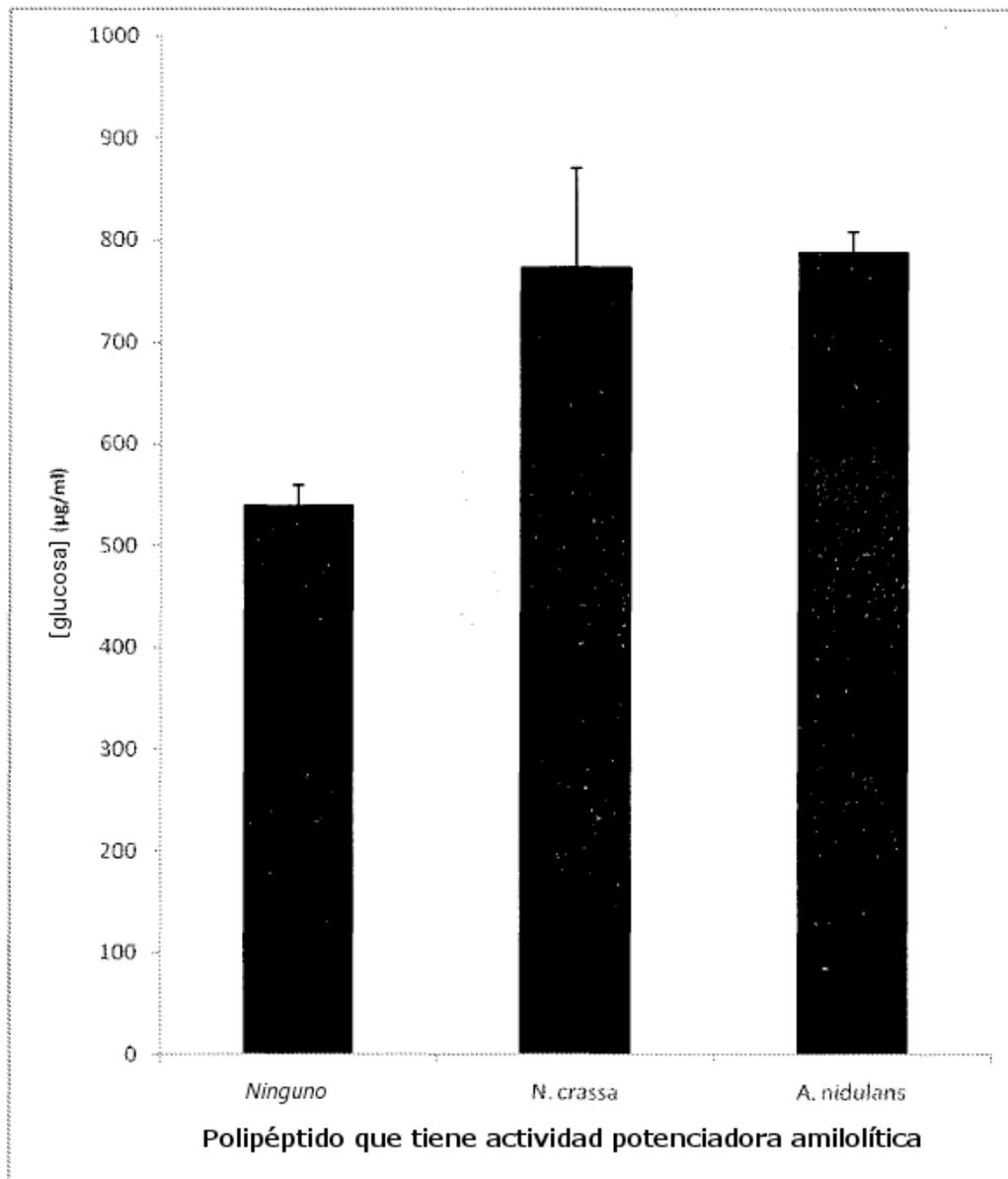


Fig. 7

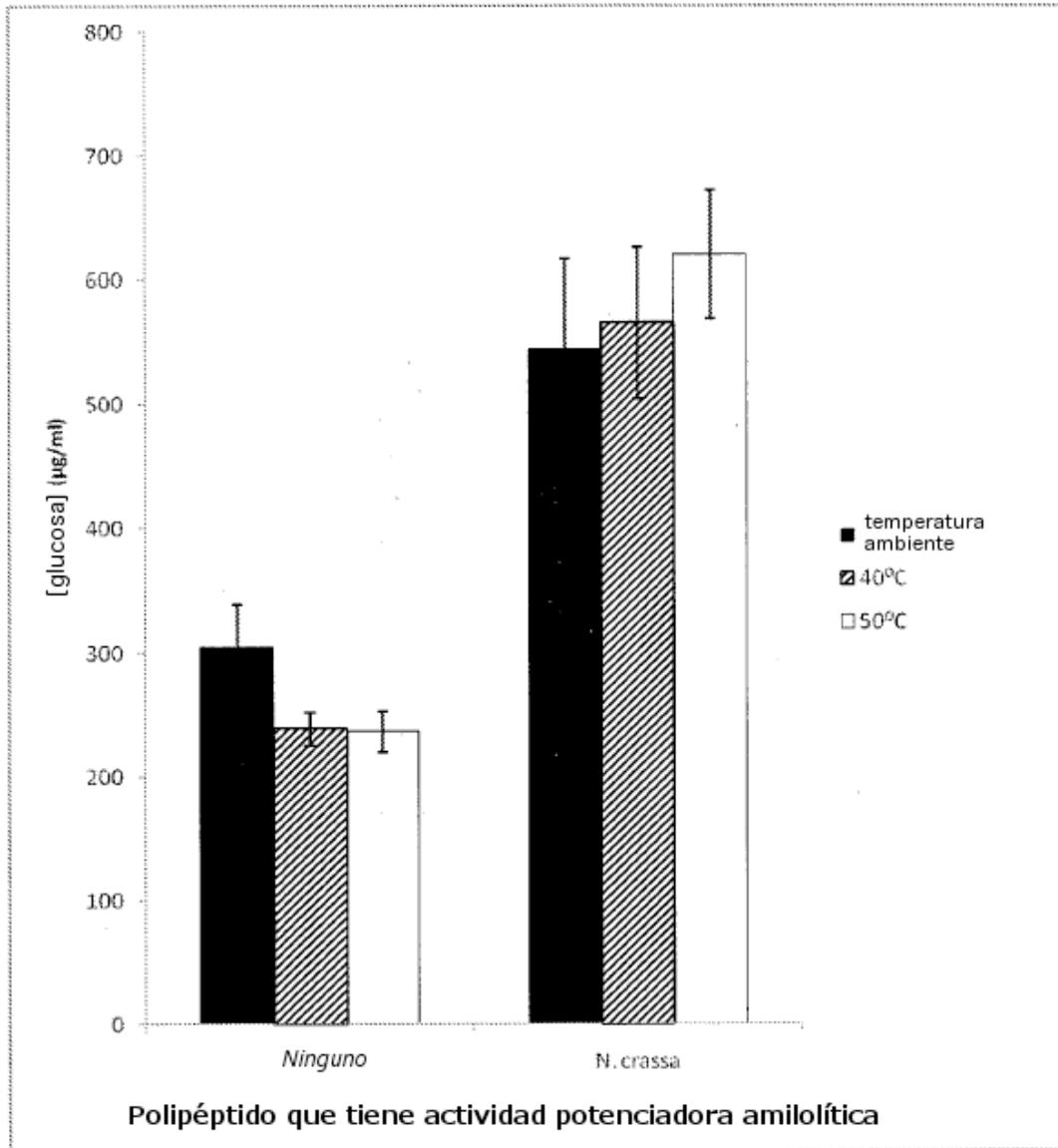


Fig. 8

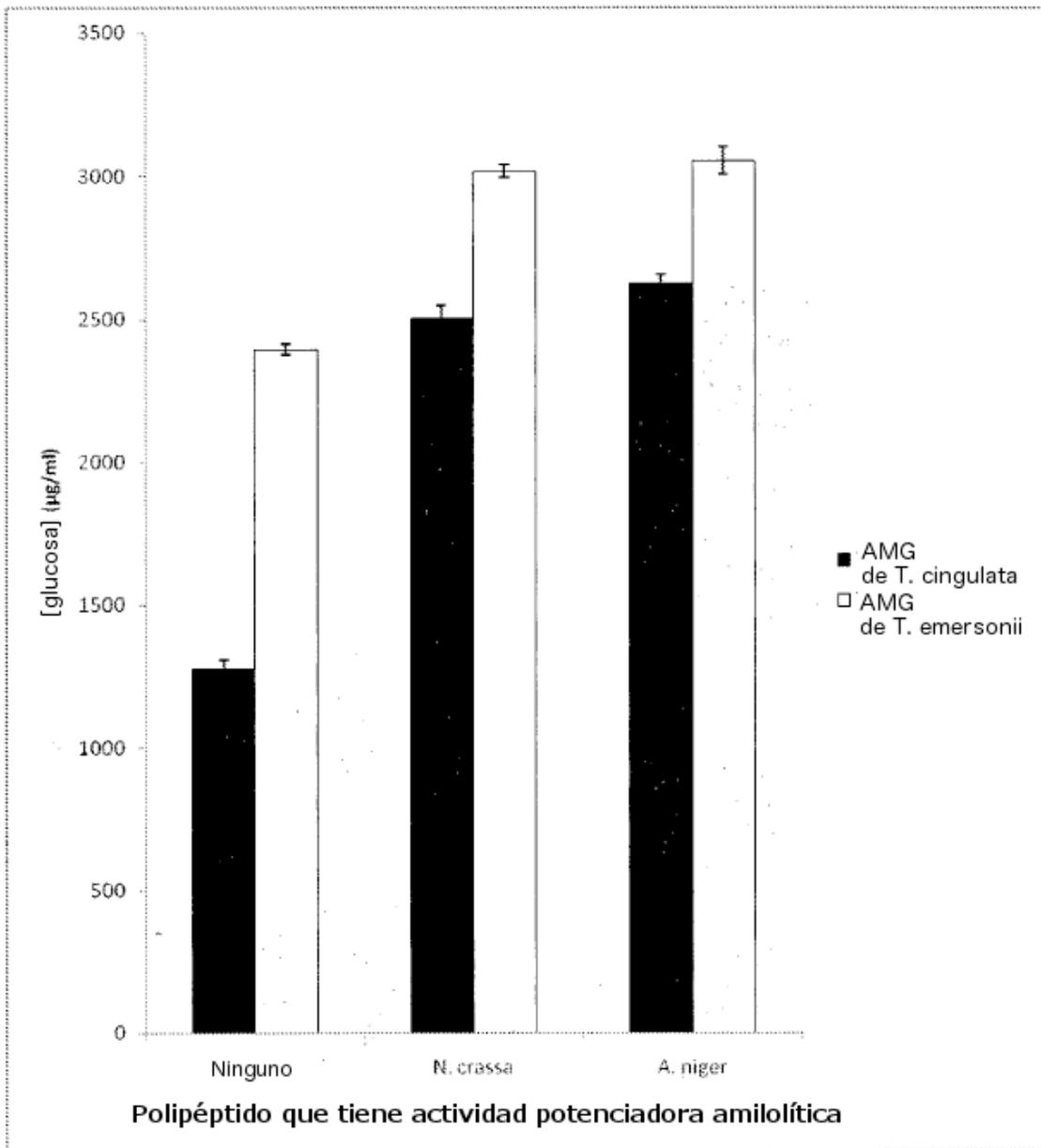


Fig. 9

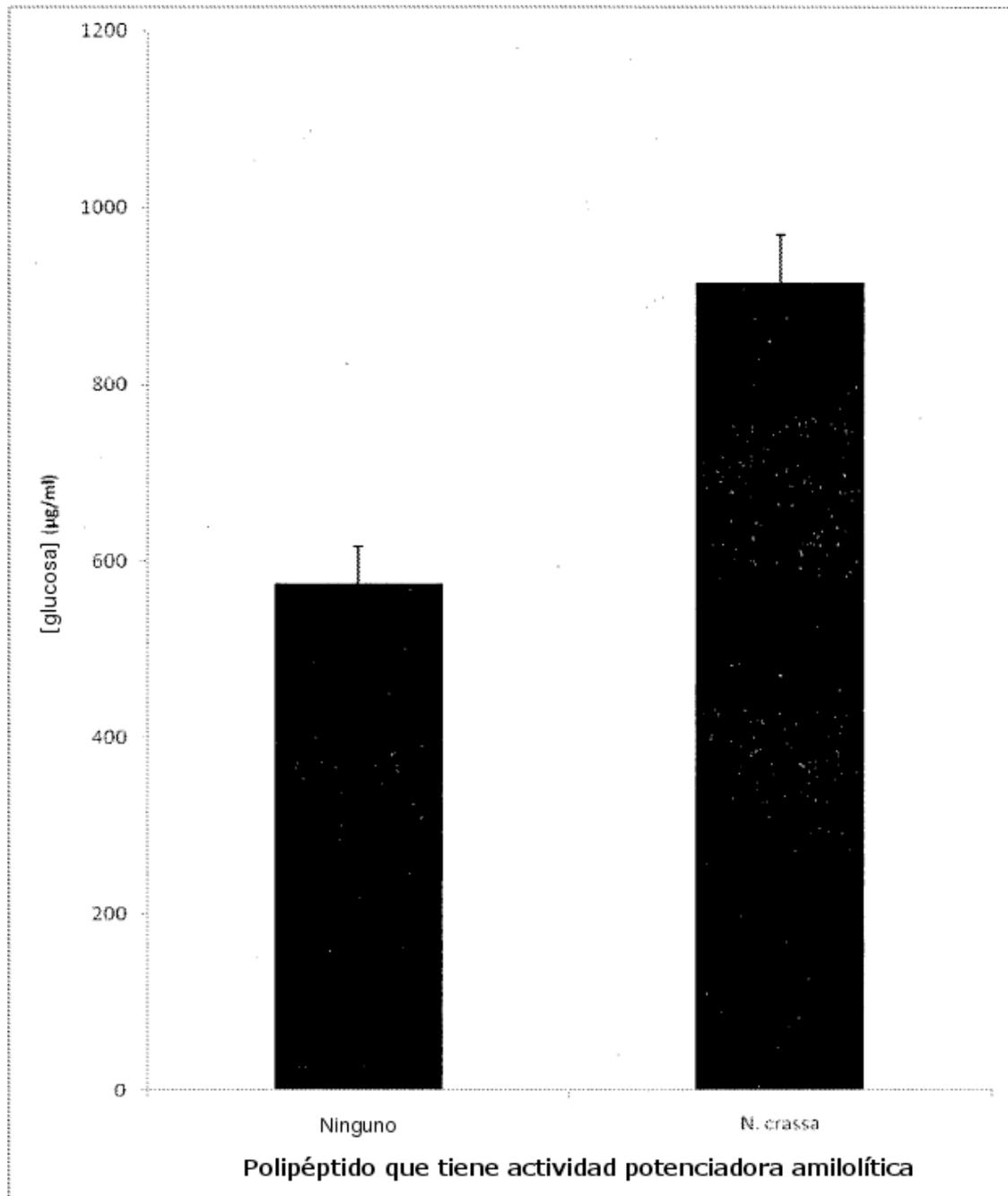


Fig. 10

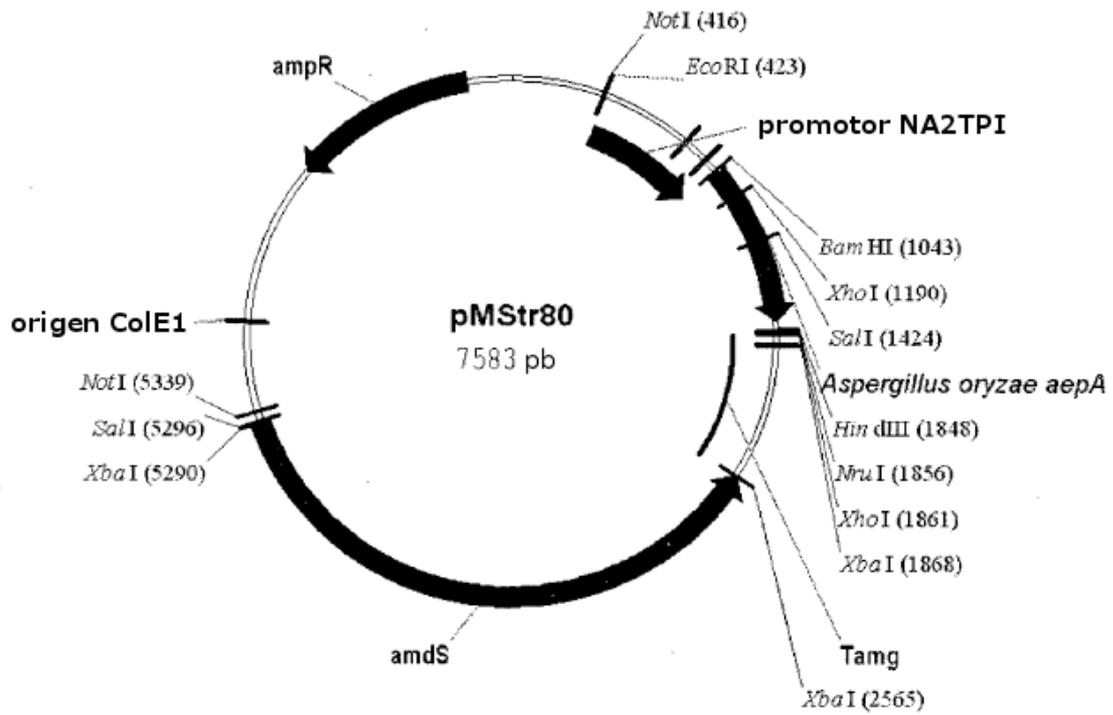


Fig. 11

```

ATGAAGGTCTTCGCCCCATTACTCTCCCTCAGTTTAGCTACCTCCGTAGCAGGCCATGGCTACATGTACATCCCT 75
