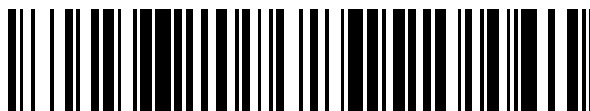


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 060**

51 Int. Cl.:

C07K 14/385 (2006.01)
C12N 9/34 (2006.01)
C12N 15/56 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 1/00 (2006.01)
C12P 19/20 (2006.01)
C12P 7/00 (2006.01)
C12R 1/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.04.2011 E 11768414 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2558484**

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

30 Prioridad:

14.04.2010 WO PCT/CN2010/071753

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2016

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**LI, MING;
DUAN, JUNXIN;
LIU, ZHENG;
FUKUYAMA, SHIRO;
AYABE, KEIICHI;
COWARD-KELLY, GUILLERMO y
DEINHAMMER, RANDALL**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 565 060 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

5 Referencia a un listado de secuencias

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

10 Referencia a un depósito de material biológico

[0002] Esta solicitud contiene una referencia a un depósito de material biológico. Para información completa véase la sección "Depósito de material biológico" de la descripción.

15 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

[0003] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de glucoamilasa y polinucleótidos aislados 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 a usos de glucoamilasas de la invención y a un proceso para producir un producto de licuefacción, sacarificación y/o fermentación utilizando la glucoamilasa de la presente invención. La presente invención también se refiere a una composición que comprende una glucoamilasa de la invención.

25 Descripción de las técnicas relacionadas

[0004] La glucoamilasa (1,4-alfa-D-glucano glucohidrolasa, EC 3.2.1.3) es una enzima, que cataliza la liberación de D-glucosa desde las extremidades no reducidas de almidón o de moléculas oligo o polisacáridas relacionadas. Las glucoamilasas se producen por diferentes hongos filamentosos y levaduras, siendo los de *Aspergillus* comercialmente más importantes.

[0005] Las glucoamilasas (equivalentes a amiloglucosidasa, AMG) se venden en su mayoría como enzimas de sacarificación para varias industrias incluyendo la de la elaboración de cerveza, el almidón y los combustibles. En las industrias del almidón y el combustible, las glucoamilasas se usan comercialmente para convertir material amiláceo, que es ya parcialmente hidrolizado por una alfa-amilasa, en glucosa. La glucosa se puede convertir luego 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-propanodiol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, gluconato, ácido láctico, ácido succínico, ácido 2,5-diketo-D-glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H₂ y CO₂) y compuestos más complejos, incluyendo, por ejemplo, antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B12, 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), de los productos lácteos (por ejemplo, en la producción de yogur y queso) del cuero, de las bebidas y del tabaco.

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

[0007] La purificación y las propiedades de dos formas de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* fueron descritas (Yoshiki YAMASAKI, Agric. Biol. Chem., 41 (5), 755~762, 1977). Ambas glucoamilasas fueron estables hasta 55 °C, pero a una temperatura alrededor de 60 °C, las actividades de la glucoamilasa cayeron bruscamente. Las secuencias de las dos formas de glucoamilasas no fueron descritas en este artículo ni en publicaciones posteriores.

55 Resumen de la invención

[0008] La presente invención se refiere 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 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 91%, más preferiblemente al menos 92%, aún más preferiblemente 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 con el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2;

(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 91%, más preferiblemente al menos 92%, aún más preferiblemente 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 con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1.

[0009] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención.

[0010] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores de expresión recombinantes y células huésped recombinantes que comprenden los polinucleótidos, y a métodos de producción de los polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa.

[0011] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden el polipéptido de la presente invención.

[0012] La presente invención también se refiere al uso de los polipéptidos de la presente invención para procesos de licuefacción, sacarificación y/o fermentación, preferiblemente en la conversión de almidón; al uso de los polipéptidos de la presente invención para la producción de jarabe, bebida y/o un producto de fermentación; y al uso de los polipéptidos de la presente invención para la elaboración de cerveza.

[0013] La presente invención también se refiere a un proceso para producir un producto de licuefacción, sacarificación y/o fermentación a partir de material que contiene almidón que comprende el paso de: tratamiento del material que contiene almidón con los polipéptidos de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

[0014] La figura 1 muestra la electrofóresis de SDS-PAGE de la muestra de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* purificada de la presente invención. Vía 1: marcador (97, 66, 45, 30, 20,1 y 14,4 kDa); vía 2: el sobrenadante de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* de la presente invención antes de la purificación; vía 3: glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* de la presente invención.

[0015] La secuencia de polinucleótidos y la secuencia de aminoácidos deducida de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* de la presente invención se muestran en la SEC ID n.º: 1 y 2, respectivamente.

Descripción de la invención

[0016] Es un objeto de la presente invención proporcionar polipéptidos que tengan actividad de glucoamilasa y polinucleótidos que codifiquen los polipéptidos, preferiblemente, para proporcionar polipéptidos que tengan actividad de glucoamilasa y polinucleótidos que codifiquen los polipéptidos con alta termoestabilidad.

Definiciones

[0017] Actividad de glucoamilasa: el término "actividad de glucoamilasa (1,4-alfa-D-glucano glucohidrolasa, EC 3.2.1.3)" se define aquí como una actividad enzimática, que cataliza la liberación de D-glucosa a partir de las extremidades no reducidas de almidón o de moléculas de oligo y polisacárido relacionadas. La actividad de glucoamilasa se puede medir en unidades AGU. Véase la sección "actividad de glucoamilasa" más adelante en la sección "materiales y métodos".

[0018] Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos 20%, preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, aún más preferiblemente 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 n.º: 2.

[0019] Polipéptido aislado: los términos "aislado" y "purificado" se refieren a un polipéptido o polinucleótido que es retirado de al menos un componente con el cual está naturalmente asociado. Por ejemplo, un polipéptido puede ser al menos 1% puro, por ejemplo, al menos 5% puro, al menos 10% puro, al menos 20% puro, al menos 40% puro, al menos 60% puro, al menos 80% puro, y al menos 90% puro, como determinado por SDS-PAGE y un polinucleótido puede ser al menos 1% puro, por ejemplo, al menos 5% puro, al menos 10% puro, al menos 20% puro, al menos 40% puro, al menos 60% puro, al menos 80% puro, al menos 90% puro y al menos 95% puro, como se determina por electrofóresis de agarosa.

[0020] Polipéptido maduro: el término "polipéptido maduro" se define aquí como un polipéptido en su forma final tras la traducción y cualquier modificación postraducciona, tal como tratamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 616 de SEC ID n.º: 2

basado en el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, Protein Engineering 10: 1-6) que predice que los aminoácidos 1 a 21 de SEC ID n.º: 2 son un péptido señal.

[0021] 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. En un aspecto, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1848 de SEC ID n.º: 1 basada en el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, *supra*) que predice que los nucleótidos 1 a 63 de SEC ID n.º: 1 codifican un péptido señal.

[0022] Identidad de secuencia: la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro “secuencia de identidad”.

[0023] Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, Trends in Genetics 16: 276-277), preferiblemente versión 3.0.0 o superior. Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado “identidad más larga” (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

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

[0024] Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*) como 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 espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión de EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle etiquetado “identidad más larga” (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

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

[0025] Un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa (uniprot:P69328) de *Aspergillus niger* (Svensson, B. Larsen, K. Gunnarsson, A.; “Characterization of a glucoamylase G2 from *Aspergillus niger*.”; Eur. J. Biochem. 154:497-502 (1986)) es 48,1% idéntico a la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* de SEC ID n.º: 2 de la presente invención.

[0026] Un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa (UNIPROT:Q03045) de *Hormoconis resinae* (Joutsjoki, V.V. Torkkeli, T.K.; “Glucoamylase P gene of *Hormoconis resinae*: molecular cloning, sequencing and introduction into *Trichoderma reesei*.”; FEMS Microbiol. Lett. 78:237-243 (1992)) es 51,68% (sin espacios) idéntico a la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* de SEC ID n.º: 2 de la presente invención.

[0027] Secuencia homóloga: el término “secuencia homóloga” se define aquí como una proteína predicha que tiene un valor E (o puntuación de expectativa) inferior a 0,001 en una búsqueda tfasty (Pearson, W.R., 1999, in Bioinformatics Methods and Protocols, S. Misener and S. A. Krawetz, ed., pp. 185-219) con la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* [E. coli DSM 23123] de SEC ID n.º: 2 o el polipéptido maduro de la misma.

[0028] Fragmento de polipéptido: el término “fragmento de polipéptido” se define aquí como un polipéptido que tiene uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos eliminados del amino y/o carboxilo terminal del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2; o una secuencia homóloga de la misma; donde el fragmento tiene actividad de glucoamilasa. En un aspecto, un fragmento contiene al menos 473 residuos de aminoácidos, por ejemplo, aminoácidos 28 a 500 de SEC ID n.º: 2 (dominio GH15_1 de la presente invención), más preferiblemente al menos 575 residuos de aminoácidos, por ejemplo, aminoácidos 28 a 500 (dominio GH15_1 de la presente invención) y aminoácidos 514 a 615 de SEC ID n.º: 2 (dominio CBM20_x de la presente invención), o una secuencia homóloga de la misma.

[0029] Subsecuencia: el término “subsecuencia” se define aquí como una secuencia de nucleótidos que tiene uno o más (por ejemplo, varios) nucleótidos eliminados del extremo 5' y/o 3' de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1; o una secuencia homóloga de la misma; donde la subsecuencia codifica un fragmento de polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa. En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos 1.419 nucleótidos, por ejemplo, los nucleótidos que codifican el dominio GH15_1 (nucleótidos 82-1500) de la presente invención; más preferiblemente al menos 1725 nucleótidos por ejemplo, los nucleótidos que codifican el dominio GH15_1 y CBM20_x (nucleótidos 1540-1845) de la presente invención, de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 o una secuencia homóloga de la misma.

[0030] Variante alélica: el término “variante alélica” denota aquí cualquiera de dos o más (por ejemplo, varias) formas alternativas de un gen que ocupa lo mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la

mutación, y puede dar como resultado polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones de genes pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0031] Polinucleótido aislado: el término "polinucleótido aislado", como se usa aquí, se refiere a un polinucleótido que es aislado de una fuente. En un aspecto preferido, el polinucleótido es al menos 1% puro, preferiblemente al menos 5% puro, más preferiblemente al menos 10% puro, más preferiblemente al menos 20% puro, más preferiblemente al menos 40% puro, más preferiblemente al menos 60% puro, aún más preferiblemente al menos 80% puro, y de la forma más preferible al menos 90% puro, como se determina por electroforesis de agarosa.

