(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 534 066**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/34 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)
C12P 7/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2010** **E 10784937 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015** **EP 2507370**

(54) Título: **Polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa y polinucleótidos que codifican los mismos**

(30) Prioridad:

30.11.2009 US 264971 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.04.2015

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

LANDVIK, SARA;
AYABE, KEIICHI y
COWARD-KELLY, GUILLERMO

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 534 066 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

Polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa y polinucleótidos que codifican los mismos

Referencia a un listado de secuencias

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

Referencia a un depósito de material biológico

[0002] Esta solicitud contiene una referencia a un depósito de material biológico. Para información completa véase el último párrafo de la descripción.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

[0003] La presente invención se refiere a polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos. La invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores y células huésped que comprenden los polinucleótidos al igual que métodos para producir y utilizar los polipéptidos y para usar las glucoamilasas de la invención para conversión de almidón para producir productos de fermentación, tal como etanol y jarabes, tal como glucosa. La invención también se refiere a una composición que comprende una glucoamilasa de la invención.

Descripción de las técnicas relacionadas

[0004] Glucoamilasa (1,4-alfa-D-glucano glucohidrolasa, EC 3.2.1.3) es una enzima que cataliza la liberación de D-glucosa a partir de las extremidades no-reducidas de las moléculas de oligo o polisacáridos relacionadas o de almidón. Las glucoamilasas son producidas por diferentes hongos filamentosos y levadura, siendo aquellos de *Aspergillus* los más importantes comercialmente.

[0005] Comercialmente, las glucoamilasas se utilizan para convertir material amiláceo, que ya está parcialmente hidrolizado por una alfa-amilasa, en glucosa. La glucosa puede luego ser convertida directa o indirectamente en un producto de fermentación utilizando un organismo fermentador. Ejemplos de productos de fermentación comerciales incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol, 1,3-propanediol), ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, gluconato, ácido láctico, ácido succínico, ácido 2,5-diketo-D-gluconico), cetonas (por ejemplo, acetona), aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico), gases (por ejemplo, H_2 y CO_2) y compuestos más complejos, incluyendo, por ejemplo, antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina), enzimas, vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B_{12}, beta-caroteno), hormonas y otros compuestos que son difíciles de producir sintéticamente. Los procesos de fermentación se usan también comúnmente en las industrias del alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino) y de los productos lácteos (por ejemplo, en la producción de yogur y queso).

[0006] El producto final también puede ser un jarabe. Por ejemplo, el producto final puede ser glucosa, pero también puede ser convertido, por ejemplo, por una glucosa isomerasa en fructosa o una mezcla compuesta casi igualmente de glucosa y fructosa. Esta mezcla, o una mezcla más enriquecida con fructosa, es el jarabe de maíz rico en fructosa (HFCS) usado más frecuentemente comercializado en todo el mundo.

[0007] Es un objeto de la presente invención proporcionar polipéptidos que tengan actividad de glucoamilasa y polinucleótidos que codifiquen los polipéptidos y que proporcionen un rendimiento elevado en los procesos de producción del producto de fermentación, tales como los procesos de producción de etanol, incluyendo procesos de fermentación de etanol de una única fase a partir de almidón crudo no gelatinizado (o no cocinado).

[0008] Uniprot: B0CVJ1 divulga un polipéptido de *Laccaria bicolor* y la WO 2006/069289 describe una glucoamilasa de *Trametes cingulata*.

Resumen de la invención

[0009] Polipéptidos producidos por el hongo *Artomyces pyxidatus* y que tienen actividad de glucoamilasa se han identificado y caracterizado.

[0010] Por consiguiente, la presente invención se refiere en un primer aspecto a un polipéptido aislado que tiene actividad de glucoamilasa, seleccionado del grupo que consiste en: (a) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, de forma más preferible al menos 81%, de forma más preferible al menos 82%, de forma más preferible al menos 83%, de forma más preferible al menos 84%, de forma más preferible al menos 85%, de forma más preferible al menos 86%, de forma más preferible al menos 87%, de forma más preferible al menos 88%, de forma más preferible al menos 89%, de forma más preferible al menos 90%, de forma más preferible al menos 91%,

de forma más preferible al menos 92%, incluso de forma más preferible al menos 93%, de la forma más preferible al menos 94%, e incluso de la forma más preferible al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o incluso 100% de identidad con los residuos de aminoácidos 19-573 de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4; (b) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, de forma más preferible al menos 81%, de forma más preferible al menos 82%, de forma más preferible al menos 83%, de forma más preferible al menos 84%, de forma más preferible al menos 85%, de forma más preferible al menos 86%, de forma más preferible al menos 87%, de forma más preferible al menos 88%, de forma más preferible al menos 89%, de forma más preferible al menos 90%, de forma más preferible al menos 91%, de forma más preferible al menos 92%, incluso de forma más preferible al menos 93%, de la forma más preferible al menos 94%, e incluso de la forma más preferible al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o incluso 100% de identidad con el dominio catalítico mostrado como aminoácidos 22 a 472 de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4; (c) (d) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos 80%, de forma más preferible al menos 81%, de forma más preferible al menos 82%, de forma más preferible al menos 83%, de forma más preferible al menos 84%, de forma más preferible al menos 85%, de forma más preferible al menos 86%, de forma más preferible al menos 87%, de forma más preferible al menos 88%, de forma más preferible al menos 89%, de forma más preferible al menos 90%, de forma más preferible al menos 91%, de forma más preferible al menos 92%, incluso de forma más preferible al menos 93%, de la forma más preferible al menos 94%, e incluso de la forma más preferible al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o incluso 100% de identidad con la secuencia codificante de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3 que codifica los aminoácidos 19-573 de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4.

[0011] La presente invención se refiere en un segundo aspecto a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido del primer aspecto.

[0012] En otros aspectos la invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos, un vector de expresión recombinante, una célula huésped recombinante, una planta transgénica, una parte de planta o célula vegetal que comprende el polinucleótido del segundo aspecto.

[0013] En otros aspectos, la invención se refiere a un método para producir el polipéptido, usos del polipéptido y una composición que incluye una alfa-amilasa y el polipéptido.

Definiciones

[0014] **Glucoamilasa**: el término glucoamilasa (1,4-alfa-D-glucano glucohidrolasa, EC 3.2.1.3) se define como una enzima que cataliza la liberación de D-glucosa de las extremidades no reducidas de almidón o moléculas relacionadas de oligo y polisacáridos. Para fines de la presente invención, la actividad de glucoamilasa se determina según el procedimiento descrito en la sección que aparece más adelante "Materiales y Métodos".

[0015] Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, preferiblemente al menos 40%, preferiblemente al menos 45%, de forma más preferible al menos 50%, preferiblemente al menos 55%, de forma más preferible al menos 60%, preferiblemente al menos 65%, de forma más preferible al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, de forma más preferible al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, incluso de la forma más preferible al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, e incluso de la forma más preferible al menos 100% de la actividad de glucoamilasa del polipéptido maduro de SEC ID nº: 2 o una secuencia homóloga del mismo, o de SEC ID nº: 4 o una secuencia homóloga del mismo.

[0016] **Polipéptido aislado**: el término "polipéptido aislado", como se usa aquí, se refiere a un polipéptido que es aislado a partir de una fuente. Preferiblemente, el polipéptido es al menos 1% puro, preferiblemente al menos 5% puro, de forma más preferible al menos 10% puro, de forma más preferible al menos 20% puro, de forma más preferible al menos 40% puro, de forma más preferible al menos 60%, incluso de forma más preferible al menos 80% puro y de la forma más preferible al menos 90% puro, según se determina por SDS-PAGE.

[0017] **Polipéptido sustancialmente puro**: el término "polipéptido sustancialmente puro" denota aquí una preparación de polipéptido que contiene como mucho 10%, preferiblemente como mucho 8%, de forma más preferible como mucho 6%, de forma más preferible como mucho 5%, de forma más preferible como mucho 4%, de forma más preferible como mucho 3%, incluso de forma más preferible 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 recombinantemente asociado. Se prefiere, por lo tanto, que el polipéptido sustancialmente puro sea al menos 92% puro, preferiblemente al menos 94% puro, de forma más preferible al menos 95% puro, de forma más preferible al menos 96% puro, de forma más preferible al menos 96% puro, de forma más preferible al menos 97% puro, de forma más preferible al menos 98%, puro incluso de forma más preferible al menos 99%, 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 de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura, es decir, que la preparación de polipéptido está esencialmente libre de otro material de polipéptido con el cual 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.

[0018] **Polipéptido maduro**: el término "polipéptido maduro" se refiere a un polipéptido en su forma final después de traducción y cualquier modificación post traduccional, tal como tratamiento de N-terminal, truncamiento de C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 19 a 573 de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4 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 nº: 2 o de SEC ID nº: 4 son un péptido señal. Preferiblemente, el polipéptido maduro es los aminoácidos 19 a 573 de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4. La secuencia definida por los aminoácidos 22 a 472 de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4 es el dominio catalítico; y la secuencia definida por los aminoácidos 480 a 573 de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4 es un dominio de unión al almidón.

[0019] **Secuencia codificante del polipéptido maduro**: el término "secuencia codificante del polipéptido maduro" se define aquí como una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad de glucoamilasa. Preferiblemente, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos definidos por las posiciones 55 a 159, 209 a 485, 537 a 681, 737 a 896, 948 a 1223, 1276 a 1738, 1797 a 1892, 1946 a 2091 de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3.

[0020] **Identidad**: la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro "identidad".

[0021] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) según 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 la versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62). La salida de Needle marcada como "identidad más larga" (obtenida utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera: (residuos idénticos x 100)/(longitud de alineamiento - número total de gaps en el alineamiento).

[0022] Para fines de la presente invención, el grado de identidad 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 versión 3.0.0 o superior. Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de gap de 10, penalización por extensión de gap de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión de EMBOSS de NCBI NUC4.4). La salida de Needle etiquetada como "identidad más larga" (obtenida utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

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

[0023] **Secuencia homóloga**: el término "secuencia homóloga" se define aquí como una secuencia de nucleótido/secuencia de polipéptido que tiene un grado de identidad con la parte codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3 o el polipéptido maduro de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4, respectivamente, de al menos 78%, de forma más preferible al menos 79%, de forma más preferible al menos 80%, de forma más preferible al menos 81%, de forma más preferible al menos 82%, de forma más preferible al menos 83%, de forma más preferible al menos 84%, de forma más preferible al menos 85%, de forma más preferible al menos 86%, de forma más preferible al menos 87%, de forma más preferible al menos 88%, de forma más preferible al menos 89%, de forma más preferible al menos 90%, de forma más preferible al menos 91%, de forma más preferible al menos 92%, de forma más preferible al menos 93%, de forma más preferible al menos 94%, de forma más preferible al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o incluso al menos 99%.

[0024] **Fragmento de polipéptido**: el término "fragmento de polipéptido" se define aquí como un polipéptido que tiene uno o más aminoácidos (diferentes) eliminados del término amino y/o carboxilo del polipéptido maduro de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4; o una secuencia homóloga de la misma; donde el fragmento tiene actividad de glucoamilasa. Preferiblemente, un fragmento contiene al menos 500 residuos de aminoácidos, de forma más preferible al menos 450 aminoácidos y de la forma más preferible al menos 400 residuos de aminoácidos, del polipéptido maduro de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4 o una secuencia homóloga de la misma. Un fragmento particular es la secuencia definida por los aminoácidos 22 a 472 de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4 que comprenden el dominio catalítico del polipéptido de la invención.

[0025] **Subsecuencia**: el término "subsecuencia" se define aquí como una secuencia de nucleótidos que tiene uno o más nucleótidos (diferentes) eliminados del extremo 5' y/o 3' de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3; o una secuencia homóloga de la misma; donde la subsecuencia codifica un fragmento del polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa. Preferiblemente, una subsecuencia contiene al menos 1500 nucleótidos, de forma más preferible al menos 1400 nucleótidos y de la forma más preferible al menos 1200 nucleótidos de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3 o una secuencia homóloga de la misma.

[0026] **Variante alélica**: el término "variante alélica" denota aquí cualquiera de las 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 provocar polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones de gen pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tiene secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0027] **Polinucleótido aislado**: el término "polinucleótido aislado" como se usa aquí se refiere a un polinucleótido que es aislado de una fuente. Preferiblemente, el polinucleótido es al menos 1 % puro, preferiblemente al menos 5% puro, de forma más preferible al menos 10% puro, de forma más preferible al menos 20% puro, de forma más preferible al menos 40% puro, de forma más preferible al menos 60% puro, incluso de forma más preferible al menos 80% puro y de la forma más preferible al menos 90% puro, como se determina por electroforesis de agarosa.

[0028] **Polinucleótido sustancialmente puro**: el término "polinucleótido sustancialmente puro" como se usa aquí se refiere a una preparación polinucleótida libre de otros nucleótidos extraños o indeseados y en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteína genéticamente modificados. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como mucho 10%, preferiblemente como mucho 8%, de forma más preferible como mucho 6%, de forma más preferible como mucho 5%, de forma más preferible como mucho 4%, de forma más preferible como mucho 3%, incluso de forma más preferible 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 cual esté 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, de forma más preferible al menos 94% puro, de forma más preferible al menos 95% puro, de forma más preferible al menos 96% puro, de forma más preferible al menos 97% puro, incluso de forma más preferible al menos 98% puro, de la forma más preferible al menos 99% 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 cual está asociado de forma original o recombinante. Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, de ADNc, ARN, semisintético, sintético o cualquier combinación de los mismos.

[0029] **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 normalmente empieza 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, ADNc, sintética o recombinante.

[0030] **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 intrón de defectos de ADNc que son normalmente presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito de ARN primario 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 introns por un proceso llamado empalme. Al ADNc derivado de ARNm le falta, por lo tanto, cualquier secuencias de introns.

[0031] **Constructo de ácidos nucleicos**: el término "constructo de ácidos nucleicos" como se utiliza en este caso se refiere a una molécula de ácido nucleico, mono o bicatenaria, que es aislada a partir de un gen de origen natural o que se modifica para que contenga segmentos de ácidos nucleicos de manera que no existirían de modo en la naturaleza o que es sintética. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimos del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0032] **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 nativo o foráneo entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, una secuencia de poliadenilación líder, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcional y traduccionales. Las secuencias de control pueden estar provistas de enlaces para introducir sitios de restricción específicos que faciliten el ligamiento de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

[0033] **Operativamente enlazado**: el término "operativamente enlazado" denota aquí una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia de codificación de la secuencia polinucleótida de manera que la secuencia de control dirija la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

[0034] **Expresión**: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0035] **Vector de expresión**: el término "vector de expresión" se define aquí como una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención y está operativamente enlazado a nucleótidos adicionales que proporcionan su expresión.

[0036] **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 similares con un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprenda un polinucleótido de la presente invención.

[0037] **Modificación**: el término "modificación" se refiere a cualquier modificación química del polipéptido que consista en el polipéptido maduro de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4; o una secuencia homóloga de la misma; al igual que a la manipulación genética del ADN que codifica tal polipéptido. La modificación puede ser una sustitución, una eliminación y/o una inserción de uno o varios aminoácidos (diferentes) al igual que reemplazos de una o varias (diferentes) cadenas laterales de aminoácidos.