M K V F A P L L S L S L A T S V A G H G Y M Y I P
TCTAGCCGAACCCGTCTTGGTCACGAGGCCGGTATCGACTCATGCCCTGAGTGTGCGATCCTCGAGCCCGTTTCC 150
S S R T R L G H E A G I D S C P E C A I L E P V S
TCCTGGCCAGACCTCGATGCGGCACCAGTTGGCCGACAGTGGACCCCTGCGGTTACAACGCCCCGTGACAGTATCGAC 225
S W P D L D A A P V G R S G P C G Y N A R D S I D
TACAACCAGCCAACCACCAACTGGGGCTCCGACGCTGTGCAAAGCTACAGCCCCGGCGAAGAGATCGAAGTACAG 300
Y N Q P T T N W G S D A V Q S Y S P G E E I E V Q
TGGTGTGTTGACCACAACGGTGACCATGGTGGCATGTTACAGTACCGGATCTGTCAAGACCAGAGCATTGTCGAC 375
W C V D H N G D H G G M F T Y R I C Q D Q S I V D
AAGTTTCTCGACCCGTCTTACCTGCCACCAACGACGAGAAGCAGGCTGCTGAGGATGTTTTCGACGCAGGTCTG 450
K F L D P S Y L P T N D E K Q A A E D C F D A G L
CTACCCTGCACGGATGTCAGTGGCCAGGAGTGTGGGTACAGTGCAGGATTGTACCGAGGGCGAGGCCTGCTGGCGT 525
L P C T D V S G Q E C G Y S A D C T E G E A C W R
AATGATTGGTTTACGTGCAATGGCTTCGAGGCTTCTGACCGGCCTAAGTGCCAGGGTGTGACAATGCAGAGTTG 600
N D W F T C N G F E A S D R P K C Q G V D N A E L
AACTCCTGCTATACCAGTATTGCTGGTGGATACACGGTGACCAAGAAGGTCAAGCTGCCGGAGTACACTTCCAAC 675
N S C Y T S I A G G Y T V T K K V K L P E Y T S N
CATACCTTGATTTCGTTCAAGTGGAACTCGTTCCAGACTGGCCAGATTTACCTGTCTTGTGCTGATATTGCCATT 750
H T L I S F K W N S F Q T G Q I Y L S C A D I A I
CAGTGA 756
Q .