[0032] Polinucleótido sustancialmente puro: el término "polinucleótido sustancialmente puro", como se usa aquí, se refiere a una preparación polinucleótida libre de otros nucleótidos extraños o no deseados y en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteína genéticamente creados. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como mucho 10%, preferiblemente como mucho 8%, más preferiblemente como mucho 6%, más preferiblemente como mucho 5%, más preferiblemente como mucho 4%, más preferiblemente como mucho 3%, aún más preferiblemente como mucho 2%, de la forma más preferible como mucho 1%, e incluso de la forma más preferible como mucho 0,5% en peso de otro material polinucleótido con el cual está asociado de forma original o recombinante. Un polinucleótido sustancialmente puro puede, sin embargo, incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural, tales como promotores y terminadores. Se prefiere que el polinucleótido sustancialmente puro sea al menos 90% puro, preferiblemente al menos 92% puro, más preferiblemente al menos 94% puro, más preferiblemente al menos 95% puro, más preferiblemente al menos 96% puro, más preferiblemente al menos 97% puro, aún más preferiblemente al menos 98% puro, de la forma más preferible al menos 99% puro, e incluso de la forma más preferible al menos 99,5 % puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura, es decir, que la preparación polinucleótida está esencialmente libre de otro material polinucleótido con el cual está asociada de forma original o recombinante. Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, de ADNc, de ARN, semisintético, sintético o cualquier combinación de los mismos.

[0033] Secuencia codificante: cuando se usa aquí el término "secuencia codificante", se refiere a una secuencia de nucleótidos que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico. Los límites de la secuencia codificante están generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que empieza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG y finaliza 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.

[0034] 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. El ADNc carece de secuencias de intrones que puedan estar presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito de ARN primario inicial es un precursor para ARNm que se procesa a través de una serie de pasos antes de aparecer como ARNm empalmado maduro. Estos pasos incluyen la eliminación de secuencias de intrones mediante un proceso llamado empalme. El ADNc derivado de ARNm carece, por lo tanto, de cualquier secuencia de intrones.

[0035] Constructo de ácidos nucleicos: el término "constructo de ácidos nucleicos", como se utiliza en este caso, se refiere a una molécula de ácidos nucleicos, bien uni- o bicatenaria aislada de un gen de origen natural, que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de manera que no existirían de otro modo en la naturaleza. El constructo de ácidos nucleicos puede ser también sintético. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control necesarias para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0036] Secuencias de control: el término "secuencias de control" se define aquí para incluir todos los componentes necesarios para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o foránea de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o nativa o foránea entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcionales 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.

[0037] 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 codificante de una secuencia polinucleótida de manera que la secuencia de control dirija la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

[0038] Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de un polipéptido incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0039] 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.

5 [0040] 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.

10 [0041] Modificación: el término “modificación” se refiere aquí a cualquier modificación química del polipéptido que comprenda o consista en el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2; o una secuencia homóloga de la misma; así como manipulación genética del ADN que codifica tal polipéptido. La modificación puede ser una sustitución, una eliminación y/o una inserción de uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos, al igual que reemplazos de una o más (por ejemplo, varias) cadenas laterales de aminoácidos.

15 [0042] Variante Artificial: cuando se usa aquí, el término “variante artificial” se refiere a un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa producida por un organismo que expresa una secuencia de polinucleótidos modificada de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1; o una secuencia homóloga de la misma. La secuencia de nucleótidos modificada se obtiene a través de la intervención humana por modificación de la secuencia de polinucleótidos descrita en SEC ID n.º: 1; o una secuencia homóloga de la misma.

20 Polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa

[0043] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que comprenden secuencias de aminoácidos que tienen un grado de identidad de secuencia con el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2 de al menos 85%, aún más preferiblemente al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, e incluso de la forma más preferible al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o al menos 100%, que tienen actividad de glucoamilasa (de ahora en adelante “polipéptidos homólogos”). En un aspecto preferido, los polipéptidos homólogos comprenden secuencias de aminoácidos que difieren por diez aminoácidos, preferiblemente por nueve aminoácidos, preferiblemente por ocho aminoácidos, preferiblemente por aminoácidos siete, preferiblemente por seis aminoácidos, preferiblemente por cinco aminoácidos, más preferiblemente por cuatro aminoácidos, aún más preferiblemente por tres aminoácidos, de la forma más preferible por dos aminoácidos, e incluso de la forma más preferible por un aminoácido del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.

35 [0044] Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2. En otro aspecto preferido, el polipéptido comprende el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2. En otro aspecto preferido, un polipéptido de la presente invención comprende los aminoácidos 22 a 616 de SEC ID n.º: 2. En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2. En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2. En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en los aminoácidos 22 a 616 de SEC ID n.º: 2. En un aspecto preferido, el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 616 de SEC ID n.º: 2.

45 [0045] En un aspecto, la presente divulgación se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de glucoamilasa que están codificados por polinucleótidos que hibridan bajo condiciones de astringencia preferiblemente muy bajas, más preferiblemente condiciones de astringencia bajas, más preferiblemente condiciones de astringencia medias, más preferiblemente condiciones de astringencia medio altas, aún más preferiblemente condiciones de astringencia altas, y de la forma más preferible condiciones de astringencia altísimas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, (ii) la secuencia de ADN genómico que comprende la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, o (iii) una cadena complementaria en toda su longitud de (i) o (ii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York).

50 [0046] La secuencia de nucleótidos de SEC ID n.º: 1; o una subsecuencia de la misma; al igual que la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2; o un fragmento de la misma; se pueden usar para diseñar sondas de ácidos nucleicos para identificar y clonar polipéptidos de codificación de ADN 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 toda secuencia, pero deberían tener al menos 14, preferiblemente al menos 25, más preferiblemente al menos 35 y de la forma más preferible al menos 70 nucleótidos de longitud. Sin embargo, se prefiere que la sonda de ácidos nucleicos tenga al menos 100 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la sonda de ácidos nucleicos puede tener al menos 200 nucleótidos, preferiblemente al menos 300 nucleótidos, más preferiblemente al menos 400 nucleótidos, o de la forma más preferible al menos 500 nucleótidos de longitud. Sondas más largas incluso se pueden utilizar, por ejemplo, sondas de ácidos nucleicos que tengan preferiblemente al menos 600 nucleótidos, más preferiblemente al menos 800 nucleótidos, aún más preferiblemente al menos 1000 nucleótidos, aún más preferiblemente al menos 1.500 nucleótidos, o de la forma más preferible al menos 1.800 nucleótidos de longitud. Se pueden usar sondas tanto de ADN como de ARN. Las sondas están típicamente marcadas para la detección del gen

correspondiente (por ejemplo, con ^{32}P , ^3H , ^{35}S , biotina o avidina). Tales sondas están abarcadas por la presente invención.

[0047] Una genoteca de ADN genómico o ADNc obtenido a partir de tales otras cepas se puede, por lo tanto, seleccionar para ADN que hibridice con las sondas anteriormente descritas y codifique un polipéptido que tenga actividad de glucoamilasa. ADN genómico u otro ADN a partir de tales otras cepas se puede separar por electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, u otras técnicas de separación. ADN de las bibliotecas o el ADN separado se puede transferir e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Para identificar un clon o ADN que sea homólogo de la SEC ID n.º: 1, o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa preferiblemente en una transferencia de Southern.

[0048] Para fines de la presente divulgación, hibridación indica que la secuencia de nucleótidos hibridiza a una sonda de ácidos nucleicos marcada correspondiente a la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1; la secuencia de ADN genómico comprende la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1; su cadena complementaria en toda su longitud; o una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de astringencia de muy bajas a altísimas. Moléculas a las que la sonda de ácidos nucleicos hibridiza bajo estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, película radiográfica.

[0049] En un aspecto preferido, la sonda de ácidos nucleicos es la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1. En otro aspecto preferido, la sonda de ácidos nucleicos es los nucleótidos 64 a 1.848 de SEC ID n.º: 1. En otro aspecto preferido, la sonda de ácidos nucleicos es una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido de SEC ID n.º: 2, o una subsecuencia de la misma. En otro aspecto preferido, la sonda de ácidos nucleicos es la SEC ID n.º: 1. En otro aspecto preferido, la sonda de ácidos nucleicos es la secuencia de polinucleótidos contenida en AMG 1 plásmido que está contenida en el *E. coli* DSM 23123, donde la secuencia de polinucleótidos de la misma codifica un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa. En otro aspecto preferido, la sonda de ácidos nucleicos es la región de codificación del polipéptido maduro contenida en AMG 1 plásmido que está contenida en el *E. coli* DSM 23123. En otro aspecto preferido, la sonda de ácidos nucleicos es los nucleótidos 82 a 1.500, los nucleótidos 1.504 a 1.845, de SEC ID n.º: 1.

[0050] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, se definen condiciones de astringencia de muy bajas a altísimas como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 µg/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y bien 25% de formamida para astringencias de muy bajas y bajas, 35% de formamida para astringencias de medias y medio altas, o 50% de formamida para astringencias altas y altísimas, siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas óptimamente.

[0051] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador se lava finalmente tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2% SDS preferiblemente a 45°C (astringencia muy baja), más preferiblemente a 50°C (astringencia baja), más preferiblemente a 55°C (astringencia media), más preferiblemente a 60°C (astringencia medio alta), aún más preferiblemente a 65°C (astringencia alta) y de la forma más preferible a 70°C (astringencia muy alta).

[0052] Para sondas cortas de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia se definen como prehibridación, hibridación y post-hibridación de lavado de aproximadamente 5°C a aproximadamente 10°C por debajo de la T_m calculada utilizando el cálculo según Bolton y McCarthy (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390) en 0,9 M NaCl, 0,09 M Tris-HCl pH 7,6, 6 mM EDTA, 0,5% NP-40, 1X solución de Denhardt, 1 mM pirofosfato de sodio, 1 mM fosfato monobásico de sodio, 0,1 mM ATP y 0,2 mg de ARN de levadura por ml siguiendo procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas óptimamente.

[0053] Para sondas cortas de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, el material portador se lava una vez en 6X SSC más 0,1% SDS durante 15 minutos y dos veces cada uno durante 15 minutos utilizando 6X SSC de 5°C a 10°C por debajo de la T_m calculada.

[0054] En otro 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 de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 de al menos 85%, aún más preferiblemente al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, e incluso de la forma más preferible al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%, que codifica un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa. Véase la sección "polinucleótidos" en la presente.