[0038] **Variante**: cuando se usa aquí, el término "variante" se refiere a un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa que incluye una alteración, es decir, una sustitución, inserción, y/o eliminación de uno o varios (diferentes) residuos de aminoácidos en una o varias (diferentes) posiciones. Una sustitución se refiere a una sustitución de un aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una eliminación se refiere a la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición y una inserción se refiere a la adición de 1-3 aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa

[0039] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad con el polipéptido maduro de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4 de al menos 80%, de forma más preferible al menos 81%, de forma más preferible al menos 82%, de forma más preferible al menos 83%, de forma más preferible al menos 84%, de forma más preferible al menos 85%, de forma más preferible al menos 86%, de forma más preferible al menos 87%, de forma más preferible al menos 88%, de forma más preferible al menos 89%, de forma más preferible al menos 90%, de forma más preferible al menos 91%, de forma más preferible al menos 92%, incluso de forma más preferible al menos 93%, de la forma más preferible al menos 94% e incluso de la forma más preferible al menos 95%, tal como incluso al menos 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad, que tiene actividad de glucoamilasa (de ahora en adelante "polipéptidos homólogos"). Preferiblemente, los polipéptidos homólogos tienen una secuencia de aminoácidos que difiere en diez aminoácidos, preferiblemente en cinco aminoácidos, de forma más preferible en cuatro aminoácidos, incluso de forma más preferible 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 nº: 2 o de SEC ID nº: 4.

[0040] Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4 o una variante alélica de la misma o un fragmento de la misma que tiene actividad de glucoamilasa. Preferiblemente, el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4. En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende el polipéptido maduro de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4; o un fragmento de la mismo que tiene actividad de glucoamilasa. En otro aspecto preferido de la divulgación, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4; o un fragmento de la misma que tiene actividad de glucoamilasa. En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4.

[0041] La presente divulgación se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de glucoamilasa que son codificados por polinucleótidos que hibridan bajo condiciones de astringencia preferiblemente muy bajas, condiciones de astringencia de forma más preferible bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia media, condiciones de astringencia de forma más preferible medio altas, condiciones de astringencia altas incluso de forma más preferible, y de la forma más preferible condiciones de astringencia altísimas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3, (ii) la secuencia de ADNc contenida en SEC ID nº: 1 o SEC ID nº: 3, (iii) una subsecuencia de (i) o (ii), o (iv) una cadena complementaria en toda su longitud de (i); (ii), o (iii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York). Una subsecuencia de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3 contiene al menos 100 nucleótidos contiguos o preferiblemente al menos 200 nucleótidos contiguos. Además, la subsecuencia puede codificar un fragmento de polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa. Preferiblemente, la cadena complementaria es la cadena complementaria en toda su longitud de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3.

[0042] La secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3; o una subsecuencia de la misma; así como la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4; o un fragmento de la misma; se puede usar para designar sondas de ácidos nucleicos de diseño para identificar y clonar ADN que codifica polipéptidos que tienen actividad de

glucoamilasa a partir de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para hibridación con el ADNc o genómico del género o especie de interés, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente del mismo. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían tener al menos 14, preferiblemente al menos 25, de forma más preferible al menos 35, y de la forma más preferible al menos 70 nucleótidos de longitud. Se prefiere, no obstante, 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, de forma más preferible al menos 400 nucleótidos o de la forma más preferible al menos 500 nucleótidos de longitud. Se pueden usar sondas incluso más largas, por ejemplo, sondas de ácidos nucleicos que tengan preferiblemente al menos 600 nucleótidos, de forma más preferible al menos 700 nucleótidos, incluso de forma más preferible al menos 800 nucleótidos o de la forma más preferible al menos 900 nucleótidos de longitud. Se pueden usar sondas de ADN y de ARN. Las sondas están típicamente marcadas para la detección del gen correspondiente (por ejemplo, con ^{33}P, ^{32}P, ^{3}H, ^{35}S, biotina, o avidina). Tales sondas están abarcadas por la presente invención.

[0043] Un ADN genómico o genoteca de ADNc obtenido a partir de tales otras cepas se puede seleccionar, por lo tanto, para ADN que hibridiza con las sondas anteriormente descritas y codifica un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa. ADN genómico u otro de tales otras cepas se puede separar por electrofóresis en gel de poliacrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación. ADN de las genotecas o el ADN separado se pueden transferir e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que sea homólogo con SEC ID nº: 1 o con SEC ID nº: 3, o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa preferiblemente en una transferencia de Southern.

[0044] Para fines de la presente divulgación, la hibridación indica que la secuencia de nucleótidos hibridiza a una sonda de ácido nucleico marcada que corresponde con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3, la secuencia de ADN genómico que comprende la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3, su cadena complementaria en toda su longitud, o una subsecuencia de la misma, bajo condiciones de astringencia de muy bajas a muy altas. Las moléculas a las que la sonda de ácido nucleico hibridiza bajo estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, película radiográfica.

[0045] Preferiblemente, la sonda de ácido nucleico es la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es una secuencia polinucleótida que codifica el polipéptido de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4, o una subsecuencia de la misma. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es la secuencia polinucleótida contenida en el plásmido en la cepa de *E. coli* DSM 23223, donde la secuencia de polinucleótidos de la misma codifica un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa. En otro aspecto preferido, la sonda de ácido nucleico es la región de codificación del polipéptido maduro contenida en el plásmido en la cepa de *E. coli* DSM 23223.

[0046] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, condiciones de astringencia de muy bajas a muy altas son definidas como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3% de SDS, 200 microgramos/ml de ADN 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 altas y muy altas, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas óptimamente.

[0047] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador se lava finalmente tres veces cada uno durante 15 minutos usando 2X SSC, 0,2% de SDS preferiblemente a 45°C (astringencia muy baja), de forma más preferible a 50°C (astringencia baja), de forma más preferible a 55°C (astringencia media), de forma más preferible a 60°C (astringencia medio alta), incluso de forma más preferible a 65°C (astringencia alta) y de la forma más preferible a 70°C (astringencia muy alta).

[0048] Para sondas cortas que son de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia son definidas como prehibridación, hibridación y post-hibridación de lavado en aproximadamente 5°C a aproximadamente 10°C por debajo de la Tm calculada utilizando el cálculo según Bolton y McCarthy (11962, 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.

[0049] Para sondas cortas que son 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 uno durante 15 minutos usando 6X SSC a 5°C a 10°C por debajo de la Tm calculada.

[0050] En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de glucoamilasa codificados por polinucleótidos que comprenden o consisten en las secuencias de nucleótidos que tienen un grado de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3 de al menos 80%, de forma más preferible al menos 81%, de forma más preferible al menos 82%, de forma más preferible al menos 83%, de forma más preferible al menos 84%, de forma más preferible al menos 85%, de forma más preferible al

menos 86%, de forma más preferible al menos 87%, de forma más preferible al menos 88%, de forma más preferible al menos 89%, de forma más preferible al menos 90%, de forma más preferible al menos 91%, de forma más preferible al menos 92%, de forma más preferible al menos 93%, de forma más preferible al menos 94%, de forma más preferible al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o incluso al menos 99%, que codifican un polipéptido activo. Véase la sección de polinucleótidos aquí.

[0051] La presente invención también se refiere a variantes artificiales que comprenden una sustitución, eliminación y/o inserción de uno o varios (o diferentes) aminoácidos del polipéptido maduro de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4; o una secuencia homóloga de la misma. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos son de naturaleza menor, es decir sustituciones de aminoácidos conservadoras o inserciones que no afectan significativamente al plegado y/o la actividad de la proteína, deleciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos, pequeñas extensiones amino o carboxi terminales, tales como un residuo de metionina aminoterminal, un péptido enlazador pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos o una extensión pequeña que facilite la purificación por cambio de la carga de red u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítopo antigénico o un dominio de unión.

[0052] 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 descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, Nueva 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.

[0053] Además de los 20 aminoácidos estándar, aminoácidos no estándar (tales como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y alfa-metil serina) se pueden sustituir por residuos de aminoácidos de un polipéptido de tipo salvaje. Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no son codificados por el código genético y aminoácidos no naturales pueden ser sustituidos por residuos de aminoácidos. "Aminoácidos no naturales" se han modificado después de síntesis de proteína y/o tienen una estructura química en sus cadenas laterales diferente de la de los aminoácidos de estándar. Aminoácidos no naturales se pueden sintetizar químicamente y, preferiblemente, están disponibles comercialmente e incluyen ácido pipecólico, ácido carboxílico de tiazolidina, dehidroprolina, 3- y 4-metilprolina y 3,3-dimetilprolina.

[0054] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físico químicas de los polipéptidos se ven alteradas. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo y similares.

[0055] Aminoácidos esenciales en el polipéptido original se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham y Wells, 1989, Science 244: 1081-1085). En la última técnica, las mutaciones de alanina únicas se introducen en cada residuo de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de glucoamilasa para identificar residuos de aminoácidos que sean críticos 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 también se puede determinar 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 también pueden ser inferidas a partir de análisis de identidades con polipéptidos que están relacionados con un polipéptido según la invención.

[0056] Sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples, deleciones y/o inserciones se pueden hacer y evaluar usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o redistribución, seguido de un procedimiento de selección pertinente, tal como aquellos descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie and 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 (por ejemplo, Lowman *et al*., 1991, Biochem. 30: 10832-10837; Patente de EE.UU. nº: 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).

[0057] 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 de las células huésped y secuenciar rápidamente usando métodos estándar de 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.

[0058] El número total de sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones del polipéptido maduro de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4, tal como los aminoácidos 19 a 573 de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4, o el dominio catalítico de

SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4, tal como los aminoácidos 22 a 472 de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4, es 10, preferiblemente 9, de forma más preferible 8, de forma más preferible 7, de forma más preferible como mucho 6, de forma más preferible 5, de forma más preferible 4, incluso de forma más preferible 3, de la forma más preferible 2, e incluso de la forma más preferible 1.

Fuentes de polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa

[0059] Un polipéptido de la presente invención se puede obtener a partir de microorganismos de cualquier género. Para fines de la presente invención, el término "obtenido a partir de" como se utilizan en este caso en relación con una fuente dada debe referirse a que el polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos es producido por la fuente o por una cepa donde la secuencia de nucleótidos de la fuente ha sido insertada. Preferiblemente, el polipéptido obtenido a partir de una fuente dada es secretado extracelularmente.

[0060] Un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa de la presente invención también puede ser polipéptido bacteriano, o un polipéptido de levadura, o de forma más preferible un polipéptido fúngico filamentoso tal como un polipéptido de *Acremonium, Agaricus, Alternaria, Artomyces, Aspergillus, Aureobasidium, Botryospaeria, Ceriporiopsis, Chaetomidium, Chrysosporium, Claviceps, Cochliobolus, Coprinopsis, Coptotermes, Corynascus, Cryphonectria, Cryptococcus, Diplodia, Exidia, Filibasidium, Fusarium, Gibberella, Holomastigotoides, Humicola, Irpex, Lentinula, Leptospaeria, Magnaporthe, Melanocarpus, Meripilus, Mucor, Myceliophthora, Neocallimastix, Neurospora, Paecilomyces, Penicillium, Phanerochaete, Piromyces, Poitrasia, Pseudoplectania, Pseudotrichonympha, Rhizomucor, Schizophyllum, Scytalidium, Talaromyces, Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, Trichoderma, Trichophaea, Verticillium, Volvariella* o *Xylaria* que tiene actividad de glucoamilasa.

[0061] En un aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Artomyces sp.* que tiene actividad de glucoamilasa. Particularmente el *Artomyces sp.* es *Artomyces pyxidatus*.

[0062] Se entiende que para las especies ya mencionadas la invención abarca tanto el estado perfecto como el imperfecto, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especies por el que se conozcan. Expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes apropiados.

[0063] Cepas de estas especies son de fácil acceso para el público en varias colecciones de cultivo, como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0064] Además, tales polipéptidos se pueden identificar y obtener a partir de otras fuentes, incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, suelo, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas anteriormente mencionadas. Técnicas para aislar microorganismos de hábitats naturales se conocen en la técnica. El polinucleótido se puede obtener luego de forma similar por selección de una genoteca de ADNc o genómico de tal microorganismo. Una vez que se ha detectado una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido con la sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que son bien conocidas por los expertos en la materia de la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al*., 1989, *supra*).

[0065] Polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos de fusión divisibles 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 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) de la presente invención. Técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen la ligadura de las secuencias de codificación que codifican los polipéptidos de modo que estén en marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo control del mismo promotor(es) y terminador.

[0066] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión. En la secreción de la proteína de fusión, el sitio es dividido liberando el polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa 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: 568-76; 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 un sitio His-Tyr-Asp, que se divide por Genenasa I (Carter *et al*., 1989, proteínas: estructura, función, y genética 6: 240-248); un Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser sitio, que es dividido por una trombina después del Arg (Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48), un sitio Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly, que es dividido por una proteasa TEV después del Gin (Stevens, 2003, *supra*); y un sitio Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro, que es dividido por una forma genéticamente modificada de proteasa 3C de rinovirus humano después del Gin (Stevens, 2003, *supra*).

Polinucleótidos

[0067] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en las secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa de la presente invención.

[0068] Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en SEC ID nº: 1. En otro aspecto más preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia contenida en el plásmido que está contenido en *E. coli* DSM 23223. En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1. En otro aspecto más preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia codificante del polipéptido maduro contenida en el plásmido contenido en *E. coli* DSM 23223. La presente invención también abarca las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4 o el polipéptido maduro de la misma, que difiere de SEC ID nº: 1 o 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 nº: 1 que codifican fragmentos de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4 que tienen actividad de glucoamilasa.

[0069] Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en SEC ID nº: 3. En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 3. La presente invención también abarca secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 4 o el polipéptido maduro de la misma, que difiere de SEC ID nº: 3 o 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 nº: 3 que codifican fragmentos de SEC ID nº: 4 que tienen actividad de glucoamilasa.

[0070] La presente invención también se refiere a polinucleótidos mutantes que comprenden o consisten en al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3, donde la secuencia de nucleótidos mutante codifica el polipéptido maduro de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4.

[0071] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen aislamiento de ADN genómico, preparación de ADNc o una combinación ha de los mismos. La clonación de los polinucleótidos de la presente invención de tal ADN genómico se puede efectuar, por ejemplo, usando la conocida reacción en cadena de polimerasa (PCR) o selección de anticuerpo de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonado con características estructurales compartidas. Véase, por ejemplo, Innis *et al*., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tales como reacción en cadena de 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 *Penicillium*, u otros organismos u organismos relacionados y así, por ejemplo, pueden ser una variante alélica o de especies del polipéptido que codifica la región de la secuencia de nucleótidos.

[0072] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en las secuencias de nucleótidos que tienen un grado de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3 de al menos 80%, de forma más preferible al menos 81%, de forma más preferible al menos 82%, de forma más preferible al menos 83%, de forma más preferible al menos 84%, de forma más preferible al menos 85%, de forma más preferible al menos 86%, de forma más preferible al menos 87%, de forma más preferible al menos 88%, de forma más preferible al menos 89%, de forma más preferible al menos 90%, de forma más preferible al menos 91%, de forma más preferible al menos 92%, de forma más preferible al menos 93%, de forma más preferible al menos 94%, de forma más preferible al menos 95%, tal como al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o incluso al menos 99% de identidad, que codifica un polipéptido activo.

[0073] La modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido 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 que no se producen de forma natural del polipéptido. Estos polipéptidos puede diferir de alguna manera diseñada del polipéptido aislado en su fuente nativa, por ejemplo, variantes artificiales que difieren en la actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo o similar. La secuencia variante se puede construir basándose en la secuencia de nucleótidos presentada como la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 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 corresponda al uso de codón del organismo huésped destinado a la producción de la enzima, o por introducción de sustituciones de nucleótidos que pueden 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.