```

Fig. 12

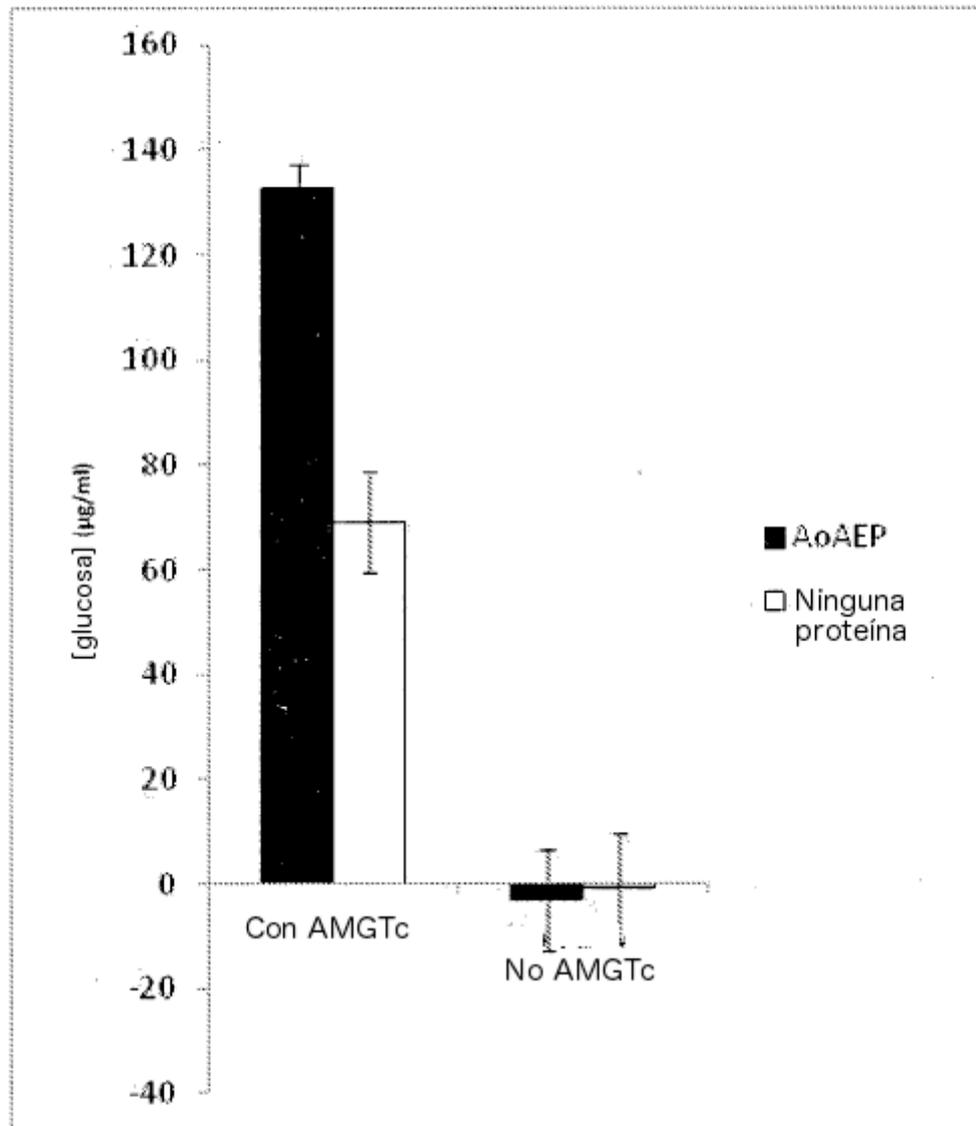


Fig. 13