[0055] La presente divulgación se refiere a variantes artificiales que comprenden una sustitución, eliminación, y/o inserción de uno o más (por ejemplo, varios) aminoácidos del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2, o una secuencia homóloga de la misma. Preferiblemente, los cambios en los aminoácidos son de naturaleza menor, esto es sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegado y/o a la actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino o carboxilo 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 cambiando la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0056] Ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro del 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 and R.L. Hill, 1979, In, *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Los intercambios que se producen más frecuentemente 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.

[0057] Además de los 20 aminoácidos estándar, aminoácidos no estándar (tales como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido de 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 se pueden sustituir por residuos de aminoácidos. Los "aminoácidos no naturales" se han modificado después de la síntesis de proteína y/o tienen una estructura química en su cadena(s) lateral(es) diferentes de los aminoácidos de estándar. Los 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.

[0058] Alternativamente, los cambios en los aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físico químicas de los polipéptidos se ven alteradas. Por ejemplo, cambios en los aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo y similares.

[0059] Los aminoácidos esenciales del polipéptido original se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En la última técnica, mutaciones de alanina únicas se introducen en cada residuo de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad biológica (es decir, 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 se puede determinar también por análisis físico de estructura, como se determina por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica, o marcaje por fotoafinidad, junto con 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 del análisis de identidades con polipéptidos que estén relacionados con un polipéptido según la invención.

[0060] Sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples, delecciones y/o inserciones se pueden hacer y analizar usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o redistribución, seguidos de un procedimiento de selección pertinente, tal como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 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. n° 5.223.409; WO 92/06204), y mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire *et al.*, 1986, *Gene* 46: 145; Ner *et al.*, 1988, *DNA* 7: 127).

[0061] 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 utilizando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.

[0062] Las sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2 pueden ser como mucho 10, preferiblemente como mucho 9, más preferiblemente como mucho 8, más preferiblemente como mucho 7, más preferiblemente como mucho 6, más preferiblemente como mucho 5, más preferiblemente como mucho 4, aún más preferiblemente como mucho 3, de la forma más preferible como mucho 2, e incluso de la forma más preferible como mucho 1.

[0063] Polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos divisibles de fusión donde otro polipéptido se fusiona en el N-término o el C-término del polipéptido o fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado se produce por fusión de una secuencia de nucleótidos (o una parte de la misma) codifican 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 ligamiento de las secuencias de codificación que codifican los polipéptidos de modo que éstas estén en el marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo control del mismo promotor(es) y terminador.

- [0064] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión. En la secreción de la proteína de fusión, el sitio se divide liberando el polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa a partir de la proteína de fusión. Ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, un sitio Kex2 que codifica el dipéptido Lys-Arg (Martin *et al.*, 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina *et al.*, 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward *et al.*, 1995, Biotechnology 13: 498-503; y 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-Ly, que es dividido por una enteroquinasa después de la lisina (Collins-Racie *et al.*, 1995, Biotechnology 13: 982-987); un sitio His-Tyr-Glu o sitio His-Tyr-Asp, que es dividido por Genenasa I (Carter *et al.*, 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248); un sitio Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser, que es dividido por 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 proteasa TEV después del Gln (Stevens, 2003, *supra*); y un sitio Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro, que es dividido por una forma genéticamente modificada de proteasa de rinovirus humano 3C después del Gln (Stevens, 2003, *supra*).
- [0065] En un aspecto preferido, un polipéptido de la presente invención es codificado por un polinucleótido que comprende o consiste en la secuencia de nucleótidos de SEC ID n.º: 1.
- [0066] En un aspecto preferido, un polipéptido de la presente invención es codificado por un polinucleótido que comprende o consiste en la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1.
- [0067] En un aspecto preferido, un polipéptido de la presente invención es codificado por el polinucleótido contenido en el plásmido de AMG 1 que está contenido en el *E. coli* DSM 23123.
- [0068] En un aspecto preferido, la secuencia codificante del polipéptido maduro es de los nucleótidos 64 a 1848 de SEC ID n.º: 1.
- Polinucleótidos
- [0069] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa de la presente invención.
- [0070] En un aspecto preferido, una secuencia de nucleótidos de la presente invención comprende o consiste en SEC ID n.º: 1. En otro aspecto más preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia de polinucleótidos contenida en el plásmido AMG 1 que está contenido en el *E. coli* DSM 23123. En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1. En otro aspecto preferido, la secuencia codificante del polipéptido maduro es los nucleótidos 64 a 1848 de SEC ID n.º: 1. En otro aspecto más preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia codificante del polipéptido maduro contenida en el plásmido AMG 1 que está contenido en el *E. coli* DSM 23123. La presente invención también abarca secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2 o el polipéptido maduro de la misma, que difiere de SEC ID n.º: 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 n.º: 1 que codifican fragmentos de SEC ID n.º: 2 que tienen actividad de glucoamilasa.
- [0071] La presente invención también se refiere a polinucleótidos mutantes que comprenden o consisten en al menos una mutación de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, donde la secuencia de nucleótidos mutante codifica el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.
- [0072] Al menos una mutación puede ser una o más (por ejemplo, una o varias) mutaciones. Preferiblemente, al menos una mutación es como mucho 10, preferiblemente como mucho 9, más preferiblemente como mucho 8, más preferiblemente como mucho 7, más preferiblemente como mucho 6, más preferiblemente como mucho 5, más preferiblemente como mucho 4, aún más preferiblemente como mucho 3, de la forma más preferible como mucho 2 e incluso de la forma más preferible como mucho 1 mutación. Preferiblemente la mutación es la sustitución, eliminación y/o inserción de nucleótidos.
- [0073] 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 de las mismas. La clonación de los polinucleótidos de la presente invención a partir de tal ADN genómico se puede efectuar, por ejemplo, usando la bien conocida reacción en cadena de polimerasa (PCR) o selección de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados 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 la ligasa (LCR), transcripción activada de ligamiento (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 otro organismo u organismo relacionado y así, por ejemplo, puede ser una variante alélica o de especies de la región codificante del polipéptido de la secuencia de nucleótidos. La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que tienen un grado de

identidad de secuencia con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 de al menos 85%, aún más preferiblemente al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, e incluso de la forma más preferible al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%, que codifica un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa.

5 [0074] 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 del polipéptido que se producen de forma no natural. Estos polipéptidos pueden diferir en alguna forma diseñada del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes artificiales que difieren en la actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo, o similares. La secuencia variante se puede construir basándose en la
10 secuencia de nucleótidos presentada como la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, por ejemplo, una subsecuencia de la misma, y/o por introducción de sustituciones de nucleótidos que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos, pero que corresponden 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.

[0075] Será evidente para los expertos en la técnica que tales sustituciones se pueden hacer fuera de las regiones críticas de la función de la molécula y seguir dando como resultado un polipéptido activo. Residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificados por un polinucleótido aislado de la invención, y por lo tanto preferiblemente no sometidos a sustitución, se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (véase, por ejemplo, Cunningham and Wells, 1989, *supra*). En la última técnica, se introducen mutaciones en cada residuo positivamente cargado de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de glucoamilasa para identificar residuos de aminoácidos que sean críticos para la actividad de la molécula. Sitios de interacción enzima-sustrato también se pueden determinar por análisis de la estructura tridimensional 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*).

[0076] En un aspecto, la presente divulgación se refiere a polinucleótidos aislados que codifican polipéptidos de la presente invención, que hibridan preferiblemente bajo condiciones de astringencia muy bajas, más preferiblemente condiciones de astringencia bajas, más preferiblemente condiciones de astringencia medias, más preferiblemente condiciones de astringencia medio altas, aún más preferiblemente condiciones de astringencia altas, y de la forma más preferible condiciones de astringencia altísimas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, (ii) la secuencia de ADN genómico que comprende la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, o (iii) una cadena complementaria en toda su longitud de (i) o (ii); o variantes alélicas y subsecuencias de la misma (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*), tal y como se define aquí.

[0077] En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a polinucleótidos aislados obtenidos por (a) hibridación de una población de ADN preferiblemente bajo condiciones de astringencia muy bajas, más preferiblemente condiciones de astringencia bajas, más preferiblemente condiciones de astringencia medias, más preferiblemente condiciones de astringencia medio altas, aún más preferiblemente condiciones de astringencia altas, y de la forma más preferible condiciones de astringencia altísimas con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, (ii) la secuencia de ADN genómico que comprende la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, o (iii) una cadena complementaria en toda su longitud de (i) o (ii); y (b) aislando el polinucleótido de hibridación, que codifica un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa.

Constructos de ácidos nucleicos

[0078] 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 más (por ejemplo, varias) secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0079] Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la presente invención se puede manipular en una variedad de formas para proporcionar la expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias de polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante se conocen bien en la técnica.

[0080] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, una secuencia de nucleótidos que sea reconocida por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifique 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 mutante, truncados e híbridos, y se puede obtener a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares ya sean homólogos o heterólogos de la célula huésped.

- [0081] 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*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger* o *Aspergillus awamori* (*gluA*), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, al igual que un promotor NA2-tpi (un promotor modificado que incluye un gen que codifica una alfa-amilasa neutra en *Aspergilli* donde el líder no traducido se ha sustituido por un líder no traducido de un gen que codifica triosa fosfato isomerasa en *Aspergilli*; ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados que incluyen el gen que codifica la alfa-amilasa neutra en *Aspergillus niger* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido del gen que codifica triosa fosfato isomerasa en *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.
- [0082] En un huésped de levadura, se obtienen promotores útiles a partir de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa 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.
- [0083] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia terminadora está operativamente enlazada al 3' terminal de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.
- [0084] Terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.
- [0085] Terminadores preferidos para células huésped de levadura son obtenidos a partir 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*.
- [0086] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, cuando se transcribe es una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está operativamente enlazada al 5' término 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.
- [0087] Líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.
- [0088] Líderes adecuados para células huésped de levadura son obtenidos 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).
- [0089] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al 3' término 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.
- [0090] Secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidas 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*.
- [0091] Secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.
- [0092] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante del péptido señal que codifique un péptido señal enlazado al 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 intrínsecamente contener una secuencia codificante del péptido señal naturalmente enlazada en el marco de lectura de la traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido segregado. Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal que se 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 sencillamente cambiar la secuencia codificante del péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido. Sin embargo, 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.

[0093] Secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias codificantes 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*.

[0094] Péptidos señal útiles para células huésped de levadura son obtenidos a partir de los genes para alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otras secuencias codificantes del péptido señal útiles son descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0095] En un aspecto preferido, el péptido señal comprende o consiste en los aminoácidos 1 a 21 de SEC ID n.º: 2. En otro aspecto preferido, la secuencia codificante del péptido señal comprende o consiste en los nucleótidos 1 a 63 de SEC ID n.º: 1.