[0074] Será aparente para los expertos en la técnica que tales sustituciones se pueden hacer fuera de las regiones críticas de la función de la molécula y aún suponer un polipéptido activo. Residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificado por un polinucleótido aislado de la invención, y por lo tanto preferiblemente no sujeto 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 y 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 de glucoamilasa para identificar los residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula. Sitios de interacción enzima-sustrato también se pueden determinar por análisis de la estructura tridimensional, tal y como se determina por técnicas tales como 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*).

[0075] La presente divulgación también se refiere a polipéptidos de codificación de polinucleótidos aislados de la presente invención, que hibridan bajo condiciones de astringencia muy bajas, condiciones de astringencia preferiblemente bajas, de forma más preferible condiciones de astringencia medias, de forma más preferible condiciones de astringencia medio altas, de forma más preferible incluso condiciones de astringencia altas, y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy altas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3, (ii) la secuencia de ADNc contenida en SEC ID nº: 1 o SEC ID nº: 3, o (iii) una cadena complementaria en toda su longitud de (i) o (ii), o sus variantes alélicas y subsecuencias (Sambrook *et al*., 1989, *supra*), tal y como se define aquí. Preferiblemente, la cadena complementaria es la cadena complementaria en toda su longitud de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3.

[0076] La presente divulgación también se refiere a polinucleótidos aislados obtenidos por (a) hibridación de una población de ADN bajo condiciones de astringencia muy bajas, bajas, medias, medio altas, altas o muy altas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3, (ii) la secuencia de ADNc contenida en SEC ID nº: 1 o SEC ID nº: 3, o (iii) una cadena complementaria en toda su longitud de (i) o (ii); y (b) aislamiento del polinucleótido de hibridación, que codifica un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa. Preferiblemente, la cadena complementaria es la cadena complementaria en toda su longitud de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3.

Enzimas híbridas

[0077] La presente divulgación también se refiere a enzimas híbridas que comprenden un dominio catalítico que tiene actividad enzimática (por ejemplo, actividad enzimática de degradación de almidón, tal como actividad de alfa-amilasa, amilopululanasa, beta-amilasa, CGTasa, glucoamilasa, isoamilasa, amilasa maltogénica o pululanasa), y un módulo de unión a carbohidratos (CBM). La enzima híbrida puede comprender además un enlazador.

[0078] El híbrido se puede producir por fusión de una primera secuencia de ADN que codifica un dominio catalítico y una segunda secuencia de ADN que codifica un módulo de unión a carbohidratos, o el híbrido se puede producir como un gen completamente sintético basado en el conocimiento de las secuencias de aminoácidos de CBMs, enlaces y dominios catalíticos adecuados.

[0079] El término "enzima híbrida" (también denominado, "proteína de fusión" "híbrido", "polipéptido híbrido" o "proteína híbrida") se utiliza en este caso para caracterizar los polipéptidos híbridos de la invención que comprenden un módulo catalítico que tiene actividad enzimática (por ejemplo, actividad de degradación de almidón, tal como actividad de alfa-amilasa, amilopululanasa, beta-amilasa, CGTasa, glucoamilasa, isoamilasa, amilasa maltogénica y pululanasa) y un módulo de unión a carbohidratos donde el dominio catalítico y el módulo de unión a carbohidratos son derivados de distintas fuentes. El término "fuente" incluye, pero no está limitado a, una enzima original o una variante de la misma, por ejemplo, una amilasa o glucoamilasa, u otra actividad catalítica que comprenda un módulo catalítico adecuado y/o un CBM adecuado y/o un enlazador adecuado. No obstante el CBM también se puede derivar a partir de un polipéptido con ninguna actividad catalítica. El dominio catalítico y el módulo de unión a carbohidratos se puede derivar de la misma cepa microbiana, a partir de cepas en las mismas especies, de especies relacionadas de forma cercana u organismos menos relacionados. Preferiblemente, el dominio catalítico y el módulo de unión a carbohidratos de los híbridos son derivados a partir de distintas fuentes, por ejemplo, de distintas enzimas de la misma cepa y/o especies, o por ejemplo, de cepas dentro de especies diferentes.

[0080] En un aspecto la enzima híbrida comprende el CBM (también conocido como un dominio de unión a carbohidrato o CBD) según la invención y un dominio catalítico. El dominio catalítico es en una forma de realización particular un dominio catalítico de glucoamilasa.

Constructos de ácidos nucleicos

[0081] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que incluyen un polinucleótido aislado de la presente invención operativamente enlazado a una o varias (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.

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

[0083] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, una secuencia de nucleótidos que es 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 median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y se pueden obtener a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares bien homólogos o heterólogos de la célula huésped.

[0084] 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 promotores obtenidos a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori* (glaA), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, 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 el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*); y sus promotores mutante, truncados e híbridos.

[0085] En un huésped de levadura, promotores útiles se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactoquinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), alcohol 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.

[0086] 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 término 3' 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.

[0087] Terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0088] Terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C de *Saccharomyces cerevisiae* (CYC1) y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para células huésped de levadura son descritos por Romanos *et al*., 1992, *supra*.

[0089] 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.

[0090] 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*.

[0091] Líderes adecuados para células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

[0092] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al término 3' 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.

[0093] 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*.

[0094] Secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, Molecular Cellular Biology 15: 5983-5990.

[0095] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante del péptido señal que codifique para una secuencia de aminoácidos enlazada con el amino terminal de un polipéptido y que dirija 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 secuencia codificante que codifica el polipéptido segregado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal que sea foránea a la secuencia codificante. La secuencia codificante del péptido señal foráneo puede ser necesaria donde la secuencia codificante no contenga naturalmente 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.

[0096] Secuencias de codificación del péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias de codificación del 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*.

[0097] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras 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 la expresión del gen que se va a poner en ON u OFF en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas operadores *lac, tac, xyl* y *trp*. En la levadura, se pueden usar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En los hongos filamentosos, se pueden usar el promotor de TAKA alfa-amilasa, promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son las que permiten amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido estaría operativamente enlazada con la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

[0098] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor y señales de parada transcripcionales y traduccionales. 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 varios (diferentes) sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o la sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en tales sitios. Alternativamente, una secuencia de polinucleótidos de la presente invención 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. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante esté operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0099] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que se pueda someter convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y que puede provocar la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector se debe introducir. Los vectores pueden ser plásmidos lineales o circulares cerrados.

[0100] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que exista como una entidad extracromosómica, cuya replicación sea independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduzca en la célula huésped, se integre en el genoma y se replique con el cromosoma(s) en el 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.

[0101] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o varios (diferentes) marcadores seleccionables que permiten la fácil selección 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, prototrofia a los auxótrofos y similares.

[0102] Marcadores seleccionables para su uso en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato decarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa) y *trpC* (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos. Se prefieren 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.

[0103] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen un elemento(s) que permite la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independientemente del genoma.

[0104] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede contar con la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para 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(es) precisa del cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían 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 grado alto de identidad 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 en el 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.

[0105] Para 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 replicación autónoma que funcione en una célula. El término "origen de replicación" o "plásmido replicador" se define aquí como una secuencia de nucleótidos que permite a un plásmido o vector replicar *in vivo*.

[0106] 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 plásmidos o vectores que comprendan el gen se puede realizar según los métodos descritos en la WO 00/24883.

[0107] Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención 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 copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar por cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0108] Los procedimientos usados para enlazar los elementos descritos anteriormente para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son conocidos por un experto en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al*., 1989, *supra*).

Células huésped

[0109] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, incluyendo un polinucleótido aislado de la presente invención, que se usan ventajosamente en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no sea idéntico a la célula madre debido a mutaciones que se producen durante replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen que codifique el polipéptido y su fuente.

[0110] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, una procariota o una eucariota.

[0111] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria gram-positiva o bacteria gram-negativa. Bacterias gram-positivas incluyen, pero de forma no limitativa, *Bacillus, Clostridium, Enterococcus, Geobacillus, Lactobacillus, Lactococcus, Oceanobacillus, Staphylococcus, Streptococcus* y *Streptomyces*. Bacterias gram-negativas incluyen, pero de forma no limitativa, *E. coli*, *Campylobacter, Flavobacterium, Fusobacterium, Helicobacter, Ilyobacter, Neisseria, Pseudomonas, Salmonella* y *Ureaplasma*.

[0112] La célula huésped también puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta o fúngica.

[0113] Preferiblemente, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongo", como se utiliza en este caso, incluye el filo *Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota* y *Zygomycota* (como se define por Hawksworth *et al*., en, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) al igual

que el *Oomycota* (como se cita en Hawksworth *et al*., 1995, *supra*, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth *et al*., 1995, *supra*).

[0114] 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* (*Blastomycetes*). 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).

[0115] En un aspecto incluso más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida, Hansenula, Kluyveromyces, Pichia, Saccharomyces, Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

[0116] 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*.

[0117] 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* (como se define por Hawksworth *et al*., 1995, *supra*). Los hongos filamentosos están caracterizados 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.

[0118] 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, Tolypocladium, Trametes o Trichoderma.

[0119] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Aspergillus awamori, Aspergillus foetidus, Aspergillus fumigatus, 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 sarcochroum, 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 caregiea, Ceriporiopsis gilvescens, Ceriporiopsis pannocinta, Ceriporiopsis rivulosa, Ceriporiopsis subrufa, Ceriporiopsis subvermispora, Chrysosporium inops, Chrysosporium keratinophilum, Chrysosporium lucknowense, Chrysosporium merdarium, Chrysosporium pannicola, Chrysosporium queenslandicum, Chrysosporium tropicum, 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 versicolor, Trametes villosa, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

[0120] 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 una forma conocida *per se*. Procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en la EP 0238023 y en Yelton *et al*., 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474. Métodos adecuados para transformar 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. and Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, 194: 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito *et al*., 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; e Hinnen *et al*., 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

Métodos de producción

[0121] La presente divulgación también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprende: (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. Preferiblemente, la célula es del género *Artomyces*. En un aspecto más preferido, la célula es de la especie *Artomyces pyxidatus*.

[0122] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprende: (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.

[0123] La presente divulgación también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) cultivo de una célula 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 nº: 1 o de SEC ID nº: 3, donde la secuencia de nucleótidos mutante codifica un polipéptido que comprende o consiste en el polipéptido maduro de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4, y (b) recuperación del polipéptido.

[0124] En los métodos de producción de la presente invención, 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 pequeña escala o gran escala (incluyendo, fermentaciones continuas de lote, de lote alimentado o de estado sólido) en laboratorio o fermentadores industriales realizadas 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 las composiciones publicadas (por ejemplo, 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 de lisados celulares.

[0125] 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.

[0126] El polipéptido resultante se puede recuperar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitado a, centrifugado, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0127] Los polipéptidos de la presente invención se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitado a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, de cromatoenfoque y de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

Plantas

[0128] La presente invención también se refiere a plantas, por ejemplo, una planta transgénica, parte de una planta o célula vegetal, que incluye un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa de la presente invención para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido se puede recuperar de la planta o de la parte de planta. Alternativamente, la planta o parte de planta que contiene el polipéptido recombinante se puede utilizar como tal para mejorar la calidad de un alimento o pienso, por ejemplo, mejorar el valor nutricional, la palatabilidad y las propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

[0129] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicot) o monocotiledónea (una monocot). Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, tales como poa de los prados (grama azul, Poa), hierba forrajera tal como *Festuca*, *Lolium*, césped templado, tal como *Agrostis*, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz.

[0130] Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, legumbres, tales como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y semilla de soja, y plantas crucíferas (familia *Brassicaceae*), tales como coliflor, semilla de colza, y el organismo modelo cercanamente relacionado *Arabidopsis thaliana*.

[0131] Ejemplos de partes de planta son tallo, callo, hojas, raíz, frutos, semillas y tubérculos al igual que los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo, epidermis, mesofilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas. Compartimentos de células vegetales específicos, tales como cloroplastos, apoplastos, mitocondria, vacuolas, peroxisomas y citoplasma son también considerado como una parte de una planta. Además, cualquier célula vegetal, independientemente del origen del tejido, se considera parte de planta. Asimismo, partes de planta tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la invención también se consideran partes de planta, por ejemplo, embriones, endospermas, aleurona y revestimientos de semillas.

[0132] También se incluye dentro del campo de la presente invención los descendientes de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

[0133] La célula vegetal o planta transgénica que expresa un polipéptido de la presente invención se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. En resumen, la planta o célula vegetal se construye por incorporación de uno o varios (diferentes) constructos de expresión que codifican un polipéptido de la presente invención en el genoma huésped vegetal o genoma de cloroplasto y que propaga la planta modificada resultante o célula vegetal en una planta transgénica o célula vegetal.

[0134] El constructo de expresión es convenientemente un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención operativamente enlazado a las secuencias reguladoras apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia de nucleótidos de la planta o parte de planta elegida. Además, el constructo de expresión puede comprender una etiqueta seleccionable útil para identificar células huésped en las que el constructo de expresión se haya integrado y secuencias de ADN necesarias para la introducción del constructo en la planta en cuestión (depende del método de introducción de ADN que se vaya a usar).

[0135] La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y terminadoras y opcionalmente secuencias señal o de tránsito se determina, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde y cómo se desea que sea expresado el polipéptido. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser constitutiva o inducible, o puede ser desarrollable, fase o tejido específica, y el producto génico puede estar dirigido a un tejido específico o parte de planta tal como semillas u hojas. Secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Tague *et al*., 1988, Plant Physiology 86: 506.

[0136] Para la expresión constitutiva, el 35S-CaMV, la ubiquitina 1 de maíz, y el promotor de actina 1 de arroz se puede utilizar (Franck *et al*., 1980, Cell 21: 285-294, Christensen *et al*., 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689; Zhang *et al*., 1991, Plant Cell 3: 1155-1165). Promotores específicos de órgano pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata y frutos (Edwards & Coruzzi, 1990, Ann. Rev. Genet. 24: 275-303) o de tejidos sumidero metabólicos tales como meristemas (Ito *et al*., 1994, Plant Mol. Biol. 24: 863-878), un promotor específico de semilla como la glutelina, prolamina, globulina o promotor de albúmina de arroz (Wu *et al*., 1998, Plant and Cell Physiology 39: 885- 889), un promotor de *Vicia faba* de la legúmina B4 y el gen de proteína de semilla desconocida de *Vicia faba* (Conrad *et al*., 1998, Journal of Plant Physiology 152: 708-711), un promotor de una proteína del cuerpo oleaginoso de semillas (Chen *et al*., 1998, Plant and Cell Physiology 39: 935-941), el promotor *napa* de la proteína de almacenamiento de *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en la WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor *rbcs* de arroz o tomate (Kyozuka *et al*., 1993, Plant Physiology 102: 991-1000), el promotor del gen de adenina metiltransferasa del virus de chlorella (Mitra and Higgins, 1994, Plant Molecular Biology 26: 85-93), o el promotor del gen *aldP* de arroz (Kagaya *et al*., 1995, Molecular and General Genetics 248: 668-674), o un promotor inducible por daño como el promotor *pin2* de patata (Xu *et al*., 1993, Plant Molecular Biology 22: 573-588). Asimismo, el promotor puede ser inducible por tratamientos abióticos tales como temperatura, sequía o alteraciones en la salinidad o inducido por sustancias exógenamente aplicadas que activen el promotor, por ejemplo, etanol, estrógenos, hormonas vegetales tales como etileno, ácido abscísico y ácido giberélico, y metales pesados.

[0137] Un elemento intensificador del promotor también se puede usar para conseguir expresión más alta de un polipéptido de la presente invención en la planta. Por ejemplo, el elemento potenciador del promotor puede ser un intrón que se coloca entre el promotor y la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención. Por ejemplo, Xu *et al*., 1993, *supra*, revelan el uso del primer intrón del gen de actina 1 de arroz para mejorar la expresión.

[0138] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes del constructo de expresión se pueden elegir de lo disponible en la técnica.

[0139] El constructo de ácidos nucleicos se incorpora en el genoma de planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, microinyección, bombardeo de partícula, transformación biolística y electroporación (Gasser *et al*., 1990, Science 244: 1293; Potrykus, 1990, Bio/Technology 8: 535; Shimamoto *et al*., 1989, Nature 338: 274).

[0140] Actualmente, la transferencia de gen mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método elegido para generar dicotiledóneas transgénicas (para una revisión, véase Hooykas y Schilperoort, 1992, Plant Molecular Biology 19: 15-38) y también se pueden usar para transformar monocotiledóneas, aunque otros métodos de transformación se usan frecuentemente para estas plantas. Actualmente, el método elegido para generar monocotiledóneas transgénicas es el bombardeo de partícula (oro microscópico o partículas de tungsteno recubiertos con el ADN de transformación) de callos embrionarios o embriones en desarrollo (Christou, 1992, Plant Journal 2: 275- 281; Shimamoto, 1994, Current Opinion Biotechnology 5: 158-162; Vasil *et al*., 1992, Bio/Technology 10: 667-674). Un método alternativo para la transformación de monocotiledóneas se basa en la transformación de protoplasto como describen Omirulleh *et al*., 1993, Plant Molecular Biology 21: 415-428.

[0141] Tras la transformación, los transformantes que han incorporado el constructo de expresión se seleccionan y regeneran en plantas enteras según métodos bien conocidos en la técnica. Frecuentemente, el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes de selección bien durante la regeneración o en las

siguientes generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de T-ADN separados o escisión específica de sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

[0142] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención que comprende: (a) cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa de la presente invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido y (b) recuperación del polipéptido.

Composiciones

[0143] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención. Preferiblemente, las composiciones se enriquecen con tal polipéptido. El término "enriquecido" indica que la actividad de glucoamilasa de la composición ha sido aumentada, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1.1.

[0144] La composición puede comprender un polipéptido de la presente invención como componente enzimático principal, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender actividades enzimáticas múltiples, tal 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, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasa. La(s) enzima(s) adicional(es) se puede producir, por ejemplo, por un microorganismo del 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*.

[0145] Las composiciones de polipéptido se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden ser en forma de líquido o de 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.

[0146] Se dan ejemplos más adelante de usos preferidos de las composiciones de polipéptido de la invención. La dosificación de la composición de polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las que la composición se usa se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

Combinación de glucoamilasa y alfa-amilasa ácida

[0147] Según este aspecto de la invención, una glucoamilasa de la invención se puede combinar con una alfa-amilasa, preferiblemente una alfa-amilasa ácida en una proporción de entre 0,3 y 5,0 AFAU/AGU. De forma más preferible, la proporción entre actividad de alfa-amilasa ácida y actividad de glucoamilasa es al menos 0,35, al menos 0,40, al menos 0,50, al menos 0,60, al menos 0,7, al menos 0,8, al menos 0,9, al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,85, o incluso al menos 1,9 AFAU/AGU. No obstante, la proporción entre actividad de alfa-amilasa ácida y actividad de glucoamilasa debería preferiblemente ser menor que 4,5, menor que 4,0, menor que 3,5, menor que 3,0, menor que 2,5, o incluso menor que 2,25 AFAU/AGU. En AUU/AGI las actividades de alfa-amilasa ácida y glucoamilasa están preferiblemente presentes en una proporción entre 0,4 y 6,5 AUU/AGI. De forma más preferible la proporción entre actividad de alfa-amilasa ácida y actividad de glucoamilasa es al menos 0,45, al menos 0,50, al menos 0,60, al menos 0,7, al menos 0,8, al menos 0,9, al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2,0, al menos 2,1, al menos 2,2, al menos 2,3, al menos 2,4, o incluso al menos 2,5 AUU/AGI. No obstante, la proporción entre actividad de alfa-amilasa ácida y actividad de glucoamilasa es preferiblemente menor que 6,0, menor que 5,5, menor que 4,5, menor que 4,0, menor que 3,5, o incluso menor que 3,0 AUU/AGI.

[0148] La composición anterior es adecuada para su uso en un proceso de conversión de almidón mencionado más adelante para producir jarabe y productos de fermentación, tales como etanol.

[0149] Se dan ejemplos más adelante de usos preferidos de las composiciones de polipéptido de la invención. La dosificación de la composición de polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las que la composición se usa se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

Usos

[0150] La presente invención está también dirigida a procesos/métodos para el uso de los polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa de la invención.

[0151] Usos según la invención incluyen conversión amilácea de almidón en por ejemplo, jarabe y productos de fermentación, incluyendo etanol y bebidas. Ejemplos de procesos donde se pueden usar una glucoamilasa de la invención incluyen los descritos en la WO 92/20777, WO 03/066816, WO 03/066826, WO 2004/081193 y WO 2004/080923, que son incorporados en la presente todos por referencia.

Producción de productos de fermentación

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

[0152] En este aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación, especialmente etanol, a partir de material que contiene almidón, cuyo proceso incluye un paso de licuefacción y pasos de sacarificación y fermentación realizados consecutiva o simultáneamente.

[0153] La invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye las etapas de:

(a) licuefacción del material que contiene almidón, preferiblemente utilizando una alfa-amilasa;

(b) sacarificación del material licuado obtenido en el paso (a) utilizando una glucoamilasa de la invención; y

(c) fermentación del material sacarificado utilizando un organismo fermentador.

[0154] El producto de fermentación, tal como especialmente etanol, se puede recuperar opcionalmente después de la fermentación, por ejemplo, por destilación. Materias primas que contienen almidón adecuadas se enumeran en la sección "materiales que contienen almidón" que aparece más adelante. Las enzimas contempladas se enumeran en la sección "enzimas" más adelante. La licuefacción se realiza preferiblemente en presencia de una alfa-amilasa. La fermentación se lleva a cabo preferiblemente en presencia de levadura, preferiblemente una cepa de *Saccharomyces*. Organismos fermentativos adecuados se enumeran en la sección "organismos de fermentación" más adelante. En formas de realización preferidas, los pasos (b) y (c) se realizan consecutiva o simultáneamente (es decir, como proceso SSF).

[0155] En una forma de realización particular, el proceso de la invención comprende además, antes del paso (a), los pasos de:

x) reducir el tamaño de partícula del material que contiene almidón, preferiblemente por molienda; y

y) formar un lodo que comprende el material que contiene almidón y agua.

[0156] La suspensión acuosa puede contener de 10-40% en peso, preferiblemente 25-35% en peso de material que contiene almidón. El lodo se calienta por encima de la temperatura de gelatinización y la alfa-amilasa, preferiblemente alfa-amilasa bacteriana y/o fúngica ácida se puede añadir para iniciar licuefacción (aclarado). El lodo puede se puede cocer por chorro en una forma de realización para gelatinizar más el lodo antes de ser sometido a una alfa-amilasa en el paso (a) de la invención.

[0157] Más específicamente, la licuefacción se puede realizar como un proceso de lodo en caliente de tres pasos. El lodo se calienta a entre 60-95°C, preferiblemente 80-85°C, y se añade la alfa-amilasa para iniciar licuefacción (aclarado). Luego el lodo se puede cocer por chorro a una temperatura entre 95-140°C, preferiblemente 105-125°C, durante 1-15 minutos, preferiblemente durante 3-10 minutos, especialmente alrededor de 5 minutos. El lodo se enfría a 60-95°C y se añade más alfa-amilasa para finalizar la hidrólisis (licuefacción secundaria). El proceso de licuefacción se realiza normalmente a pH 4,5-6,5, en particular a un pH entre 5 y 6. Granos enteros molidos y licuados se conocen como trituración.

[0158] La sacarificación del paso (b) se puede realizar utilizando condiciones bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, un proceso de sacarificación completa puede durar de aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas, no obstante, es común hacer solo una pre-sacarificación de típicamente 40-90 minutos a una temperatura entre 30-65°C, típicamente aproximadamente 60°C, seguida de sacarificación completa durante la fermentación en un proceso de sacarificación simultánea y de fermentación (proceso SSF). La sacarificación se realiza típicamente a temperaturas de 30-65°C, típicamente alrededor de 60°C, y a un pH entre 4 y 5, normalmente alrededor de pH 4,5.

[0159] El proceso más ampliamente usado en la producción del producto de fermentación, especialmente etanol, es el proceso de sacarificación simultánea y fermentación (SSF), donde no hay fase de retención para la sacarificación, lo que significa que el organismo fermentador, tal como la levadura, y la enzima(s) se pueden añadir juntos. La SSF se

puede efectuar típicamente a una temperatura entre 25°C y 40°C, tal como entre 29°C y 35°C, tal como entre 30°C y 34°C, tal como alrededor de 32°C. Según la invención la temperatura se puede subir o bajar durante la fermentación.

[0160] Conforme a la presente invención, el paso de fermentación (c) incluye, sin limitación, procesos de fermentación usados para producir alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H_2 y CO_2); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B_{12}, beta-caroteno); y hormonas. Procesos de fermentación preferidos incluyen procesos de fermentación alcohólica, como se conocen en la técnica. Procesos de fermentación preferidos son procesos de fermentación anaeróbicos, como se conocen bien en la técnica.

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

[0161] En este aspecto, la invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón sin gelatinización del material que contiene almidón (es decir, material que contiene almidón crudo). En una forma de realización solo una glucoamilasa de la invención se usa durante la sacarificación y la fermentación. Según la invención, el producto de fermentación deseado, tal como etanol, se puede producir sin licuar el lodo acuoso con el material que contiene almidón. En una forma de realización, un proceso de la invención incluye sacarificación material que contiene almidón (molido), por ejemplo, almidón granulado, por debajo de la temperatura de gelatinización en presencia de una glucoamilasa de la invención para producir azúcares que pueden ser fermentados en el producto de fermentación deseado por un organismo fermentador adecuado.

[0162] Por consiguiente, en este aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación de material que contiene almidón que comprende:

(a) sacarificación de material que contiene almidón con una glucoamilasa madura comprendida en SEC ID nº: 2 o SEC ID nº: 4, preferiblemente la secuencia mostrada como los aminoácidos 19 a 573 en SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4, o una glucoamilasa que tiene al menos 80%, de forma más preferible al menos 85%, de forma más preferible al menos 90%, de forma más preferible al menos 91%, de forma más preferible al menos 92%, incluso de forma más preferible al menos 93%, de la forma más preferible al menos 94%, e incluso de la forma más preferible al menos 95%, tal como incluso al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, o incluso al menos 99% de identidad con la misma, a una temperatura inferior a la temperatura de gelatinización inicial de dicho material que contiene almidón,

(b) fermentación utilizando un organismo fermentador.

[0163] Los pasos (a) y (b) del proceso de la invención se pueden realizar consecutiva o simultáneamente. En una forma de realización, un lodo que comprende agua y material que contiene almidón se prepara antes del paso (a).

[0164] El proceso de fermentación se puede llevar a cabo durante un periodo de 1 a 250 horas, preferiblemente es de 25 a 190 horas, de forma más preferible de 30 a 180 horas, de forma más preferible de 40 a 170 horas, incluso de forma más preferible de 50 a 160 horas, aún de forma más preferible de 60 a 150 horas, incluso aún de forma más preferible de 70 a 140 horas, y de la forma más preferible de 80 a 130 horas.

[0165] El término "temperatura inicial de gelatinización" se refiere a la temperatura mínima en la que la gelatinización del almidón comienza. Almidón calentado en agua empieza a gelatinizar entre 50°C y 75º, la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón específico, y puede ser fácilmente determinada por el experto en la materia. Así, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según la especie de planta, la variedad particular de las especies de planta al igual que con las condiciones de crecimiento. En el contexto de esta invención, la temperatura de gelatinización inicial de un material que contiene almidón dado es la temperatura en la que birrefringencia se pierde en 5% de los gránulos de almidón utilizando el método descrito por Gorinstein y Lii, 1992, Starch/Stärke 44(12): 461-466.

[0166] Antes del paso (a) un lodo de material que contiene almidón, tal como almidón granulado, que tiene 10-55% en peso de sólidos secos, preferiblemente 25-40 peso% en peso de sólidos secos, de forma más preferible 30-35% en peso de sólidos secos de material que contiene almidón se puede preparar. El lodo puede incluir agua y/o aguas de proceso, tal como vinaza (contracorriente), agua del depurador, agua del separador lateral condensad o destilada del evaporador u otra agua de proceso vegetal de producto de fermentación. Debido a que el proceso de la invención se realiza por debajo de la temperatura de gelatinización y por tanto no se produce ningún aumento de viscosidad significativo, niveles altos de vinaza se pueden utilizar si se desea. En una forma de realización, el lodo acuoso contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 70 vol. % vinaza, preferiblemente 15-60% vol. % vinaza, especialmente de aproximadamente 30 a 50 vol. % vinaza.

[0167] El material que contiene almidón se puede preparar reduciendo el tamaño de partícula, preferiblemente por molienda en húmedo o en seco, a 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente 0,1-0,5 mm. Después de ser sometidos a un proceso de la invención, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o

preferiblemente al menos 99% de los sólidos secos del material que contiene almidón se convierte en un hidrolizado de almidón soluble.

[0168] El proceso de la invención se realiza a una temperatura inferior a la temperatura de gelatinización inicial. Preferiblemente la temperatura en la que se realiza el paso (a) es entre 30- 75°C, preferiblemente entre 45-60°C.

[0169] En una forma de realización preferida, el paso (a) y el paso (b) se realizan como una sacarificación secuencial o simultánea y un proceso de fermentación. En tal forma de realización preferida, el proceso se lleva a cabo típicamente a una temperatura entre 25°C y 40°C, tal como entre 29°C y 35°C, tal como entre 30°C y 34°C, tal como alrededor de 32°C. Según la invención, la temperatura se puede subir o bajar durante la fermentación.

[0170] En una forma de realización, la sacarificación y la fermentación simultánea se realiza de modo que el nivel de azúcar, tal como el nivel de glucosa, se mantenga en un nivel bajo tal como por debajo de 6% en peso, preferiblemente por debajo de aproximadamente 3% en peso, preferiblemente por debajo de aproximadamente 2% en peso, más preferiblemente por debajo de aproximadamente 1% en peso, más preferiblemente incluso por debajo de aproximadamente 0,5% en peso, o más preferiblemente incluso por debajo de 0,25% en peso, tal como por debajo de aproximadamente 0,1% en peso. Tales bajos niveles de azúcar se pueden conseguir utilizando simplemente cantidades ajustadas de enzima y organismo fermentador. Un experto en la materia de la técnica puede determinar fácilmente qué cantidades de enzima y organismo fermentador hay que usar. Las cantidades empleadas de enzima y organismo fermentador también se puede seleccionar para mantener bajas concentraciones de maltosa en el caldo de fermentación. Por ejemplo, el nivel de maltosa se puede mantener por debajo de aproximadamente 0,5% en peso o debajo aproximadamente 0,2% en peso.

[0171] El proceso de la invención se puede llevar a cabo a un pH en la gama entre 3 y 7, preferiblemente de pH 3,5 a 6, o de la forma más preferible de pH 4 a 5.