[0096] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante del propéptido que codifica un propéptido posicionado en el amino terminal de un polipéptido. El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos). Un propéptido es generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo maduro por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido a partir del propolipéptido. La secuencia codificante del propéptido se puede obtener a partir de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (*aprE*), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (*nprT*), alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

[0097] Donde tanto el péptido señal como las secuencias de propéptido están presentes en el amino terminal de un polipéptido, la secuencia de propéptido está situada junto al amino terminal de un polipéptido y la secuencia del péptido señal está situada junto al amino terminal de la secuencia del propéptido.

[0098] 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 activar o desactivar 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* y *trp*. En la levadura, el sistema ADH2 o sistema GAL1 se puede utilizar. En hongos filamentosos, el promotor de TAKA alfa-amilasa, promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* se pueden utilizar como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la 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

[0099] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, preferiblemente que comprenden además un promotor y señales de parada transcripcionales y traduccionales. Los diferentes ácidos nucleicos y secuencias de control descritos aquí se pueden juntar para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más (por ejemplo, varios) sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o 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 comprenda 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 a las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0100] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que se puede someter de forma conveniente a procedimientos de ADN recombinante y pueden provocar la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector debe ser introducida. Los vectores puede ser plásmidos lineales o circulares cerrados.

- [0101] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que exista como un ente extracromosómico, 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 que asegure la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduzca en la célula huésped, se integre en el genoma y replique con el cromosoma(s) en el que se ha integrado. Además, 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, se puede utilizar.
- [0102] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o más (por ejemplo, varios) marcadores seleccionables que permiten la selección fácil de células transformadas, transfectadas, transducidas o similares. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia a auxótrofos y similares.
- [0103] Marcadores adecuados para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3. Marcadores seleccionables para su uso en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoyltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), *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*.
- [0104] 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 independiente del genoma.
- [0105] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede contar con la secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido o cualquier otro elemento del vector para la integración en el genoma por recombinación homóloga o no homóloga. Alternativamente, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una ubicación(es) precisa(s) en el cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían preferiblemente contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10.000 pares de bases, preferiblemente de 400 a 10.000 pares de bases, y de la forma más preferible de 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencia con la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga de la secuencia objetivo 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.
- [0106] Para replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita al vector replicar autónomamente en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador plásmido que medie la 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 que un plásmido o vector replique *in vivo*.
- [0107] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de los plásmidos pBR322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en el *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAMβ1 que permiten la replicación en el *Bacillus*.
- [0108] Ejemplos de orígenes de replicación para su uso en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.
- [0109] 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 comprenden el gen se pueden realizar según los métodos descritos en la WO 00/24883.
- [0110] Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención se puede insertar 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 tanto copias adicionales del polinucleótido, se puede seleccionar por cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.
- [0111] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos 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

- [0112] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden el constructo de ácidos nucleicos de la presente invención. Un constructo o vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el constructo o vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosomal autorreplicante como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula original que no sea idéntica a la célula original debido a mutaciones que se produzcan durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen que codifica el polipéptido y su fuente.
- [0113] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, un procarionta o un eucariota.
- [0114] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria Gram positiva o una bacteria Gram negativa. Bacterias Gram positivas incluyen, pero no están limitadas a, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Geobacillus* y *Oceanobacillus*. Bacterias Gram negativas incluyen, pero no están limitadas a, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Neisseria* y *Ureaplasma*.
- [0115] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* se puede efectuar, por ejemplo, por transformación de protoplasto (véase, por ejemplo, Chang and Cohen, 1979, Molecular General Genetics 168: 111-115), usando células competentes (véase, por ejemplo, Young and Spizizen, 1961, Journal of Bacteriology 81: 823-829, o Dubnau and Davidoff-Abelson, 1971, Journal of Molecular Biology 56: 209-221), por electroporación (véase, por ejemplo, Shigekawa and Dower, 1988, Biotechniques 6: 742-751) o por conjugación (véase, por ejemplo, Koehler and Thorne, 1987, Journal of Bacteriology 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* se puede efectuar, por ejemplo, por transformación de protoplasto (véase, por ejemplo, Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (véase, por ejemplo, Dower *et al.*, 1988, Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145). La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* se puede efectuar, por ejemplo, por transformación de protoplasto y electroporación (véase, por ejemplo, Gong *et al.*, 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), por conjugación (véase, por ejemplo, Mazodier *et al.*, 1989, J. Bacteriol. 171: 3583-3585) o por transducción (véase, por ejemplo, Burke *et al.*, 2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 6289-6294). La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* se puede efectuar, por ejemplo, por electroporación (véase, por ejemplo, Choi *et al.*, 2006, J. Microbiol. Methods 64: 391-397) o por conjugación (véase, por ejemplo, Pinedo and Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57). La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* se puede efectuar, por ejemplo, por competencia natural (véase, por ejemplo, Perry and Kuramitsu, 1981, Infect. Immun. 32: 1295-1297), por transformación de protoplasto (véase, por ejemplo, Catt and Jollick, 1991, Microbios. 68: 189-207), por electroporación (véase, por ejemplo, Buckley *et al.*, 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804) o por conjugación (véase, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436). Sin embargo, cualquier método conocido en la técnica para introducción de ADN en una célula huésped puede ser usado.
- [0116] La célula huésped también puede ser un eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta o fúngica.
- [0117] En un aspecto preferido, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongo", como se utiliza en este caso, incluye los filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota* (como se define por Hawksworth *et al.*, In, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) al igual que los *Oomycota* (como se cita en Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*).
- [0118] 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*). Ya que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe ser definida 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).
- [0119] En un aspecto aún más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.
- [0120] En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Saccharomyces carlsbergensis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Saccharomyces cerevisiae*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Saccharomyces diastaticus*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Saccharomyces douglasii*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Saccharomyces kluyveri*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Saccharomyces norbensis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *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*.
- [0121] 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

Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico. En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es por injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0122] En un aspecto aún 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*, *Tolypocadium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

[0123] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium 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 aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

[0124] En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Aspergillus niger*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Chrysosporium lucknowense*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium venenatum*. En otro un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Myceliophthora thermophila*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Trichoderma reesei*.

[0125] Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplasto, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de forma conocida de por sí. Procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* son descritos en la EP 238 023 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 and Guarente, In Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito *et al.*, 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

Métodos de producción

[0126] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) cultivo de una célula, que en su forma de tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido. En un aspecto preferido, la célula es del género *Penicillium*. En un aspecto más preferido, la célula es *Penicillium oxalicum*. En un aspecto más preferido, la célula es *Penicillium oxalicum* que comprende el gen de glucoamilasa en el plásmido AMG 1 que está contenido en el *E. coli* DSM 23123.

[0127] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) cultivo de una célula huésped que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

[0128] La presente divulgación 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 de polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, donde la secuencia de nucleótidos mutante codifica un polipéptido que comprende o consiste en el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2; y (b) recuperación del polipéptido.

[0129] 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 o gran escala (incluyendo, fermentaciones de continuo lote, lote alimentado o de estado sólido) en laboratorio o en 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 carbono y sales inorgánicas, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Hay disponibles medios adecuados de proveedores comerciales o se pueden preparar según 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 lisatos celulares.

[0130] Los polipéptidos se pueden detectar utilizando métodos conocidos en la técnica que sean específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, un ensayo enzimático se puede utilizar para determinar la actividad del polipéptido como se describe en este caso.

[0131] El polipéptido resultante se puede recuperar utilizando métodos conocido en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo por procedimientos convencionales incluyendo, pero no limitado a, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0132] 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, intercambio iónico, afinidad, hidrofóbico cromatoenfoco y exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoco 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.

[0133] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden: (a) cultivo de una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones conductivas para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

Plantas

[0134] La presente divulgación también se refiere a plantas, por ejemplo, una planta transgénica, parte de planta o célula vegetal, transformada con un polinucleótido 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 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.

[0135] La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicotiledónea) o monocotiledónea (una monocotiledónea). Ejemplos de plantas monocotiledóneas son hierbas, tales como poa de prados (poa pratense, Poa), hierba forrajera tal como Festuca, Lolium, césped templado, tal como Agrostis, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz.

[0136] Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, leguminosas, tales como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y semilla de soja, y plantas crucíferas (de la familia Brassicaceae), tales como coliflor, semilla de colza, y el organismo modelo cercanamente relacionado *Arabidopsis thaliana*.

[0137] Ejemplos de partes de planta son varilla, callo, hojas, raíz, frutas, semillas y tubérculos, al igual que los tejidos individuales que comprenden estas partes, por ejemplo, epidermis, mesófilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemas. Compartimentos de célula vegetal específicos, tales como cloroplastos, apoplastos, mitocondria, vacuolas, peroxisomas y citoplasma son también considerados una parte de planta. Además, cualquier célula vegetal, independientemente del origen del tejido, se considera una parte de planta. Asimismo, partes de planta tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la invención son también consideradas partes de planta, por ejemplo, embriones, endospermas aleurona y revestimientos de semillas.

[0138] También están incluidos en la presente divulgación la progenie de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

[0139] La planta transgénica o la célula vegetal 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 más (por ejemplo, varios) constructos de expresión que codifican un polipéptido de la presente invención en el genoma de húspe de la planta o genoma de cloroplasto y que propagan la planta modificada o célula vegetal resultante en una planta transgénica o célula vegetal.

[0140] 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 secuencias reguladoras apropiadas necesarias para la expresión de la secuencia de nucleótidos en la planta o parte de planta de elección. Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable útil para identificar células huésped en las que el constructo de expresión se ha integrado y secuencias de ADN necesarias para introducir el constructo en la planta en cuestión (el último depende del método de introducción de ADN que se vaya a usar).

[0141] 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 el polipéptido se desea que sea expresado. Por ejemplo, la expresión del gen que codifica de un polipéptido de la presente invención puede ser constitutiva o inducible, o puede ser desarrollable, específica de fase o tejido, y el producto génico puede estar dirigido a un tejido específico o parte de planta tale como semillas u hojas. Las secuencias reguladoras son descritas, por ejemplo, por Tague *et al.*, 1988, Plant Physiology 86: 506.

[0142] Para expresión constitutiva, el 35S-CaMV, la ubiquitina-1 de maíz y el promotor de actina 1 de arroz se pueden 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 órgano-específicos pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos de pozos de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata y frutas (Edwards and Coruzzi, 1990, Ann. Rev. Genet. 24: 275-303) o de tejidos de pozos metabólicos tales como meristemas (Ito *et al.*, 1994, Plant Mol. Biol. 24: 863-878), un promotor específico de semilla tal como la glutelina, prolamina, globulina o promotor de albúmina del 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 corporal de aceite de semilla (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 (Kyojuka *et al.*, 1993, Plant Physiology 102: 991-1000), el promotor del gen de metiltransferasa de adenina del virus 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 la 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 de planta tales como etileno, ácido abscísico y ácido giberélico, y metales pesados.