Materiales que contienen almidón

[0172] Cualquier materia prima que contenga almidón adecuado, incluyendo almidón granulado, se puede utilizar según la presente invención. La materia prima se selecciona generalmente basada en el producto de fermentación deseado. Ejemplos de materias primas que contienen almidón, adecuadas para su uso en un proceso de la presente invención, incluyen tubérculos, raíces, tallos, granos enteros, granos, mazorcas, trigo, cebada, centeno, millo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, alubias o patatas dulces, o mezclas de los mismos, o cereales, materias primas que contienen azúcar, tales como melaza, materiales de fruta, caña de azúcar o remolacha azucarera, patatas, y materiales que contienen celulosa, tales como madera o residuos vegetales, o mezclas derivadas. Se contemplan ambos tipos cerosos y no cerosos de maíz y cebada.

[0173] El término "almidón granulado" se refiere a almidón no cocinado crudo, es decir, almidón en su forma natural como se encuentra en los cereales, tubérculos o granos. El almidón se forma dentro de células vegetales como ínfimos gránulos insolubles en agua. Cuando se ponen en agua fría, los gránulos de almidón pueden absorber una pequeña cantidad del líquido e hincharse. A temperaturas de hasta 50°C a 75°C la hinchazón pueden ser reversible. No obstante, con temperaturas más altas comienza una hinchazón irreversible llamada "gelatinización". El almidón granulado que se va a procesar puede ser una calidad de almidón altamente refinado, preferiblemente al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o al menos 99,5% puro o puede ser un material que contiene almidón más crudo que incluye grano entero molido incluyendo fracciones no amiláceas tales como residuos de germen y fibras. La materia prima, tal como el grano entero, se muele para descubrir la estructura y permitir más tratamiento. Dos procesos de molienda se prefieren según la invención: molienda en seco y en húmedo. En la molienda en seco, avellanas enteras se muelen y 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 donde 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 de almidón y están igualmente contempladas para el proceso de la invención.

[0174] El material que contiene almidón se reduce en tamaño de partícula, preferiblemente por molienda en húmedo o en seco, para exponer más área de superficie. En una forma de realización, el tamaño de partícula es entre 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente 0,1-0,5 mm, o de modo que al menos 30%, preferiblemente al menos 50%, de forma más preferible al menos 70%, incluso de forma más preferible al menos 90% del material que contiene almidón pase a través de una criba con una pantalla de 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente una pantalla de 0,1-0,5 mm.

Productos de fermentación

[0175] El término "producto de fermentación" se refiere a un producto producido por un proceso que incluye un paso de fermentación que utiliza un organismo fermentador. Los productos de fermentación contemplados según la invención incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H_2 y CO_2); antibióticos (por ejemplo, penicilina y etraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B_{12}, beta-caroteno); y hormonas. En una forma de realización preferida, el producto de

fermentación es etanol, por ejemplo, etanol de combustible; etanol potable, es decir, licores neutros potables; o etanol industrial o productos usados en la industria del alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), industria lechera (por ejemplo, productos lácteos fermentados), industria del cuero e industria del tabaco. Tipos de cerveza preferidos comprenden cerveza inglesa de malta, cerveza negra, cerveza porters, cerveza rubia, amarga, licores de malta, cerveza happoushu, cerveza alta en alcohol, cerveza baja en alcohol, cerveza baja en calorías o cerveza ligera. Procesos de fermentación preferidos usados incluyen procesos de fermentación de alcohol, como se conocen en la técnica. Procesos de fermentación preferidos son procesos de fermentación anaeróbicos, como se conocen bien en la técnica.

Organismos de fermentación

[0176] "Organismo de fermentación" se refiere a cualquier organismo, incluyendo organismos bacterianos y fúngicos, adecuados para usar en un proceso de fermentación y capaces de producir un producto de fermentación deseado. Los organismos de fermentación especialmente adecuados se pueden fermentar, es decir, convertir, azúcares, tales como glucosa o maltosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado. Ejemplos de organismos de fermentación incluyen organismos fúngicos, tal como levadura. La levadura preferida incluye cepas de Saccharomyces spp., en particular, *Saccharomyces cerevisiae*. Levadura disponible comercialmente incluye, por ejemplo, Red Star™/Lesaffre Ethanol Red (disponible de Red Star/Lesaffre, EE.UU.) FALI (disponible de Fleischmann's Yeast, una división de Burns Philp Food Inc., EE.UU.), SUPERSTART (disponible de Alltech), GERT STRAND (disponible de Gert Strand AB, Suecia) y FERMIOL (disponible de DSM Specialties).

ENZIMAS

Glucoamilasa

[0177] La glucoamilasa es preferiblemente una glucoamilasa de la invención. No obstante, como se ha mencionado anteriormente, una glucoamilasa de la invención también se puede combinar con otras glucoamilasas. El término "glucoamilasa" (1,4-alfa-D-glucano glucohidrolasa, EC 3.2.1.3) es una enzima que cataliza la liberación de D-glucosa a partir de las extremidades no reducidas de moléculas de oligosacáridos relacionados o almidón.

[0178] La glucoamilasa se puede añadir en una cantidad de 0,001 a 10 AGU/g DS, preferiblemente de 0,01 a 5 AGU/g DS, tal como alrededor de 0,1, 0,3, 0,5, 1 o 2 AGU/g DS, especialmente 0,1 a 0,5 AGU/g DS o 0,02-20 AGU/g DS, preferiblemente 0,1-10 AGU/g DS.

Alfa-amilasa

[0179] La alfa-amilasa puede ser según la invención de cualquier origen. Se prefieren las alfa amilasas de origen fúngico o bacteriano.

[0180] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, por ejemplo, alfa-amilasa ácida fúngica o alfa-amilasa ácida bacteriana. El término "alfa-amilasa ácida" se refiere a una alfa amilasa (EC 3.2.1.1) que añadida en una cantidad eficaz tiene actividad óptima en un pH en la gama de 3 a 7, preferiblemente de 3,5 a 6, o de la forma más preferible de 4-5.

Alfa-amilasas bacterianas

[0181] Según la invención, una alfa-amilasa bacteriana se puede derivar preferiblemente del género *Bacillus*.

[0182] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa de *Bacillus* se deriva de una cepa de *B. licheniformis, B. amyloliquefaciens, B. subtilis* o *B. stearothermophilus*, pero también se puede derivar de otra especie de *Bacillus*. Ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (BLA) mostrada en SEC ID nº: 4 en la WO 99/19467, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (BAN) mostrada en SEC ID nº: 5 en la WO 99/19467, y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (BSG) mostrada en SEC ID nº: 3 en la WO 99/19467. En una forma de realización de la invención, la alfa-amilasa es una enzima que tiene un grado de identidad de al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferido al menos 80%, más preferiblemente incluso al menos 90%, tal como al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con cualquiera de las secuencias mostradas como SEC ID NOS: 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente, en la WO 99/19467.

[0183] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrido, especialmente una descrita en cualquiera de WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059 y WO 02/10355 (todos los documentos se incorporan en la presente por referencia). Variantes de alfa-amilasa específicamente contempladas se describen en las patentes de EE.UU. números: 6.093.562, 6.187.576 y 6.297.038 (incorporadas por la presente por referencia) e incluyen variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (alfa-amilasa BSG) que tienen una eliminación de uno o dos aminoácidos en la posición 179 a 182, preferiblemente una eliminación doble descrita en la WO 96/23873 - véase, por ejemplo, página 20, líneas 1-10 (por la presente incorporada por referencia), que corresponde preferiblemente con delta(181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en SEC ID nº: 3 descrita en la WO 99/19467 o eliminación de los aminoácidos 179 y 180 usando SEC ID nº: 3 en la WO

99/19467 para numeración (cuya referencia es por la presente incorporada por referencia). Más preferidas incluso son las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, que tiene una eliminación doble que corresponde con delta(181-182) y además comprende una sustitución N193F (también denominada I181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en SEC ID nº: 3 descrita en la WO 99/19467.

[0184] La alfa-amilasa también puede ser una alfa-amilasa maltogénica. Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa, EC 3.2.1.133) puede hidrolizar amilosa y amilopectina en maltosa en la alfa configuración. Una alfa-amilasa maltogénica de la cepa de *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está comercialmente disponible en Novozymes A/S, Dinamarca. La alfa-amilasa maltogénica se describe en las patentes de EE.UU. números 4.598.048, 4.604.355 y 6.162.628, que son por la presente incorporadas por referencia.

Alfa-amilasas híbridas bacterianas

[0185] Una alfa-amilasa híbrida específicamente contemplada comprende 445 residuos de aminoácidos de C-terminal de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada como SEC ID nº: 3 en la WO 99/19467) y los 37 residuos de aminoácidos de N-terminal de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada como SEC ID nº: 3 en la WO 99/19467), con uno o varios, especialmente todas, de las siguientes sustituciones:

G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S (utilizando la numeración de *Bacillus licheniformis*). También preferido son variantes que tienen una o varias 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 (utilizando la numeración de SEC ID nº: 5 de la WO 99/19467).

[0186] La alfa-amilasa bacteriana se puede añadir en cantidades que son bien conocidas en la técnica. Cuando se miden en unidades KNU (descritas más abajo en la sección "Materiales y métodos") la actividad de alfa-amilasa está preferiblemente presente en una cantidad de 0,5-5,000 NU/g de DS, en una cantidad de 1-500 NU/g de DS, o de forma más preferible en una cantidad de 5-1,000 NU/g de DS, tal como 10-100 NU/g DS.

Alfa-amilasas fúngicas

[0187] Alfa-amilasas ácidas fúngicas incluyen alfa-amilasas ácidas derivadas de una cepa de *Aspergillus*, tal como alfa-amilasas de *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.

[0188] Una alfa-amilasa fúngica ácida preferida es una alfa-amilasa de tipo Fungamyl que se deriva preferiblemente de una cepa de *Aspergillus oryzae*. En la presente divulgación, el término "alfa-amilasa de tipo Fungamyl" indica una alfa-amilasa que muestra una identidad alta, es decir, mayor de 70%, mayor de 75%, mayor de 80%, mayor de 85%, mayor de 90%, mayor de 95%, mayor de 96%, mayor de 97%, mayor de 98%, mayor de 99% o incluso 100% de identidad con la parte madura de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID nº: 10 en la WO 96/23874.

[0189] Otra alfa-amilasa ácida preferida se deriva de una cepa de *Aspergillus niger*. En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa fúngica ácida es la de *A. niger* descrita como "AMYA_ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TeEMBL bajo el número de registro primario P56271 y descrita con más detalle en la WO 89/01969 (ejemplo 3). La alfa-amilasa ácida de *Aspergillus niger* ácido se muestra también como SEC ID nº: 1 en la WO 2004/080923 (Novozymes) *que se incorpora en la presente por referencia*. También variantes de dicha amilasa fúngica ácida que tienen al menos 70% de identidad, tal como al menos 80% o incluso al menos 90% de identidad, tal como al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad con la SEC ID nº: 1 en la WO 2004/080923 se contemplan. Una alfa-amilasa fúngica ácida disponible comercialmente adecuada derivada de *Aspergillus niger* es SP288 (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

[0190] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa se deriva de *Aspergillus kawachii* y es descrita por Kaneko *et al*., 1996, J. Ferment. Bioeng. 81: 292-298, "Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus* kawachii"; y además como EMBL:#AB008370.

[0191] La alfa-amilasa ácida fúngica también puede ser una enzima de tipo salvaje que comprende un módulo de unión a carbohidratos (CBM) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir, un no híbrido), o un variante de los mismos. En una forma de realización, la alfa-amilasa ácida de tipo salvaje se deriva de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

Alfa-amilasas híbridas fúngicas

[0192] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida. Ejemplos preferidos de alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen aquellos descritos en la WO 2005/003311 o la publicación de solicitud de EE.UU. nº 2005/0054071 (Novozymes) o solicitud de EE.UU. nº 60/638,614 (Novozymes) que se incorpora en la presente por referencia. Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico (CD) de alfa-amilasa y un dominio/módulo de unión a carbohidratos (CBM) y opcional un enlazador.

[0193] Ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellas descritas en la solicitud de EE.UU. nº 60/638,614 incluyendo variante de Fungamyl con dominio catalítico JA118 y SBD de *Athelia rolfsii* (SEC ID nº: 100 en la solicitud de EE.UU. nº 60/638,614), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador AMG y SBD de *Athelia rolfsii* (SEC ID nº: 101 en la solicitud de EE.UU. nº 60/638,614) y alfa-amilasa de *Meripilus giganteus* con enlazador y SBD de glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (SEC ID nº: 102 en la solicitud de EE.UU. nº 60/638.614).

[0194] Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellas descritas en la publicación de solicitud de EE.UU. nº: 2005/0054071, incluyendo aquellos descritos en la tabla 3 de la página 15, tal como alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con enlazador de *Aspergillus kawachii* y dominio de unión al almidón.

Productos de alfa-amilasa comerciales

[0195] Composiciones comerciales preferidas que comprenden alfa-amilasa incluyen MYCOLASE de DSM (Gist Brocades), BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X y SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE™ L-40,000, DEX-LOT™, SPEZYME™ FRED, SPEZYME™ AA, SPEZYME™ Ethyl, GC358, GC980, SPEZYME™ RSL, y SPEZYME™ DELTA AA (Genencor Int.), y la alfa-amilasa fúngica ácida vendida bajo el nombre comercial SP288 (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

[0196] Una alfa-amilasa ácida se puede añadir según la invención en una cantidad de 0,1 a 10 AFAU/g DS, preferiblemente 0,10 a 5 AFAU/g DS, especialmente 0,3 a 2 AFAU/g DS.

Producción de jarabe

[0197] La presente invención también proporciona un proceso del uso de una glucoamilasa de la invención para producir jarabe, tal como glucosa y similares, a partir de material que contiene almidón. Materias primas adecuadas se ejemplifican en la sección "materiales que contienen almidón" anterior. Generalmente, el proceso comprende los pasos de hidrolización parcial del material que contiene almidón (licuefacción) en presencia de alfa-amilasa y luego más sacarificación de la liberación de glucosa a partir de las extremidades no-reducidas de las moléculas de oligo y polisacáridos relacionadas o almidón en presencia de glucoamilasa de la invención.

[0198] La licuefacción y la sacarificación se pueden llevar a cabo como se ha descrito anteriormente para la producción de producto de fermentación.

[0199] La glucoamilasa de la invención también se puede usar de forma inmovilizada. Esto es adecuado y frecuentemente se usa para producir jarabes especiales, tales como jarabes de maltosa, y además para la corriente de refinado de oligosacáridos en relación con la producción de jarabes de fructosa, por ejemplo, jarabe rico en fructosa (HFS).

[0200] Consecuentemente, este aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de producción de jarabe a partir de material que contiene almidón, que comprende:

(a) licuefacción de material que contiene almidón en presencia de una alfa-amilasa, y

(b) sacarificación del material obtenido en el paso (a) utilizando una glucoamilasa de la invención.

[0201] Un jarabe se puede recuperar a partir del material sacarificado obtenido en el paso (b).

[0202] Detalles de condiciones adecuadas se pueden encontrar por encima.

Elaboración de cerveza

[0203] Una glucoamilasa de la invención también puede usarse en un proceso de elaboración de cerveza. La glucoamilasa de la invención se añade en cantidades eficaces que pueden ser fácilmente determinadas por el experto en la materia de la técnica.

[0204] La presente invención se describe a continuación por los siguientes ejemplos.

Materiales y métodos

[0205] Levadura: RED STAR™ disponible de Red Star/Lesaffre, EE.UU.

Medios y reactivos:

[0206] Los productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos calidad reactiva.

[0207] PDA: 39 g/L agar de dextrosa de patata, 20 g/L agar, 50 ml/L glicerol

Métodos

[0208] A menos que se especifique lo contrario, manipulaciones y transformaciones de ADN se realizaron utilizando métodos estándar de biología molecular como se describe en Sambrook *et al*. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. *et al*. (eds.) "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R., y Cutting, S. M. (eds.) "Molecular Biological Methods for *Bacillus*". John Wiley and Sons, 1990.

Actividad de glucoamilasa

[0209] La actividad de glucoamilasa se puede medir en unidades AGI o en unidades de glucoamilasa (AGU).

Actividad de glucoamilasa (AGI)

[0210] La glucoamilasa (equivalente a amiloglucosidasa) convierte el almidón en glucosa. La cantidad de glucosa es determinada aquí por el método de glucosa-oxidasa para la determinación de actividad. El método descrito en la sección 76-11 Método de almidón-glucoamilasa con medición posterior de glucosa con glucosa-oxidasa en "Approved methods of the American Association of Cereal Chemists". Vol.1-2 AACC, from American Association of Cereal Chemists, (2000); ISBN: 1- 891127-12-8.

[0211] Una unidad de glucoamilasa (AGI) es la cantidad de enzima que formará 1 micro mol de glucosa por minuto bajo las condiciones estándar del método.

Condiciones estándar/condiciones de reacción:

[0212]

Sustrato:	Almidón soluble, concentración aprox. 16 g material seco /L.
Tampón:	Acetato, aprox. 0,04 M, pH=4,3
pH:	4,3
Temperatura de incubación:	60°C
Tiempo de reacción:	15 minutos
Terminación de la reacción:	NaOH a una concentración de aproximadamente 0,2 g/L (pH~9)
Concentración enzimática:	0,15-0,55 AAU/mL.

[0213] El almidón debería ser almidón Lintner, que es un almidón de ebullición fina usado en el laboratorio como indicador colorimétrico. El almidón Lintner se obtiene por tratamiento de ácido clorhídrico diluido de almidón nativo de modo que retenga la capacidad de colorear de azul con yodo.

Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0214] La unidad Novo de glucoamilasa (AGU) se define como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándar 37°C, pH 4,3, sustrato: maltosa 23,2 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

[0215] Se puede usar un sistema autoanalizador. 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 usando un fotómetro a 340 nm como medida de la concentración de glucosa original.

Incubación AMG:	
Substrato:	maltosa 23,2 mM
Tampón:	acetato 0,1 M
pH:	4,30 ± 0,05
Temperatura de incubación:	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Gama de trabajo de enzima:	0,5-4,0 AGU/mL
Reacción de color:	
GlucDH:	430 U/L
Mutarotasa:	9 U/L
NAD:	0,21 mM
Tampón:	fosfato 0,12 M; 0,15 M NaCl
pH:	7,60 ± 0,05
Temperatura de incubación:	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Longitud de onda:	340 nm

[0216] Una carpeta (EB-SM-0131,02/01) que describe este método analítico con más detalle está disponible en la solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca, esta carpeta se incluye en la presente por referencia.

Actividad de alfa-amilasa (KNU)

[0217] La actividad de 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 marrón rojizo, que se compara con un vidrio coloreado estándar.

[0218] Una Unidad Kilo Novo (KNU) de alfa-amilasa se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (es decir, a 37°C +/- 0,05, 0,0003 M Ca2+ à; y pH 5,6) dextriniza 5260 mg de sustancia seca de almidón Merck Amylum soluble.

[0219] Una carpeta EB-SM-0009.02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible bajo pedido en Novozymes A/S, Dinamarca, esta carpeta se incluye en la presente por referencia.

Actividad de alfa-amilasa ácida

[0220] Cuando se usa según la presente invención, la actividad de cualquier alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida). Alternativamente, la actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AAU (unidades de alfa-amilasa ácida).

Unidades de alfa-amilasa ácida (AAU)

[0221] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AAU (unidades de alfa-amilasa ácida), que es un método absoluto. Una unidad de amilasa ácida (AAU) es la cantidad de enzima que convierte 1 g de almidón (100% de sustancia seca) por hora bajo condiciones estandarizadas en un producto que tiene una transmisión a 620 nm después de reacción con una solución de yodo de fuerza conocida igual a la de una referencia de color.

<u>Condiciones estándar/condiciones de reacción</u>:

[0222]

Substrato: Almidón soluble, Concentración aprox, 20 g DS/L,

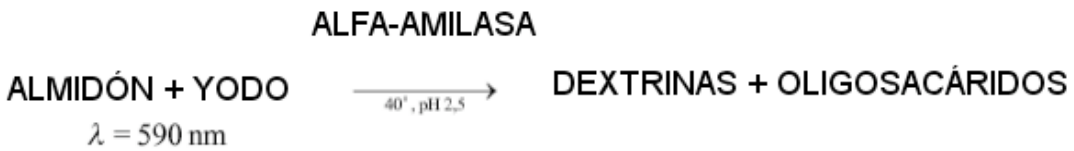
Tampón:	Citrato, aprox, 0,13 M, pH=4,2
Solución de yodo:	40,176 g yoduro potásico + 0,088 g yodo /L
Agua de ciudad:	15°-20°dH (dureza de grado alemán)
pH:	4,2
Temperatura de incubación:	30°C
Tiempo de reacción:	11 minutos
Longitud de onda:	620 nm
Concentración enzimática:	0,13-0,19 AAU/mL
Gama de trabajo de enzima:	0,13-0,19 AAU/mL

[0223] El almidón debería ser almidón Lintner, que es un almidón de ebullición fina usado en el laboratorio como indicador colorimétrico. El almidón Lintner se obtiene por tratamiento de ácido clorhídrico diluido de almidón natural de modo que éste retenga la capacidad de colorear de azul con yodo. Detalles adicionales se pueden descubrir en la EP 0140410 B2, cuya divulgación se incluye en la presente por referencia.

Actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)

[0224] 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. 1 AFAU se define como la cantidad de enzima que degrada 5,260 mg de sustancia seca de almidón por hora bajo las condiciones estándar abajo mencionadas.

[0225] Alfa-amilasa ácida, una endo-alfa-amilasa (1,4-alfa-D-glucano-glucanohidrolasa, E.C. 3.2.1.1) hidroliza enlaces alfa-1,4-glucosídicos en las regiones internas de la molécula de almidón para formar dextrinas y oligosacáridos con longitudes de cadena diferentes. La intensidad de color formada con yodo es directamente proporcional a la concentración de almidón. La actividad de amilasa se determina utilizando colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón bajo las condiciones analíticas específicas.



azul/violeta t = 23 seg. de decoloración

Condiciones estándar/condiciones de reacción:

[0226]

Substrato:	Almidón soluble, aprox, 0,17 g/L
Tampón:	Citrato, aprox, 0,03 M
Yodo (I_2):	0,03 g/L
$CaCl_2$:	1,85 mM
pH:	2,50 ± 0,05
Temperatura de incubación:	40°C
Tiempo de reacción:	23 segundos
Longitud de onda:	590 nm
Concentración enzimática:	0,025 AFAU/mL
Gama de trabajo de enzima:	0,01-0,04 AFAU/mL

[0227] Una carpeta EB-SM-0259,02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible bajo pedido en Novozymes A/S, Dinamarca, esta carpeta se incluye en la presente por referencia.

Ejemplo 1

Sacarificación simultánea y fermentación (SSF) con AMG de *Artomyces pyxidatus*

[0228] El rendimiento de SSF de las glucoamilasas de *Artomyces pyxidatus* se evaluó en diferentes dosis de enzima. La fermentación se realizó bajo las siguientes condiciones:

Sustrato: maíz molido fue suspendido con contracorriente y su sustancia seca se ajustó a aproximadamente 32% (p/p). Luego fue licuado a 85°C y pH 5,8. La trituración licuada tenía una DE de 13,4.
Temperatura: 32°C
pH inicial: 5,0
Dosis enzimática: AMG de *Artomyces pyxidatus* producida en *A. niger* en 30, 40, 55 y 70 microgramos de proteína de enzima/g DS.

[0229] Las enzimas se compararon con una muestra purificada de AMG de *Talaromyces emersonii* comercial dosificado en las mismas dosificaciones. La máxima dosis de AMG de *Talaromyces emersonii* es equivalente a una cantidad pertinente en la industria de 0,56 AGU/g DS. Un control para sacarificación máxima obtenible se preparó usando cantidades en exceso de AMG comercial y alfa-amilasa.

Fermentación

[0230] Al sustrato para SSF, se añadió 1.000 ppm de urea como fuente de nitrógeno y 3 ppm de penicilina para control bacteriano; el pH fue ajustado a 5,0 con H_2SO_4. Partes alícuotas de 5 g de trituración fueron transferidas a tubos centrifugadores de 15 ml con un orificio practicado en la parte superior para liberar CO_2. Se añadieron enzimas y levadura y los tubos se colocaron al baño maría sin agitación a 32°C durante 54 horas. Se analizaron muestras en HPLC para determinar el etanol producido durante la fermentación. Los resultados se muestran en las tablas más abajo.

Tabla 1. Etanol g/L producido durante SSF con AMG de *Artomyces pyxidatus* en 30, 40, 55 y 70 microgramos de proteína de enzima/g DS en comparación con AMG de *Talaromyces emersonii*.
El control resultó en 133,08 g/L etanol.

	Dosis enzimática (microgramos de proteína de enzima/g DS)			
	30	40	55	70
Talaromyces emersonii, SEC ID nº: 8	110,3	119,8	124,9	126,9
Artomyces pyxidatus, SEC ID nº: 2	111,2	122,2	128,2	129,0

Tabla 2. Etanol g/L producido durante SSF con AMG de *Artomyces pyxidatus* en 30, 40, 55 and 70 microgramos de proteína de enzima/g DS en comparación con AMG de *Talaromyces emersonii*.
El control resultó en 131,9 g/L etanol.

	Dosis enzimática (microgramos de proteína de enzima/g DS)			
	30	40	55	70
Talaromyces emersonii, SEC ID nº: 8	110,4	118,9	123,4	125,6
Artomyces pyxidatus, SEC ID nº: 4	109,7	124,3	128,9	129,1

Tabla 3. Rendimiento de etanol producido durante SSF con AMG de *Artomyces pyxidatus* en 30, 40, 55 y 70 microgramos de proteína de enzima/g DS en comparación con AMG de *Talaromyces emersonii* y AMG de *Trametes cingulata*.
El control resultó en 100% de rendimiento.

	Dosis enzimática (microgramos de proteína de enzima/g DS)			
	30	40	55	70
AMG de *Artomyces pyxidatus*, SEC ID nº: 4	84%	94%	98%	98%
AMG G1 de *Trametes cingulata*, SEC ID nº: 6	87%	90%	97%	98%
T-AMG de *Talaromyces emersonii*, SEC ID nº: 8	83%	90%	94%	95%

Depósito de material biológico

[0231] El siguiente material biológico se ha depositado según las condiciones del tratado de Budapest con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM), Mascheroder Weg 1 B, D-38124 Braunschweig, Alemania, y se le ha dado el siguiente número de registro:

Depósito: cepa de *E. coli* NN059224 con plásmido que comprende la secuencia D4UT (SEC ID nº: 1)

Número de registro: DSM 23223. Fecha de depósito: 13 de enero de 2010

[0232] Las cepas se han depositado en condiciones que aseguran que el acceso al cultivo estará disponible durante la tramitación de esta solicitud de patente para que uno determinado por las leyes de patentes extranjeras esté autorizado a ello. El depósito representa un cultivo sustancialmente puro de la cepa depositada. El depósito está disponible según sea necesario por las leyes de patentes extranjeras en países donde equivalentes de la presente solicitud o sus descendientes sean presentados. No obstante, se debe entender que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la presente invención en derogación de los derechos de patente concedidos por acción gubernamental.

Listado de secuencias

[0233]

<110> Landvik, Sara
Ayabe, Keiichi
Coward-Kelly, Guillermo

<120> Polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa y polinucleótidos que codifican los mismos

<130> 11646-WO-PCT

<150> US 61/264,971
<151> 2009-11-30

<160> 8

<170> Versión de patentIn 3.5

<210> 1
<211> 2091
<212> ADN
<213> Artomyces pyxidatus

<400> 1

atgcatctca cccagttcgt ctacgccctc ggcctcgcag gcagggttgc ctcgcagtcc 60

ggcaccgtcg acgcgttcgt cgcgagcgag tcgcccatcg cgaaggcggg gctcctcgcg 120

aacatcggcc ccagcggcgc gaagtcttcc ggagccaaag tgagtcgcgc cgaattcccc 180

atactgggtg ttctgacgca gggtgcagtc cggcgtggtc atcgcgagcc ccagtacgtc 240

aaacccggac tacctgtatt cctgggtccg cgactcgtcg ctcgtgttca agaccattac 300

cgatcagttt accctcgggg aagacacctc ccttcgcagt cagatcgaca acttcatcac 360

cgccgaggcg atcctccagc aggtatcgaa ccctagtggt acggtctcaa caggcggtct 420

tggagagccg aagttcaaca ttgatgagac ggcgttcacg ggctcttggg gtcgcccaca 480

acgaggtatg tgcgcatctg tgattcaaag cctagacttc gtaatgatga attcagatgg 540

accggctttg cgctcgacgg cgatgatcac ttatgcaaac tggctgttgg accataataa 600

ctcgacgttt gtcaccaaca cgctctggcc gatcatcgag ttggatctga attatgtcgc 660

cgagaactgg aaccagtcta ggtacgtcat agtcgaatct acgtgctcaa taccttaata 720

acttcttgtt ctcaagcttc gacctctggg aagagattga ctcatcctct ttcttcacca 780

ccgccgtaca acaccgttct ctgcgcgagg gatctgctct cgcaacccga atcgggcaaa 840

cctccgtgac cgcgaattat cttacgcagg ccgacaacct cttatgtttc cttaacgtga 900

gcttacctcg tcttgagcca acattcacat ctaattatcg cttgcagtcc tactggaatc 960

ctactgaagg ctatatcact gccaacaccg gaggaggacg ttccggaaaa gactcgaata 1020

cggttctcgc gtcaattcac acgtgggaca tcagtgccgg atgcgacgct agcacattcc 1080

aaccctgctc cgacaaagct ttgtcgaatc tgaaggtcta tgtcgactcc ttccgatcca 1140

tctacaccat caacagcggc ataagcgcga cgtcagcggt cgcaactgga cgctatcccg 1200

aagatgttta ttataatggc aacgtgcgtc tcaatcttga tctgacacga gctaggcctc 1260

tgacgccttc tttagccttg gtacctcacg acccttgctg tagcggaaca gctatatgac 1320

gcgctcctca cctggaactc gatcggatcc ctagaagtca cggcaacgtc tctacccttc 1380

ttcagccaat tctcctcaag cgtatccacg ggcacatatt cctcgacctc gagcacatac 1440

accactctta cgaacgcgat caagtcgttc gcagatggat ttgtggcgat cgtcgctgca 1500

cacacgccat cgggcggagg tctctccgag cagtacgaca ggaacaccgg cacgccgctc 1560

agcgctgcgg accttacctg gagctacgcg tctgcattga cggcgttcgg cgcccgcgct 1620

gggacgataa ctgcgagctg gggcgcgagt gggttgaccg tgccctcgca gtgcacggcg 1680

aatcctggca gcgtggtttc cgtgacgttc aatgtgcagg cgacgacgca gctcggaggt 1740

aagcaacaga tgaactccta tcgcgtcgta tgctgatgtg taactctgac attcagagaa 1800

catctatctc accggctccg tcgacgcgct ggagaactgg tcgcctgata acgcgctgct 1860

gctatctgcg gcaaattacc cgacatggag cagtgcgtac ctctttgcca tttcgcttag 1920

tacgtcttct gacttgagga tgcagtcacc gtgacgctcc ctgcgaacac gattgtgcag 1980

tacaagtaca tccgcaagtt caacggccag gtgacatggg agtcggaccc aaacaaccag 2040

atcacgacgc ccgcgactgg gacatctgtc gagaacgata catggagatg a 2091

<210> 2
<211> 573
<212> PRT
<213> Artomyces pyxidatus

<400> 2

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

Ala Ser Gln Ser Gly Thr Val Asp Ala Phe Val Ala Ser Glu Ser Pro
20 25 30

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

Ser Ser Gly Ala Lys Ser Gly Val Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Ser
50 55 60