[0143] 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 intensificador del promotor puede ser un intrón que se coloque 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.

[0144] El gen del marcador seleccionable y cualquier otra parte del constructo de expresión se pueden elegir de aquellos disponible en la técnica.

[0145] El constructo de ácidos nucleicos se incorpora en el genoma de la 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).

[0146] Actualmente, la transferencia de gen mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método de elección para generar dicotiledóneas transgénicas (para una revisión, véase Hooykas and Schilperoort, 1992, Plant Molecular Biology 19: 15-38) y también se puede usar para transformar monocotiledóneas de transformación, aunque otros métodos de transformación se usan frecuentemente para estas plantas. Actualmente, el método de elección para generar monocotiledóneas transgénicas es el bombardeo de partículas (partículas de oro o tungsteno microscópica recubiertas con el ADN de transformación) a partir 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 se describe por Omirulleh *et al.*, 1993, Plant Molecular Biology 21: 415-428. Métodos de transformación adicionales para su uso conforme a la presente divulgación incluyen los descritos en la patente de EE.UU. n.º: 6.395.966 y 7.151.204 (ambas se incorporan aquí por referencia en su integridad).

[0147] 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 tras las generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de ADN-T separados o escisión específica de sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

[0148] La presente divulgación también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención que comprenden: (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.

[0149] Además de la transformación directa de un genotipo de planta particular con un constructo preparado según la presente invención, plantas transgénicas se pueden hacer por cruce de una planta que tiene un constructo de la presente invención con una segunda planta que carece del constructo. Por ejemplo, un constructo que codifica un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa o una parte de la misma se puede introducir en una variedad de plantas particulares por cruce, sin necesidad de transformar directamente una planta de esta variedad dada. Por lo tanto, la presente invención no solo abarca una planta directamente regenerada a partir de células que han sido transformadas conforme a la presente invención, pero también la progenie de tales plantas. Como se utiliza en este caso, la progenie puede referirse a la descendencia de cualquier generación de una planta original preparada conforme a la presente invención. Tal progenie puede incluir un constructo de ADN preparado conforme a la presente invención, o una parte de un constructo de ADN preparado conforme a la presente invención. Los resultados de cruce de la presente invención se introducen en una línea de planta por cruce de polinización de una línea de inicio con una línea de planta donante que incluye un transgén de la presente invención. Ejemplos no limitativos de tales pasos son además articulados en la patente de EE.UU. n°: 7.151.204.

[0150] Está previsto que las plantas que incluyan un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa de la presente invención incluyan plantas generadas a través de un proceso de conversión de retrocruce. Por ejemplo, plantas de la presente invención incluyen plantas denominadas genotipo convertido de retrocruce, línea, innato o híbrido.

[0151] Se pueden utilizar marcadores genéticos para ayudar en la introgresión de uno o más transgenes de la invención de un contexto genético a otro. La selección asistida por marcadores ofrece ventajas con respecto al cultivo convencional en que se puede usar para evitar errores provocados por variaciones fenotípicas. Además, marcadores genéticos pueden proporcionar datos con respecto al grado relativo de germoplasma de élite en la progenie individual de un cruce particular. Por ejemplo, cuando una planta con una característica deseada que de otro modo tiene un contexto genético deseable no agronómicamente se cruza con un original de élite, se pueden usar marcadores genéticos para seleccionar progenie que no solo posea la característica de interés, sino que también tenga una proporción relativamente grande del germoplasma deseado. De esta manera, el número de generaciones requeridas para introgresar uno o más rasgos en un contexto genético particular se minimiza.

Composiciones

[0152] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención y preferiblemente un portador y/o un excipiente. Preferiblemente, las composiciones están enriquecidas en 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. Preferiblemente, las composiciones se formulan para proporcionar características deseables tales como bajo color, olor bajo y estabilidad de almacenamiento aceptable.

[0153] La composición puede comprender un polipéptido de la presente invención como principal componente enzimático, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender actividades enzimáticas múltiples, tales como una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxiribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasas. La(s) enzima(s) adicional(es) se puede(n) 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*.

[0154] Las composiciones de polipéptido se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden ser en forma de líquido o una composición seca. Por ejemplo, la composición de polipéptido puede ser en forma de granulado o un microgranulado. El polipéptido que se va a incluir en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

[0155] A continuación se aportan ejemplos de usos preferidos del polipéptido o 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

[0156] Según este aspecto de la invención, una glucoamilasa de la invención se puede combinar con una alfa-amilasa. Preferiblemente, la proporción de alfa-amilasa ácida a glucoamilasa es entre 0,05 y 5,0 AFAU/AGU. Más preferiblemente, la proporción entre actividad de alfa-amilasa ácida y actividad de glucoamilasa es al menos 0,10, al menos 0,15, al menos 0,20, al menos 0,25, al menos 0,30, al menos 0,35, al menos 0,40, al menos 0,45, al menos 0,50, al menos 0,55, al menos 0,60, al menos 0,65, al menos 0,70, al menos 0,75, al menos 0,80, al menos 0,85, al menos 0,90, al menos 0,95, al menos 1,00, al menos 1,05, al menos 1,10, al menos 1,20, al menos 1,30, al menos 1,40, al menos 1,50, al menos 1,60, al menos 1,70, al menos 1,80, al menos 1,85, o incluso al menos 1,90 AFAU/AGU. Sin embargo, la proporción entre actividad de alfa-amilasa ácida y actividad de glucoamilasa debería preferiblemente ser menos de 4,50, menos de 4,00, menos de 3,50, menos de 3,00, menos de 2,50, o incluso menos de 2,25 AFAU/AGU.

[0157] La composición anterior es adecuada para su uso en el proceso de licuefacción, sacarificación y/o fermentación, preferiblemente en la conversión de almidón, especialmente para producir jarabe y productos de fermentación, tales como etanol.

[0158] A continuación se aportan ejemplos de usos preferidos de las composiciones de polipéptido de la presente 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

[0159] La presente invención se dirige también al uso de un polipéptido de la presente invención en un proceso de licuefacción, sacarificación y/o fermentación. El polipéptido se puede utilizar en un proceso único, por ejemplo, en un proceso de licuefacción, un proceso de sacarificación o un proceso de fermentación. El polipéptido también se puede usar en una combinación de procesos, por ejemplo en un proceso de licuefacción y sacarificación, en un proceso de licuefacción y fermentación, o en un proceso de sacarificación y fermentación, preferiblemente con respecto a la conversión de almidón.

[0160] En un aspecto preferido de la presente invención, el proceso de licuefacción, sacarificación y/o fermentación incluye procesos de licuefacción y sacarificación realizados consecutiva o simultáneamente.

[0161] En el proceso de licuefacción enzimática convencional, alfa-amilasa termoestable se añade y el almidón de cadena larga se degrada en unidades más cortas ramificada y lineales (maltodextrinas), pero no se añade glucoamilasa. La glucoamilasa de la presente invención es altamente termoestable, por lo que es ventajoso añadir la glucoamilasa en el proceso de licuefacción. La glucoamilasa de la presente invención tiene un efecto sinérgico cuando se combina con una alfa-amilasa en el proceso de licuefacción. Durante la sacarificación convencional, las dextrinas generadas durante el proceso de licuefacción son además hidrolizadas para producir azúcares DP1-3 de bajo peso molecular que pueden ser metabolizados por el organismo fermentador. La hidrólisis se realiza típicamente usando glucoamilasas; alternativamente además de las glucoamilasas, se pueden usar alfa-glucosidasas y/o alfa-amilasas ácidas.

[0162] Cuando se aplica la glucoamilasa de la presente invención, potencialmente en combinación con una alfa-amilasa en un proceso de licuefacción y/o sacarificación, especialmente en un proceso de licuefacción y sacarificación simultánea, el proceso se puede realizar a una temperatura más alta. Al realizar procesos de licuefacción y/o de sacarificación a temperaturas más altas, el proceso se puede llevar a cabo en un periodo más corto de tiempo o alternativamente el proceso puede llevarse a cabo usando dosis enzimáticas menores. Además, el riesgo de contaminación microbiana se reduce cuando se realiza el proceso de licuefacción y/o de sacarificación a temperatura más alta.

Conversión de material que contiene almidón

[0163] La presente invención proporciona un uso de la glucoamilasa de la invención para producir glucosas y similares a partir de almidón. Generalmente, el método incluye los pasos de hidrolizar parcialmente almidón precursor utilizando glucoamilasa de la presente invención bien solo o en presencia de una alfa-amilasa.

[0164] La glucoamilasa de la invención también se puede usar en combinación con una enzima que hidrolice solo enlaces alpha-(1,6)-glucosídicos en moléculas que comprendan al menos cuatro residuos de glucosil. Preferiblemente, la glucoamilasa de la invención se usa en combinación con pululanasa o isoamilasa. El uso de isoamilasa y pululanasa para la desramificación de almidón, las propiedades moleculares de las enzimas y el uso potencial de las enzimas junto con glucoamilasa se describe en G.M.A. van Beynum *et al.*, Starch Conversion Technology, Marcel Dekker, New York, 1985, 101-142.

[0165] En otro aspecto, la invención se refiere al uso de una glucoamilasa de la invención en la conversión de almidón. Además, la glucoamilasa de la invención se puede utilizar en un proceso de conversión de almidón continuo que incluye un proceso de sacarificación continua.

Producción de jarabe, bebida y/o producto de fermentación

[0166] Usos de la glucoamilasa de la invención incluyen conversión de almidón en por ejemplo, bebida de jarabe, y/o un producto de fermentación, incluyendo etanol.

[0167] 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 dan como ejemplo en la sección "Materiales que contienen almidón". Generalmente, el proceso comprende los pasos de hidrolizar parcial o totalmente material que contiene almidón (licuefacción y/o sacarificación) en presencia de la glucoamilasa de la presente invención solo o en combinación con alfa-amilasa para liberar glucosa de las extremidades no reductoras del almidón o de moléculas oligo y polisacáridas relacionadas.

[0168] La glucoamilasa de la invención también se puede usar en forma inmovilizada. Es adecuada y se usa frecuentemente para producir jarabes de especialidad, tales como jarabes de maltosa al igual que en el flujo de refinado de oligosacáridos en relación con la producción de jarabes de fructosa, por ejemplo, jarabe rico en fructosa (HFS).

[0169] La glucoamilasa de la presente invención también puede usarse para producir varias bebidas, tales como, pero no limitado a, bebida de tomate, patata, patata china, batata, y/o calabaza.

Productos de fermentación

[0170] El término "producto de fermentación" se refiere a un producto producido por un proceso que incluye un proceso de fermentación que utiliza un organismo fermentador. Productos de fermentación contemplados según la invención incluyen alcoholes (por ejemplo, arabinitol, butanol, etanol, glicerol, metanol, etilenglicol, 1,3-propanodiol [propilenglicol], butanodiol, glicerina, sorbitol y xilitol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido acetónico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 2,5-diketo-D-gluconico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucárico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutárico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido oxaloacético, ácido propiónico, ácido succínico y ácido xilónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina y treonina); un alcano (por ejemplo, pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano, undecano y dodecano); un cicloalcano (por ejemplo, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano y ciclooctano); un alqueno (por ejemplo, penteno, hexeno, hepteno y octeno); gases (por ejemplo, metano, hidrógeno (H₂), dióxido de carbono (CO₂) y monóxido de carbono (CO)); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B12, beta-caroteno); y hormonas. En un aspecto preferido, el producto de fermentación es etanol, por ejemplo, etanol combustible; etanol potable, es decir, bebidas espirituosas neutras potables; o etanol industrial o productos usados en la industria de 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 rubia, cerveza amarga, licores de malta, cerveza happoushu, cerveza con alto contenido en alcohol, cerveza con bajo contenido en alcohol, cerveza baja en calorías o cerveza ligera. Procesos de fermentación preferidos usados incluyen procesos de fermentación alcohólicos, que son bien conocidos en la técnica. Los procesos de fermentación preferidos son procesos de fermentación anaeróbicos, que son bien conocidos en la técnica.

Elaboración de cerveza

[0171] Las glucoamilasas de la presente invención son altamente termoestables y por lo tanto se pueden usar en una industria que requiera hidrólisis de almidón a alta temperatura. Por ejemplo, las glucoamilasas de la invención se pueden usar en una industria cervecera. Las glucoamilasas de la invención se añade en cantidades eficaces que pueden ser fácilmente determinadas por la persona experta en la técnica.

Producción de un producto de licuefacción, sacarificación y/o fermentación

[0172] En este aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de licuefacción, sacarificación y/o fermentación a partir de material que contiene almidón, que comprende el paso de: tratar el material que contiene almidón con un polipéptido de la presente invención.

[0173] Materias primas que contienen almidón adecuadas se enumeran en la sección "Materiales que contienen almidón" que aparece más adelante. Enzimas contempladas se enumeran en la sección "Enzimas" que aparece más adelante. Preferiblemente, el proceso de la presente invención comprende el tratamiento de material que contiene almidón con un polipéptido de la presente invención solo o junto con una alfa-amilasa. Preferiblemente, la etapa de tratamiento de material que contiene almidón con un polipéptido de la presente invención (solo o en presencia de alfa-amilasa) se realiza a temperaturas entre 40°C y 100°C, preferiblemente entre 65°C y 90°C, más preferiblemente entre 80°C y 85°C y/o a un pH entre 2,0 y 7,0, preferiblemente entre pH 4,0 y pH 6,0, más preferiblemente entre pH 4,5 y pH 5,5.

[0174] El producto de licuefacción y/o de sacarificación de la presente invención es dextrina, o azúcares de bajo peso molecular, por ejemplo DP1-3. En el proceso de licuefacción, la conversión de almidón en glucosa, dextrina y/o

azúcares de bajo peso molecular se mejora por la adición de una glucoamilasa de la presente invención. El producto de fermentación, tal como etanol, se puede recuperar opcionalmente después de la fermentación, por ejemplo, por destilación. La fermentación se realiza preferiblemente en presencia de levadura, preferiblemente una cepa de *Saccharomyces*. Organismos de fermentación adecuados se enumeran en la sección "Organismos de fermentación" que aparece más adelante.

[0175] El proceso más ampliamente usado en la producción del producto de fermentación, especialmente etanol, es el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF), donde organismo(s) de fermentación, tales como levadura(s) y enzima(s) de sacarificación se pueden adicionar juntos. La SSF se puede realizar 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 ajustar hacia arriba o hacia abajo durante la fermentación. La glucoamilasa de la presente invención, cuando se usa en el proceso de licuefacción, puede agradablemente mejorar la producción de etanol. La glicoamilasa de la presente invención podría acelerar el índice de fermentación cuando se añade junto con alfa-amilasa, y títulos de etanol final podrían ser también aumentados.

[0176] La sacarificación convencional se puede realizar utilizando condiciones bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, un proceso de sacarificación completa puede durar hasta aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas, sin embargo, es común hacer solo una pre-sacarificación de típicamente 40-90 minutos a una temperatura entre 30-65°C, típicamente aproximadamente 60°C, seguido de sacarificación completa durante la fermentación en una sacarificación y fermentación simultánea (SSF). La sacarificación se realiza típicamente a temperaturas de 30-65°C, típicamente alrededor de 60°C. La glucoamilasa de la presente invención es altamente termoestable, así la pre-sacarificación y/o la sacarificación de la presente invención se puede realizar a una temperatura más alta que la pre-sacarificación y/o sacarificación convencionales. En una forma de realización, un proceso de la invención incluye material que contiene almidón de pre-sacarificación antes del proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF). La pre-sacarificación puede llevarse a cabo a una alta temperatura (por ejemplo, 50- 85°C, preferiblemente 60-75°C) antes pasarla a la SSF. El material que contiene almidón se puede preparar reduciendo el tamaño de partícula, preferiblemente por molienda en húmedo, de 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente de 0,1-0,5 mm. Después de ser sometido 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%, preferiblemente al menos 99%, e incluso más preferiblemente 100% de los sólidos secos del material que contiene almidón se convierten en un hidrolizado de almidón soluble.

[0177] En una forma de realización, un proceso de la invención incluye material que contiene almidón de sacarificación, por ejemplo DE11 (equivalente a dextrosa 11) maltodextrina, en presencia de una glucoamilasa de la invención para producir azúcares que se puedan fermentar en el producto de fermentación deseado por un organismo fermentador adecuado.

[0178] El proceso de fermentación se puede llevar a cabo durante un periodo de 1 a 250 horas, preferiblemente de 25 a 190 horas, más preferiblemente de 30 a 180 horas, más preferiblemente de 40 a 170 horas, aún más preferiblemente de 50 a 160 horas, aún más preferiblemente de 50 a 130 horas.

[0179] Un lodo de material que contiene almidón, tal como almidón granulado, que tiene 10-55 % en peso de sólidos secos (DS), preferiblemente 25-40 % en peso de sólidos secos, más preferiblemente 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, tales como vinaza (agua de proceso), agua de fregado, condensado o destilado de evaporador, agua de separador lateral de destilación, u otra agua de proceso de planta de producto de fermentación.

[0180] Después de ser sometido 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%, preferiblemente al menos 99%, e incluso más preferiblemente 100% de los sólidos secos del material que contiene almidón se convierten en un hidrolizado de almidón soluble.

Materiales que contienen almidón

[0181] Cualquier materia prima que contenga almidón adecuada, incluyendo almidón granulado, se puede utilizar según la presente invención. La materia prima se selecciona generalmente según el producto de fermentación deseado. Ejemplos de materias primas que contienen almidón, adecuados para su uso en un proceso de la presente invención, incluyen tubérculos, raíces, varillas, granos enteros, granos, mazorcas, trigo, cebada, centeno, sorgo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, guisantes de arroz, alubias o batatas, o mezclas derivadas, o cereales, materias primas que contienen azúcar, tales como melaza, materiales de fruta, azúcar de caña o remolacha azucarera, patatas, y materiales que contienen celulosa, tales como madera o residuos de planta, o mezclas derivadas. Se contemplan ambos tipos de maíz y cebada, cerosos y no cerosos.

Organismos de fermentación

[0182] "Organismo de fermentación" se refiere a cualquier organismo, incluyendo organismos bacterianos y fúngicos, adecuados para su uso en un proceso de fermentación y capaces de producir un producto de fermentación deseado. Organismos de fermentación especialmente adecuados son capaces de 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, tales como levadura. La levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces* spp., en particular, *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras disponibles comercialmente incluyen, por ejemplo, rojo de etanol Red Star™/Lesaffre (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

[0183] La glucoamilasa es preferiblemente una glucoamilasa de la invención. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, una glucoamilasa de la invención también se puede combinar con otras glucoamilasas.

[0184] La glucoamilasa puede adicionarse en una cantidad de 0,001 a 10 AGU/g DS, preferiblemente de 0,01 a 5 AGU/g DS, tal como aproximadamente de 0,05, 0,1, 0,3, 0,5, 1 o 2 AGU/g DS, especialmente 0,05 a 0,5 AGU/g DS; o 0,02-20 AGU/g DS, preferiblemente 0,1-10 AGU/g DS.

Alfa-amilasa

[0185] La alfa-amilasa puede, según la invención, ser de cualquier origen. Se prefieren las alfa-amilasas de origen fúngico o bacteriano.

[0186] En un aspecto preferido, 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 (E.C. 3.2.1.1) que añadida en una cantidad eficaz tiene actividad óptima a un pH en el rango de 3 a 7, preferiblemente de 3,5 a 6, o más preferiblemente de 4-5.

Alfa-amilasas bacterianas

[0187] Según la invención, una alfa-amilasa bacteriana puede preferiblemente derivar del género *Bacillus*.

[0188] En un aspecto preferido la alfa-amilasa de *Bacillus* se deriva de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* o *B. stearothermophilus*, pero también se puede derivar de otra especie de *Bacillus*. Ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (BLA) mostrada en SEC ID n.º: 4 en la WO 99/19467, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (BAN) mostrada en SEC ID n.º: 5 en la WO 99/19467, y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (BSG) mostrada en SEC ID n.º: 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 preferiblemente al menos 80%, aún más preferiblemente 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.

[0189] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrido, especialmente uno descrito en cualquiera de la WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059 y WO 02/10355 (todos los documentos son incorporados por la presente por referencia). Variantes de alfa-amilasa específicamente contempladas se describen en la patente de EE.UU. n.º: 6.093.562, 6.297.038 o la patente de EE.UU. n.º 6.187.576 (incorporada por la presente por referencia) e incluyen variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (alfa-amilasa BSG) que tienen una delección de un o dos aminoácidos en la posición 179 a 182, preferiblemente una delección doble descrita en la WO 1996/023873 - véase, por ejemplo, página 20, líneas 1-10 (incorporada por la presente por referencia), preferiblemente que corresponde a delta(181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en SEC ID n.º: 3 descrita en la WO 99/19467 o delección de los aminoácidos 179 y 180 usando SEC ID n.º: 3 en la WO 99/19467 para numeración (cuya referencia se incorpora por la presente por referencia). Aún más preferidas son las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, que tiene una delección doble que corresponde a delta(181-182) y además comprende una sustitución N193F (también denominada I181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en SEC ID n.º: 3 descrita en la WO 99/19467.