Asn Pro Asp Tyr Leu Tyr Ser Trp Val Arg Asp Ser Ser Leu Val Phe
65 70 75 80

Lys Thr Ile Thr Asp Gln Phe Thr Leu Gly Glu Asp Thr Ser Leu Arg
85 90 95

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

Ser Asn Pro Ser Gly Thr Val Ser Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys
115 120 125

Phe Asn Ile Asp Glu Thr Ala Phe Thr Gly Ser Trp Gly Arg Pro Gln
130 135 140

Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ser Thr Ala Met Ile Thr Tyr Ala Asn
145 150 155 160

Trp Leu Leu Asp His Asn Asn Ser Thr Phe Val Thr Asn Thr Leu Trp
165 170 175

Pro Ile Ile Glu Leu Asp Leu Asn Tyr Val Ala Glu Asn Trp Asn Gln
180 185 190

Ser Ser Phe Asp Leu Trp Glu Glu Ile Asp Ser Ser Ser Phe Phe Thr
195 200 205

Thr Ala Val Gln His Arg Ser Leu Arg Glu Gly Ser Ala Leu Ala Thr
210 215 220

Arg Ile Gly Gln Thr Ser Val Thr Ala Asn Tyr Leu Thr Gln Ala Asp
225 230 235 240

Asn Leu Leu Cys Phe Leu Asn Ser Tyr Trp Asn Pro Thr Glu Gly Tyr
245 250 255

Ile Thr Ala Asn Thr Gly Gly Gly Arg Ser Gly Lys Asp Ser Asn Thr
260 265 270

Val Leu Ala Ser Ile His Thr Trp Asp Ile Ser Ala Gly Cys Asp Ala
275 280 285

Ser Thr Phe Gln Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val
290 295 300

Tyr Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr Thr Ile Asn Ser Gly Ile Ser
305 310 315 320

Ala Thr Ser Ala Val Ala Thr Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Tyr
325 330 335

Asn Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Thr Thr Leu Ala Val Ala Glu Gln Leu
340 345 350

Tyr Asp Ala Leu Leu Thr Trp Asn Ser Ile Gly Ser Leu Glu Val Thr
355 360 365

Ala Thr Ser Leu Pro Phe Phe Ser Gln Phe Ser Ser Ser Val Ser Thr

370 375 380

Gly Thr Tyr Ser Ser Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Thr Leu Thr Asn Ala
385 390 395 400

Ile Lys Ser Phe Ala Asp Gly Phe Val Ala Ile Val Ala Ala His Thr
405 410 415

Pro Ser Gly Gly Gly Leu Ser Glu Gln Tyr Asp Arg Asn Thr Gly Thr
420 425 430

Pro Leu Ser Ala Ala Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ser Ala Leu Thr
435 440 445

Ala Phe Gly Ala Arg Ala Gly Thr Ile Thr Ala Ser Trp Gly Ala Ser
450 455 460

Gly Leu Thr Val Pro Ser Gln Cys Thr Ala Asn Pro Gly Ser Val Val
465 470 475 480

Ser Val Thr Phe Asn Val Gln Ala Thr Thr Gln Leu Gly Glu Asn Ile
485 490 495

Tyr Leu Thr Gly Ser Val Asp Ala Leu Glu Asn Trp Ser Pro Asp Asn
500 505 510

Ala Leu Leu Leu Ser Ala Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ile Thr Val
515 520 525

Thr Leu Pro Ala Asn Thr Ile Val Gln Tyr Lys Tyr Ile Arg Lys Phe
530 535 540

Asn Gly Gln Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Asn Gln Ile Thr Thr
545 550 555 560

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

<210> 3

<211> 2091
<212> ADN
<213> Artomyces pyxidatus

<400> 3

```
atgcatctca cccagttcgt ctacgccctc ggcctcgcag gcagggttgc ctcgcagtcc      60

ggcaccgtcg acgcgttcgt cgcgagcgag tcgcccatcg cgaaggcggg gctcctcgcg     120

aacatcggcc ccagcggcgc gaagtcttcc ggagccaaag tgagtcgcgc cgaattcccc     180

atactgggtg ttctgacgca gggtgcagtc cggcgtggtc atcgcgagcc ccagtacgtc     240
```

aaacccggac tacctgtata cctgggtccg cgactcgtcg ctcgtgttca agaccattac 300
cgatcagttt accctcgggg aagacacctc ccttcgcagt cagatcgaca acttcatcac 360
cgccgaggcg atcctccagc aggtatcgaa ccctagtggt acggtctcaa caggcggtct 420
tggagagccg aagttcaaca ttgatgagac ggcgttcacg ggctcttggg gtcgcccaca 480
acgaggtatg tgcgcatctg tgattcaaag cctagacttc gtaatgatga attcagatgg 540
accggctttg cgctcgacgg cgatgatcac ttatgcaaac tggctgttgg accataataa 600
ctcgacgttt gtcaccaaca cgctctggcc gatcatcgag ttggatctga attatgtcgc 660
cgagaactgg aaccagtcta ggtacgtcat agtcgaatct acgtgctcaa tacctcaata 720
aattcttgtt ctcaagcttc gacctctggg aagagattga ctcatcctct ttcttcacca 780
ccgccgtaca acaccgttct ctgcgcgagg gatctgctct cgcaacccga atcgggcaaa 840
cctccgtgac cgcgaattat cttacgcagg ccgacaacct cttatgtttc cttaacgtga 900
gcttacctcg tcttgagcca acattcacat ctaattatcg cttgcagtcc tactggaatc 960
ctactgaagg ctatatcact gccaacaccg gaggaggacg ttccggaaaa gactcgaata 1020
cggttctcgc gtcaattcac acttgggaca tcagtgccgg atgcgaccct gctacattcc 1080
aaccctgctc cgacaaagct ttgtcgaatc tgaaggtcta tgtcgactcc ttccgatcca 1140
tctacaccat caacagcggc ataagcgcga cctcggcggt cgcaactgga cgctatcccg 1200
aggatgtcta ttataacggc aatgtgcgtt tcaatcctga tctgacgcaa gccaggcctc 1260
tgacgcattc tttagccttg gtatctcacg acccttgctg tagcggaaca gttatatgac 1320
gcgctcctca cctggaactc gatcggatcc ttagaagtca cagcaacgtc tctacccttc 1380
ttcagccaat tctcctctag tgtatccaca ggcacatatt cctcgacctc gagcacatac 1440
accaccctta cgaacgcgat caagtcgttc gcagatggat ttgtggcgat cgtcgctgaa 1500
cacacaccct cgggcggagg tctctccgag cagtacgaca ggaacaccgg cacgccgctc 1560
agcgctgcgg acctaacctg gagctacgcg tctgcattga cggcgttcgg cgcgcgcgct 1620
gggacgataa ctgcgagctg gggcgcgagt gggttgaccg tgccctcgca gtgcacggcg 1680
aatcctggca gcgtcgtttc cgtgacgttc aatgtgcagg cgacgacgca gctcggaggt 1740
aagcaacaga tgaactccta tcgcgtcgta tgctgatgtg taattctgac attcagagaa 1800
catctatctc accggctccg tcgacgcgct ggagaactgg tcgcctgata acgcgctgct 1860
gctatctgcg gcaaattacc cgacatggag cagtgcgtac ctctttgtca tttcgcttag 1920
tacgtcttct gacttgagga tgcagtcacc gtgacgctcc ctgcgaagac gattgtgcag 1980
tacaagtaca tccgcaagtt caacggccag gtgacatggg agtcggaccc aaacaaccag 2040
atcacgacgc ccgcgactgg gacatctgtc gagaacgata catggagatg a 2091

<210> 4
<211> 573
<212> PRT
<213> Artomyces pyxidatus

<400> 4

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

Ala Ser Gln Ser Gly Thr Val Asp Ala Phe Val Ala Ser Glu Ser Pro
20 25 30

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

Ser Ser Gly Ala Lys Ser Gly Val Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Ser
50 55 60

Asn Pro Asp Tyr Leu Tyr Thr Trp Val Arg Asp Ser Ser Leu Val Phe
65 70 75 80

Lys Thr Ile Thr Asp Gln Phe Thr Leu Gly Glu Asp Thr Ser Leu Arg
85 90 95

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

Ser Asn Pro Ser Gly Thr Val Ser Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys
115 120 125

Phe Asn Ile Asp Glu Thr Ala Phe Thr Gly Ser Trp Gly Arg Pro Gln
130 135 140

Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ser Thr Ala Met Ile Thr Tyr Ala Asn
145 150 155 160

Trp Leu Leu Asp His Asn Asn Ser Thr Phe Val Thr Asn Thr Leu Trp
165 170 175

Pro Ile Ile Glu Leu Asp Leu Asn Tyr Val Ala Glu Asn Trp Asn Gln
180 185 190

Ser Ser Phe Asp Leu Trp Glu Glu Ile Asp Ser Ser Ser Phe Phe Thr
195 200 205

Thr Ala Val Gln His Arg Ser Leu Arg Glu Gly Ser Ala Leu Ala Thr
210 215 220

Arg Ile Gly Gln Thr Ser Val Thr Ala Asn Tyr Leu Thr Gln Ala Asp
225 230 235 240

Asn Leu Leu Cys Phe Leu Asn Ser Tyr Trp Asn Pro Thr Glu Gly Tyr
245 250 255

Ile Thr Ala Asn Thr Gly Gly Gly Arg Ser Gly Lys Asp Ser Asn Thr
260 265 270

Val Leu Ala Ser Ile His Thr Trp Asp Ile Ser Ala Gly Cys Asp Pro
275 280 285

Ala Thr Phe Gln Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val
290 295 300

Tyr Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr Thr Ile Asn Ser Gly Ile Ser
305 310 315 320

Ala Thr Ser Ala Val Ala Thr Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Tyr
325 330 335

Asn Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Thr Thr Leu Ala Val Ala Glu Gln Leu
340 345 350

Tyr Asp Ala Leu Leu Thr Trp Asn Ser Ile Gly Ser Leu Glu Val Thr
355 360 365

Ala Thr Ser Leu Pro Phe Phe Ser Gln Phe Ser Ser Ser Val Ser Thr
370 375 380

Gly Thr Tyr Ser Ser Thr Ser Ser Thr Tyr Thr Thr Leu Thr Asn Ala
385 390 395 400

Ile Lys Ser Phe Ala Asp Gly Phe Val Ala Ile Val Ala Glu His Thr
405 410 415

Pro Ser Gly Gly Gly Leu Ser Glu Gln Tyr Asp Arg Asn Thr Gly Thr
420 425 430

Pro Leu Ser Ala Ala Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ser Ala Leu Thr
435 440 445

Ala Phe Gly Ala Arg Ala Gly Thr Ile Thr Ala Ser Trp Gly Ala Ser
450 455 460

Gly Leu Thr Val Pro Ser Gln Cys Thr Ala Asn Pro Gly Ser Val Val
465 470 475 480

Ser Val Thr Phe Asn Val Gln Ala Thr Thr Gln Leu Gly Glu Asn Ile
485 490 495

Tyr Leu Thr Gly Ser Val Asp Ala Leu Glu Asn Trp Ser Pro Asp Asn

500 505 510

Ala Leu Leu Leu Ser Ala Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ile Thr Val
515 520 525

Thr Leu Pro Ala Lys Thr Ile Val Gln Tyr Lys Tyr Ile Arg Lys Phe
530 535 540

Asn Gly Gln Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Asn Gln Ile Thr Thr
545 550 555 560

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

<210> 5
<211> 1725
<212> ADN

<213> Trametes cingulata

<400> 5

atgcgtttca cgctcctcac ctccctcctg ggcctcgccc tcggcgcgtt cgcgcagtcg 60
agtgcggccg acgcgtacgt cgcgtccgaa tcgcccatcg ccaaggcggg tgtgctcgcc 120
aacatcgggc ccagcggctc caagtccaac ggagcaaagg caggcatcgt gattgcaagt 180
ccgagcacat ccaacccgaa ctacctgtac acatggacgc gcgactcgtc cctcgtgttc 240
aaggcgctca tcgaccagtt caccactggc gaagatacct cgctccgaac tctgattgac 300
gagttcacct cggcggaggc catactccag caggtgccga acccgagcgg gacagtcagc 360
actggaggcc tcggcgagcc caagttcaac atcgacgaga ccgcgttcac ggatgcctgg 420
ggtcgtcctc agcgcgatgg tcccgctctc cgggcgactg ccatcatcac ctacgccaac 480
tggctcctcg acaacaagaa cacgacctac gtgaccaaca ctctctggcc tatcatcaag 540
ctcgacctcg actacgtcgc cagcaactgg aaccagtcca cgtttgatct ctgggaggag 600
attaactcct cgtcgttctt cactaccgcc gtccagcacc gtgctctgcg cgagggcgcg 660
actttcgcta atcgcatcgg acaaacctcg gtggtcagcg ggtacaccac ccaagcaaac 720
aaccttctct gcttcctgca gtcgtactgg aaccccaccg gcggctatat caccgcaaac 780
acgggcggcg gccgctctgg caaggacgcg aacaccgttc tcacgtcgat ccacaccttc 840
gacccggccg ctggatgcga cgctgttacg ttccagccgt gctcggacaa ggcgctgtcg 900
aacttgaagg tgtacgtcga tgcgttccgc tcgatctact ccatcaacag cgggatcgcc 960
tcgaatgcgg ccgttgctac cggccgctac cccgaggaca gctacatggg cggaaaccca 1020
tggtacctca ccacctccgc cgtcgctgag cagctctacg atgcgctcat tgtgtggaac 1080
aaacttggcg ccctgaacgt cacgagcacc tccctcccct tcttccagca gttctcgtca 1140
ggcgtcaccg tcggcaccta tgcctcatcc tcgtccacct tcaagacgct cacttccgcc 1200
atcaagacct tcgccgacgg cttcctcgcg gtcaacgcca agtacacgcc ctcgaacggc 1260
ggccttgctg aacagtacag ccggagcaac ggctcgcccg tcagcgctgt ggacctgacg 1320
tggagctatg ctgctgccct cacgtcgttt gctgcgcgct caggcaagac gtatgcgagc 1380
tggggcgcgg cgggtttgac tgtcccgacg acttgctcgg ggagtggcgg tgctgggact 1440
gtggccgtca ccttcaacgt gcaggcgacc accgtgttcg gcgagaacat ttacatcaca 1500
ggctcggtcc ccgctctcca gaactggtcg cccgacaacg cgctcatcct ctcagcggcc 1560
aactacccca cttggagcat caccgtgaac ctgccggcga gcacgacgat cgagtacaag 1620
tacattcgca agttcaacgg cgcggtcacc tgggagtccg acccgaacaa ctcgatcacg 1680
acgcccgcga gcggcacgtt cacccagaac gacacctggc ggtag 1725