[0190] La alfa-amilasa también puede ser una alfa-amilasa maltogénica. Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa, E.C. 3.2.1.133) es capaz de hidrolizar amilosa y amilopectina en maltosa en la configuración alfa. Una alfa-amilasa maltogénica de la cepa de *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está comercialmente disponible de Novozymes A/S, Dinamarca. La alfa-amilasa maltogénica se describe en la patente de EE.UU. n.º: 4.598.048, 4.604.355 y 6.162.628, que se incorporan por la presente por referencia.

Alfa-amilasas híbridas bacterianas

[0191] Una alfa-amilasa híbrida específicamente contemplada comprende 445 residuos de aminoácidos C-terminales de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada como SEC ID n.º: 4 en la WO 99/19467) y los 37 residuos de aminoácidos N-terminales de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada como SEC ID n.º: 3 en la WO 99/194676), con una o más, especialmente todas, de las siguientes sustituciones:

[0192] G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+1201F+A209V+Q264S (utilizando la numeración de *Bacillus licheniformis*). También se prefieren las variantes que tienen una o más de las siguientes mutaciones (o mutaciones correspondientes en otras estructuras de alfa-amilasa de *Bacillus*): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o delección de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferiblemente delección de E178 y G179 (utilizando la numeración de SEC ID n.º: 5 de la WO 99/19467).

Alfa-amilasas fúngicas

[0193] Alfa-amilasas ácidas fúngicas incluyen alfa-amilasas ácidas derivadas de una cepa del género *Aspergillus*, tal como alfa-amilasas de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus kawachii*.

[0194] Una alfa-amilasa ácida fúngica 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 más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85% más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, más del 99% o incluso 100% de identidad con la parte madura de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n.º: 10 en la WO 96/23874.

[0195] Otra alfa-amilasa ácida preferida se deriva de una cepa de *Aspergillus niger*. En un aspecto preferido, la alfa-amilasa ácida fúngica es la derivada de *A. niger* descrita como "AMYA_ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TrEMBL 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 n.º: 1 en la WO 2004/080923 (Novozymes) que se incorpora por 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 n.º: 1 en la WO 2004/080923 se contemplan.

[0196] En un aspecto preferido, la alfa-amilasa se deriva de *Aspergillus kawachii* y es descrita por Kaneko *et al.* J. Ferment. Bioeng. 81:292-298(1996) "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.

[0197] La alfa-amilasa ácida fúngica también puede ser una enzima de tipo salvaje que comprenda un módulo de unión a carbohidratos (CBM) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir, un no híbrido), o una variante del mismo. En una forma de realización, la alfa-amilasa ácida de tipo salvaje se deriva de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

[0198] Unas alfa-amilasas ácidas se pueden añadir según la invención en una cantidad de 0,01 a 10 AFAU/g DS, preferiblemente de 0,01 a 5 AFAU/g DS, especialmente de 0,02 a 2 AFAU/g DS.

Alfa-amilasas híbridas fúngicas

[0199] En un aspecto preferido, la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida. Ejemplos preferidos de alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen los descritos en la WO 2005/003311 o en la publicación de patente de EE.UU. n.º 2005/0054071 (Novozymes) o la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2006/0148054 (Novozymes) que se incorporan por la presente por referencia. Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico de alfa-amilasa (CD) y un dominio/módulo de enlace a carbohidratos (CBM) y opcionalmente un enlazador.

[0200] Ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen, pero no están limitados a, los descritos en la solicitud de patente de EE.UU. n.º 2006/0148054 incluyendo la variante de Fungamyl con dominio catalítico JA118 y SBD de *Athelia rolfsii* (SEC ID n.º: 100 en la solicitud de EE.UU. n.º 2006/0148054), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador AMG y SBD de *Athelia rolfsii* (SEC ID n.º: 101 en la solicitud de EE.UU. n.º 2006/0148054) y alfa-amilasa de *Meripilus giganteus* con enlazador de glucoamilasa y SBD de *Athelia rolfsii* (SEC ID n.º: 102 en la solicitud de EE.UU. n.º 2006/0148054); y alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa y CBM de *Aspergillus niger* (SEC ID n.º 2 en la publicación internacional n.º WO2007/144424).

[0201] Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen, pero no están limitados a, los descritos en la publicación de patente de EE.UU. n.º 2005/0054071, incluyendo aquellos descritos en la tabla 3 en 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 comercial

[0202] 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-LO™, SPEZYME™ FRED, SPEZYME™ AA, SPEZYME™ Ethyl, y SPEZYME™ DELTA AA (Genencor Int.).

Materiales y métodos

Actividad de glucoamilasa

[0203] La actividad de la glucoamilasa se puede medir en unidades AGU.

Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0204] La unidad 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 100 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 6 minutos como se establece en la incubación de glucoamilasa más adelante), generando de este modo glucosa.

Incubación de glucoamilasa:	
Sustrato:	maltosa 100 mM
Tampón:	acetato 0,1 M
PH:	4,30 ± 0,05
Temperatura de incubación:	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	6 minutos
Rango de trabajo de enzima:	0,5-4,0 AGU/mL

[0205] El principio de análisis es descrito por 3 etapas de reacción:

La etapa 1 es una reacción enzimática:

Glucoamilasa (AMG), EC 3.2.1.3 (exo-alfa-1,4-glucano-glucohidrolasa), hidroliza maltosa para formar alfa-D-glucosa. Tras la incubación, la reacción se detiene con NaOH.

Etapas 2 y 3 suponen una reacción de punto final:

La glucosa se fosforila por ATP, en una reacción catalizada por hexoquinasa. El glucosa-6-fosfato formado se oxida en 6-fosfogluconato por glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. En esta misma reacción, una cantidad equimolar de NAD⁺ se reduce a NADH con un aumento resultante en la absorbancia a 340 nm. Un sistema autoanalizador tal como el analizador Konelab 30 (Thermo Fisher Scientific) se puede utilizar.

Reacción de color	
Tris	aprox. 35 mM
ATP	0,7 mM
NAD ⁺	0,7 mM
Mg ²⁺	1,8 mM
Hexoquinasa	> 850 U/L
Glucosa-6-P-DH	> 850 U/L
PH	aprox. 7,8
Temperatura	37,0 °C ± 1,0 °C
Tiempo de reacción	420 seg
Longitud de onda	340 nm

Actividad de alfa-amilasa ácida

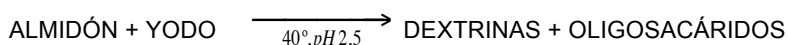
[0206] Cuando se usa según la presente invención, la actividad de cualquier alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa ácida fúngica). Alternativamente, la actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en KNUs (unidades de kilo Novozymes (Termamyl SC)).

Actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)

[0207] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa ácida fúngica). 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 mencionadas más adelante.

[0208] 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.

ALFA-AMILASA



$\lambda = 590 \text{ NM}$

azul/violeta $t = 32 \text{ seg.}$ sin color

Condiciones estándar/condiciones de reacción:

Sustrato:	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:	590nm
Concentración enzimática:	0,025 AFAU/mL
Gama de trabajo de enzima:	0,01-0,04 AFAU/m

[0209] Una carpeta EB-SM-0259,02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible bajo pedido de Novozymes A/S, Dinamarca, esta carpeta se incluye por la presente por referencia.

[0210] La presente invención es descrita además por los siguientes ejemplos que no deberían ser interpretados como limitación del ámbito de la invención.

Medios

[0211] Placas de PDA estaban compuestas por litro de 39 gramos de agar de dextrosa de patata (Difco, BD213400).

[0212] Medio NNCYP-PCS estaba compuesto por litro de 5,0 g de NaNO₃, 3,0 g de NH₄Cl, 2,0 g de MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico, fórmula molecular: C₆H₁₃O₄NS H₂O), 2,5 g de ácido cítrico, 0,2 g de CaCl₂ 2H₂O, 1,0 g de bacto-peptona, 5,0 g de extracto de levadura, 0,2 g de MgSO₄ 7H₂O, 4,0 g de K₂HPO₄, 1,0 ml de oligoelementos de COVE, 2,5 g de glucosa y 25,0 g de PCS (rastros de maíz pretratados obtenidos del National Renewable Energy Laboratory (NREL)). Oligoelementos de COVE estaba compuesto por litro de 0,04 g de Na₂B₄O₇·10H₂O, 0,4 g de CuSO₄·5H₂O, 1,2 g de FeSO₄·7H₂O, 0,7 g de MnSO₄·H₂O, 0,8 g de Na₂MoO₄·2H₂O, 10 g de ZnSO₄·7H₂O.

[0213] Medio MLC estaba compuesto por 40g/L glucosa, 50g/L polvo de semilla de soja, 4 g/L ácido cítrico, pH 5,0.

[0214] Medio M410 estaba compuesto por 50g/L maltosa·H₂O, 8g/L extracto de levadura, 2g/L MgSO₄·7H₂O, 4g/L ácido cítrico·H₂O, 50g/L glucosa, 2g/L K₂HPO₄, 0,5ml/L solución de metales traza AMG y 2g/L urea, pH4,5. La solución de metales traza AMG estaba compuesta por 13,9g/L FeSO₄·7H₂O, 13,5g/L MnSO₄·H₂O, 6,8g/L ZnCl₂, 2,5g/L CuSO₄·5H₂O, 0,24g/L NiCl₂·6H₂O y 3g/L ácido cítrico.

[0215] A menos que se especifique lo contrario, los medios se preparan según Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY. Los productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos calidad reactiva.