<210> 6
<211> 574
<212> PRT
<213> Trametes cingulata

<400> 6

Met Arg Phe Thr Leu Leu Thr Ser Leu Leu Gly Leu Ala Leu Gly Ala
1 5 10 15

Phe Ala Gln Ser Ser Ala Ala Asp Ala Tyr Val Ala Ser Glu Ser Pro
20 25 30

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

Ser Asn Gly Ala Lys Ala Gly Ile Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Ser
50 55 60

Asn Pro Asn Tyr Leu Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Ser Leu Val Phe
65 70 75 80

Lys Ala Leu Ile Asp Gln Phe Thr Thr Gly Glu Asp Thr Ser Leu Arg
85 90 95

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

Pro Asn Pro Ser Gly Thr Val Ser Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys
115 120 125

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

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

Trp Leu Leu Asp Asn Lys Asn Thr Thr Tyr Val Thr Asn Thr Leu Trp
165 170 175

Pro Ile Ile Lys Leu Asp Leu Asp Tyr Val Ala Ser Asn Trp Asn Gln
180 185 190

Ser Thr Phe Asp Leu Trp Glu Glu Ile Asn Ser Ser Ser Phe Phe Thr
195 200 205

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

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

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

Ile Thr Ala Asn Thr Gly Gly Gly Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr
260 265 270

Val Leu Thr Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Ala Ala Gly Cys Asp Ala
275 280 285

Val Thr Phe Gln Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val
290 295 300

Tyr Val Asp Ala Phe Arg Ser Ile Tyr Ser Ile Asn Ser Gly Ile Ala
305 310 315 320

Ser Asn Ala Ala Val Ala Thr Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Ser Tyr Met
325 330 335

Gly Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Thr Thr Ser Ala Val Ala Glu Gln Leu
340 345 350

Tyr Asp Ala Leu Ile Val Trp Asn Lys Leu Gly Ala Leu Asn Val Thr
355 360 365

Ser Thr Ser Leu Pro Phe Phe Gln Gln Phe Ser Ser Gly Val Thr Val
370 375 380

Gly Thr Tyr Ala Ser Ser Ser Ser Thr Phe Lys Thr Leu Thr Ser Ala
385 390 395 400

Ile Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe Leu Ala Val Asn Ala Lys Tyr Thr
405 410 415

Pro Ser Asn Gly Gly Leu Ala Glu Gln Tyr Ser Arg Ser Asn Gly Ser
420 425 430

Pro Val Ser Ala Val Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Ala Leu Thr
435 440 445

Ser Phe Ala Ala Arg Ser Gly Lys Thr Tyr Ala Ser Trp Gly Ala Ala
450 455 460

Gly Leu Thr Val Pro Thr Thr Cys Ser Gly Ser Gly Gly Ala Gly Thr
465 470 475 480

Val Ala Val Thr Phe Asn Val Gln Ala Thr Thr Val Phe Gly Glu Asn
485 490 495

Ile Tyr Ile Thr Gly Ser Val Pro Ala Leu Gln Asn Trp Ser Pro Asp
500 505 510

Asn Ala Leu Ile Leu Ser Ala Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ile Thr
515 520 525

Val Asn Leu Pro Ala Ser Thr Thr Ile Glu Tyr Lys Tyr Ile Arg Lys
530 535 540

Phe Asn Gly Ala Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Asn Ser Ile Thr
545 550 555 560

Thr Pro Ala Ser Gly Thr Phe Thr Gln Asn Asp Thr Trp Arg
565 570

<210> 7
<211> 2076
<212> ADN
<213> Talaromyces emersonii

<400> 7

```
atggcgtccc tcgttgctgg cgctctctgc atcctgggcc tgacgcctgc tgcatttgca      60
cgagcgcccg ttgcagcgcg agccaccggt tccctggact cctttctcgc aaccgaaact     120
ccaattgccc tccaaggcgt gctgaacaac atcgggccca atggtgctga tgtggcagga     180
gcaagcgccg gcattgtggt tgccagtccg agcaggagcg acccaaattg taggttcttt     240
cccaccagaa attacttatt taaatcagcc ctctgacagg ttgaagattt ctactcctgg     300
acacgtgacg cagcgctcac ggccaaatac ctcgtcgacg ccttcatcgc gggcaacaag     360
gacctagagc agaccatcca gcagtacatc agcgcgcagg cgaaggtgca aactatctcc     420
aatccgtccg gagatttatc caccggtggc ttaggtgagc ccaagttcaa tgtgaatgag     480
acggctttta ccgggccctg gggtcgtcca cagagggacg gaccagcgtt gagagcgacg     540
gccctcattg cgtatgcgaa ctatctcatc gtaagcttct gctcgctgcc cttctctctg     600
```

ctcgtatgct aagtagtcct gtcaggacaa cggcgaggct tcgactgccg atgagatcat 660

ctggccgatt gtccagaatg atctgtccta catcacccaa tactggaact catccacctt 720

cggtaggcaa atgaatattc ccgacacagc gtggtactaa tttgattcag acctctggga 780

agaagtagaa ggatcctcat tcttcacaac cgccgtgcaa caccgcgccc tggtcgaagg 840

caatgcactg gcaacaaggc tgaaccacac gtgctccaac tgcgtctctc aggcccctca 900

ggtcctgtgt ttcctgcagt catactggac cggatcgtat gttctggcca actttggtgg 960

cagcggtcgt tccggcaagg acgtgaattc gattctgggc agcatccaca cctttgatcc 1020

cgccggaggc tgtgacgact cgaccttcca gccgtgttcg gcccgtgcct tggcaaatca 1080

caaggtggtc accgactcgt tccggagtat ctatgcgatc aactcaggca tcgcagaggg 1140

atctgccgtg gcagtcggcc gctaccctga ggatgtctac cagggcggga acccctggta 1200

cctggccaca gcagcggctg cagagcagct ttacgacgcc atctaccagt ggaagaagat 1260

cggctcgata agtatcacgg acgttagtct gccatttttc caggatatct acccttctgc 1320

cgcggtgggc acctataact ctggctccac gactttcaac gacatcatct cggccgtcca 1380

gacgtatggt gatggatatc tgagtattgt cgtacgtttt gccttagatt ctcaggtgta 1440

aagaaaaaaa tggaactaac tcagttctag gagaaatata ctccctcaga cggctctctt 1500

accgaacaat tctcccgtac agacggcact ccgctttctg cctctgccct gacttggtcg 1560

tacgcttctc tcctaaccgc ttcggcccgc agacagtccg tcgtccctgc ttcctggggc 1620

gaaagctccg caagcagcgt ccctgccgtc tgctctgcca cctctgccac gggcccatac 1680

agcacggcta ccaacaccgt ctggccaagc tctggctctg gcagctcaac aaccaccagt 1740

agcgccccat gcaccactcc tacctctgtg gctgtgacct tcgacgaaat cgtcagcacc 1800

agttacgggg agacaatcta cctggccggc tcgatccccg agctgggcaa ctggtccacg 1860

gccagcgcga tccccctccg cgcggatgct tacaccaaca gcaacccgct ctggtacgtg 1920

accgtcaatc tgccccctgg caccagcttc gagtacaagt tcttcaagaa ccagacggac 1980

gggaccatcg tctgggaaga cgacccgaac cggtcgtaca cggtcccagc gtactgtggg 2040

cagactaccg ccattcttga cgatagttgg cagtga 2076

<210> 8
<211> 618
<212> PRT
<213> Talaromyces emersonii
<400> 8

Met Ala Ser Leu Val Ala Gly Ala Leu Cys Ile Leu Gly Leu Thr Pro
1 5 10 15

Ala Ala Phe Ala Arg Ala Pro Val Ala Ala Arg Ala Thr Gly Ser Leu
20 25 30

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

Asn Asn Ile Gly Pro Asn Gly Ala Asp Val Ala Gly Ala Ser Ala Gly
50 55 60

Ile Val Val Ala Ser Pro Ser Arg Ser Asp Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser
65 70 75 80

Trp Thr Arg Asp Ala Ala Leu Thr Ala Lys Tyr Leu Val Asp Ala Phe
85 90 95

Ile Ala Gly Asn Lys Asp Leu Glu Gln Thr Ile Gln Gln Tyr Ile Ser
100 105 110

Ala Gln Ala Lys Val Gln Thr Ile Ser Asn Pro Ser Gly Asp Leu Ser
115 120 125

Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Asn Val Asn Glu Thr Ala Phe
130 135 140

Thr Gly Pro Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ala
145 150 155 160

Thr Ala Leu Ile Ala Tyr Ala Asn Tyr Leu Ile Asp Asn Gly Glu Ala
165 170 175

Ser Thr Ala Asp Glu Ile Ile Trp Pro Ile Val Gln Asn Asp Leu Ser
180 185 190

Tyr Ile Thr Gln Tyr Trp Asn Ser Ser Thr Phe Asp Leu Trp Glu Glu
195 200 205

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

Val Glu Gly Asn Ala Leu Ala Thr Arg Leu Asn His Thr Cys Ser Asn
225 230 235 240

Cys Val Ser Gln Ala Pro Gln Val Leu Cys Phe Leu Gln Ser Tyr Trp
245 250 255

Thr Gly Ser Tyr Val Leu Ala Asn Phe Gly Gly Ser Gly Arg Ser Gly
260 265 270

Lys Asp Val Asn Ser Ile Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Ala
275 280 285

Gly Gly Cys Asp Asp Ser Thr Phe Gln Pro Cys Ser Ala Arg Ala Leu
290 295 300

Ala Asn His Lys Val Val Thr Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr Ala Ile
305 310 315 320

Asn Ser Gly Ile Ala Glu Gly Ser Ala Val Ala Val Gly Arg Tyr Pro
325 330 335

Glu Asp Val Tyr Gln Gly Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Ala Thr Ala Ala
340 345 350

Ala Ala Glu Gln Leu Tyr Asp Ala Ile Tyr Gln Trp Lys Lys Ile Gly
355 360 365

Ser Ile Ser Ile Thr Asp Val Ser Leu Pro Phe Phe Gln Asp Ile Tyr
370 375 380

Pro Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Asn Ser Gly Ser Thr Thr Phe Asn
385 390 395 400

Asp Ile Ile Ser Ala Val Gln Thr Tyr Gly Asp Gly Tyr Leu Ser Ile
405 410 415

Val Glu Lys Tyr Thr Pro Ser Asp Gly Ser Leu Thr Glu Gln Phe Ser
420 425 430

Arg Thr Asp Gly Thr Pro Leu Ser Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Tyr
435 440 445

Ala Ser Leu Leu Thr Ala Ser Ala Arg Arg Gln Ser Val Val Pro Ala
450 455 460

Ser Trp Gly Glu Ser Ser Ala Ser Ser Val Pro Ala Val Cys Ser Ala
465 470 475 480

Thr Ser Ala Thr Gly Pro Tyr Ser Thr Ala Thr Asn Thr Val Trp Pro
485 490 495

Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Thr Ser Ser Ala Pro Cys Thr
500 505 510

Thr Pro Thr Ser Val Ala Val Thr Phe Asp Glu Ile Val Ser Thr Ser
515 520 525

Tyr Gly Glu Thr Ile Tyr Leu Ala Gly Ser Ile Pro Glu Leu Gly Asn
530 535 540

Trp Ser Thr Ala Ser Ala Ile Pro Leu Arg Ala Asp Ala Tyr Thr Asn
545 550 555 560

Ser Asn Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Asn Leu Pro Pro Gly Thr Ser
565 570 575

Phe Glu Tyr Lys Phe Phe Lys Asn Gln Thr Asp Gly Thr Ile Val Trp
580 585 590

Glu Asp Asp Pro Asn Arg Ser Tyr Thr Val Pro Ala Tyr Cys Gly Gln
595 600 605

Thr Thr Ala Ile Leu Asp Asp Ser Trp Gln
610 615

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado que tiene actividad de glucoamilasa, seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, de forma más preferible al menos 81%, de forma más preferible al menos 82%, de forma más preferible al menos 83%, de forma más preferible al menos 84%, de forma más preferible al menos 85%, de forma más preferible al menos 86%, de forma más preferible al menos 87%, de forma más preferible al menos 88%, de forma más preferible al menos 89%, de forma más preferible al menos 90%, de forma más preferible al menos 91%, de forma más preferible al menos 92%, incluso de forma más preferible al menos 93%, de la forma más preferible al menos 94%, e incluso de la forma más preferible al menos 95%, tal como incluso al menos 95%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con los residuos de aminoácidos 19-573 de SEC ID nº: 2 o SEC ID nº: 4;

(b) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, de forma más preferible al menos 81%, de forma más preferible al menos 82%, de forma más preferible al menos 83%, de forma más preferible al menos 84%, de forma más preferible al menos 85%, de forma más preferible al menos 86%, de forma más preferible al menos 87%, de forma más preferible al menos 88%, de forma más preferible al menos 89%, de forma más preferible al menos 90%, de forma más preferible al menos 91%, de forma más preferible al menos 92%, incluso de forma más preferible al menos 93%, de la forma más preferible al menos 94%, e incluso de la forma más preferible al menos 95%, tal como incluso al menos 95%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con el dominio catalítico mostrado como los aminoácidos 22 a 472 de SEC ID nº: 2 o SEC ID nº: 4;

(c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 80%, de forma más preferible al menos 81%, de forma más preferible al menos 82%, de forma más preferible al menos 83%, de forma más preferible al menos 84%, de forma más preferible al menos 85%, de forma más preferible al menos 86%, de forma más preferible al menos 87%, de forma más preferible al menos 88%, de forma más preferible al menos 89%, de forma más preferible al menos 90%, de forma más preferible al menos 91%, de forma más preferible al menos 92%, incluso de forma más preferible al menos 93%, de la forma más preferible al menos 94%, e incluso de la forma más preferible al menos 95%, tal como incluso al menos 95%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia codificante de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3 que codifica los aminoácidos 19-573 de SEC ID nº: 2 y SEC ID nº: 4.

2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende o consistente en los aminoácidos 19-573 de SEC ID nº: 2 o de SEC ID nº: 4; o uno de sus fragmentos que tiene actividad de glucoamilasa.

3. Polipéptido según la reivindicación 1 o 2, que es codificado por un polinucleótido que comprende o consistente en la secuencia de nucleótidos de SEC ID nº: 1 o de SEC ID nº: 3; o una de sus subsecuencias que codifica un fragmento que tiene actividad de glucoamilasa.

4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que es codificado por el polinucleótido comprendido en el plásmido contenido en DSM 23223.

5. Polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

6. Constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido según la reivindicación 5 operativamente enlazado a una o varias (diferentes) secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.

7. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 6.

8. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 6.

9. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende: (a) cultivo de una célula huésped que comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

10. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende: (a) cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

11. Planta transgénica, parte de planta o célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

12. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para la producción de jarabe y/o un producto de fermentación.

13. Uso según la reivindicación 12, donde la materia prima es material que contiene almidón gelatinizado o no gelatinizado.

14. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para elaboración de cerveza.

15. Composición que incluye una alfa-amilasa y un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

16. Proceso de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que consta de las siguientes etapas:

(a) licuefacción del material que contiene almidón;

(b) sacarificación del material licuado; y

(c) fermentación con un organismo de fermentación;

donde el paso (b) se realiza usando al menos una glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

17. Proceso de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón, que incluye las siguientes etapas:

(a) sacarificación del material que contiene almidón a una temperatura inferior a la temperatura de gelatinización inicial de dicho material que contiene almidón; y

(b) fermentación con un organismo de fermentación,

donde el paso (a) se realiza usando al menos una glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-4.