Enzimas

Glucoamilasas:

[0216] Glicoamilasa de *Penicillium oxalicum* como se describe en SEC ID n.º: 2 de la presente invención

[0217] Glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* (que se describe en la publicación internacional WO 99/28448 como SEC ID n.º: 7)

[0218] Glucoamilasa de *Aspergillus niger* (uniprot:P69328) (que se describe en Svensson, B. Larsen, K. Gunnarsson, A.; "Characterization of a glucoamylase G2 from *Aspergillus niger*."; Eur. J. Biochem. 154:497-502 (1986))

Alfa-amilasas:

[0219] Alfa-amilasa ácida descrita como variante JA001 en la publicación internacional WO 2005/003311

[0220] Alfa-amilasa producida a partir de *Bacillus licheniformis*, p. ej. Termamyl™ SC (alfa-amilasa disponible comercialmente de Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca)

Ejemplos

Ejemplo 1: preparación de micelios de cepa de *Penicillium oxalicum* para extracción de ARN total

[0221] La cepa de *Penicillium oxalicum* (que fue recogida en agosto de 2008 de tierra de Yunnan province, China) fue inoculada sobre una placa de PDA e incubada durante 4 días a 25°C en la oscuridad. Diferentes tapones de micelios-PDA fueron inoculados en frascos de agitación de 500 ml que contenían 100 ml de medio NNCYP-PCS. Los matraces fueron incubados durante 7 días a 25°C con agitación a 160 r.p.m. Los micelios fueron recogidos el día 4 y el día 7 respectivamente. Luego los micelios de cada día se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron en un congelador a -80°C hasta su uso.

Ejemplo 2: preparación de ARN de cepa de *Penicillium oxalicum*

[0222] Los micelios congelados fueron transferidos a un mortero previamente enfriado de nitrógeno líquido y se majaron y molieron hasta un polvo fino. El ARN total fue obtenido a partir de los micelios en polvo por extracción con reactivo Fenzol (Active motif, número de catálogo 22100). El ARN enriquecido en poliA fue aislado por equipo total mTRAP (Active Motif, número de catálogo. 23012).

Ejemplo 3: construcción de una genoteca de ADNc de la cepa de *Penicillium oxalicum*

[0223] ADNc bicatenario de cada día fue sintetizado con equipo de constructo de genoteca de ADNc SMART (TAKARA, número de catálogo 634901). El ADNc fue dividido con Sfi I (New England Biolabs, número de catálogo R0123S) según las instrucciones del fabricante y el ADNc se fraccionó por tamaño por 0,8% de electroforesis en gel de agarosa utilizando en 44 mM de Tris base, 44 mM de ácido bórico, 0,5 mM de tampón EDTA (TBE). Las fracciones de ADNc de 500 pares de bases y mayores fueron escindidas del gel y purificadas utilizando un ADN de PCR GFX® y equipo de purificación de banda de gel según las instrucciones del fabricante (GE, número de catálogo 28-9031-71). Luego, cantidades iguales de ADNc del día 4 y el día 7 fueron agrupadas para construcción de biblioteca.

[0224] El ADNc preparado fue clonado luego direccionalmente por ligamiento en pMHs7 escindido Sfi I (descrito en la publicación internacional WO 2009/037253) usando ligasa T4 (New England Biolabs, número de catálogo M0202T) según las instrucciones del fabricante. La mezcla de ligamiento fue sometida a electroporación en las células ElectroMax DH10B de *E. coli* (Invitrogen, número de catálogo 18290-015) utilizando un GENE PULSER® y controlador de pulso (Bio-Rad) a 25 uF, 25 mAmp, 1,8 kV con un 1 mm cubeta de espacio según el procedimiento del fabricante.

[0225] Las células sometidas a electroporación fueron colocadas en placas de LB suplementadas con 50mg/L de canamicina. Un grupo de plásmido de ADNc fue obtenido a partir de 50.000 transformantes totales del ligamiento de vector pMHs7 original. El ADN plásmido se preparó directamente a partir del grupo de colonias utilizando el equipo de plásmido QIAGEN (QIAGEN, número de catálogo 12143).

Ejemplo 4: construcción de un transposón SigA4 que contiene el gen indicador de β -lactamasa

[0226] Un transposón que contenía plásmido designado pSigA4 fue construido a partir del transposón pSigA2 que contenía plásmido descrito en la publicación internacional WO 01/77315 para crear una versión mejorada del transposón atrapador de señal de pSigA2 con disminución de fondo de selección. El transposón pSigA2 contiene un constructo de beta-lactamasa sin señal codificado en el transposón en sí. PCR se usó para crear una delección del gen de beta-lactamasa intacto encontrado en la estructura plásmida usando una corrección de pruebas Pfu Turbo polymerase ProofStart (QIAGEN GmbH Corporation, Hilden, Alemania) y los siguientes cebadores fosforilados 5' (TAG Copenhagen, Dinamarca):

SigA2NotU-P: 5'-TCGCGATCCGTTTTTCGCATTTATCGTGAAACGCT-3' (SEC ID n.º: 3)

SigA2NotD-P: 5'-CCGCAAACGCTGGTGAAAGTAAAGATGCTGAA-3' (SEC ID n.º: 4)

5 [0227] La reacción de amplificación estaba compuesta por 1 µl de pSigA2 (10 ng / µl), 5 µl de 10X tampón ProofStart (QIAGEN GmbH Corporation, Hilden, Alemania), 2,5 µl de mezcla dNTP (20 mM), 0,5 µl de SigA2NotU-P (10 mM), 0,5 µl de SigA2NotD-P (10 mM), 10 µl de Q solución (QIAGEN GmbH Corporation, Hilden, Alemania) y 31,25 µl de agua desionizada. Un ciclador térmico DNA ENGINE™ (MJ Research Inc., Waltham, MA, EE.UU.) se usó para amplificación programada para un ciclo a 95°C durante 5 minutos; y 20 ciclos cada uno a 94°C durante 30 segundos, 62°C durante 30 segundos y 72°C durante 4 minutos.

10 [0228] Un producto de reacción por PCR de 3,9 kb fue aislado en un 0,8% de gel de agarosa utilizando 40 mM Tris base-20 mM de sodio acetato-1 mM tampón de disodio EDTA (TAE) y 0,1 µg de bromuro de etidio por ml. La banda de ADN fue visualizada con la ayuda de un sistema de formación de imágenes Eagle Eye (Stratagene, La Jolla, CA, EE.UU.) a 360 nm. La banda de ADN de 3,9 kb fue escindida del gel y purificada usando un ADN de PCR GFX® y equipo de purificación de banda de gel (GE Healthcare, Reino Unido) según las instrucciones del fabricante.

15 [0229] El fragmento de 3,9 kb fue autoligado a 16°C durante toda la noche con 10 unidades de T4 ADN-ligasa (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, EE.UU.), 9 µl del fragmento de PCR de 3,9 kb, y 1 µl de 10X tampón de unión (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, EE.UU.). El ligamiento fue inactivado por calor durante 10 minutos a 65°C y luego digerido con Dpn I a 37°C durante 2 horas. Tras la incubación, la digestión fue purificada utilizando un ADN de PCR GFX® y equipo de purificación de banda de gel.

20 [0230] El material purificado fue luego transformado en células competentes Top10 de *E. coli* (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La mezcla de transformación fue colocada en placas LB suplementadas con 25 µg de cloranfenicol por ml. Minipreparaciones plásmidas fueron preparadas a partir de diferentes transformantes y digeridas con Bgl II. Un plásmido con la construcción correcta fue elegido. El plásmido fue designado pSigA4. El plásmido pSigA4 contiene el transposón flanqueado por Bgl II SigA2 idéntico al descrito en la WO 01/77315.

25 [0231] Una muestra de 60 µl de plásmido pSigA4 ADN (0,3 µg/µl) fue digerida con Bgl II y separada en un 0,8% de gel de agarosa usando tampón TBE (90 mM Tris-borato; 2 mM EDTA; pH 8,0). Una banda de ADN de trasposón SigA2 de 2 kb fue eluida con 200 µl de tampón EB (QIAGEN GmbH Corporation, Hilden, Alemania) y purificada utilizando un ADN de PCR GFX® y equipo de purificación de banda de gel según las instrucciones del fabricante y eluida en 200 µl de tampón EB. SigA2 fue usado para atrapamiento de señal asistido de transposón.

Ejemplo 5: atrapamiento de señal asistido de transposón de la cepa de *Penicillium oxalicum*

35 [0232] Una descripción completa del atrapamiento de señal asistido de transposón se puede encontrar en la WO 01/77315. El grupo de plásmidos fue tratado con transposón SigA2 y transposasa HyperMu (Epicenter, número de catálogo THM03210) según las instrucciones del fabricante.

40 [0233] Para etiquetado de transposón *in vitro* de la genoteca de ADNc de *Penicillium oxalicum*, 2 µl de transposón SigA2 que contenía aproximadamente 100 ng de ADN fue mezclado con 1 µl del grupo de ADN plásmido de la genoteca de ADNc de *Penicillium oxalicum* que contenía 1 µg de ADN, 1 µl de transposasa HyperMu y 2 µl de tampón 10X en un volumen total de 20 µl e incubado a 30°C durante 3 horas seguidas de adición de 2 µl de tampón inhibidor e inactivación térmica a 75°C durante 10 minutos. El ADN fue precipitado por adición de 2 µl de 3 M de acetato sódico pH 5 y 55 µl de 96% de etanol y centrifugado durante 30 minutos a 10.000 x g, 4°C. El granulado fue lavado en 70% de etanol, secado al aire a temperatura ambiente y resuspendido en 10 µl de agua desionizada.

50 [0234] Un volumen de 2 µl del grupo plásmido etiquetado de transposón fue sometido a electroporación en 50 µl de células ElectroMAX DH10B de *E. coli* (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante utilizando un GENE PULSER® y controlador de pulso, (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) a 25 uF, 25 mAmp, 1,8 kV con un 1 mm cubeta de espacio según el procedimiento del fabricante.

55 [0235] Las células sometidas a electroporación fueron incubadas en el medio SOC con agitación a 225 r.p.m. durante 1 hora a 37°C antes de ser colocadas en placas en los siguientes medios selectivos: medio LB suplementadas con 50 µg de canamicina por ml; medio LB suplementado con 50 µg de canamicina por ml y 15 µg de cloranfenicol por ml; y medio LB suplementado con 50 µg de canamicina por ml, 15 µg de cloranfenicol por ml y 30 µg de ampicilina por ml.

60 [0236] Desde la colocación en placas de la electroporación en medio LB suplementado con canamicina, cloranfenicol y ampicilina, aproximadamente 700 colonias fueron observadas después de 3 días a 30°C. Todas las colonias fueron colocadas en placas de nuevo en canamicina de LB, cloranfenicol con 100mgs/l de ampicilina. Las colonias fueron llevadas a secuenciar por la empresa SinoGenoMax utilizando los cebadores sentido y antisentido de transposón (cebadores A y B), mostrados por debajo, según el procedimiento descrito en la WO 01/77315 (página 28).

Cebador A: 5'-AGCGTTTGCGGCCGCGATCC-3' (SEC ID n.º: 5)

Cebador B: 5'-TTATTCGGTCGAAAAGGATCC-3' (SEC ID n.º: 6)

Ejemplo 6: clonación de gen de glucoamilasa de la cepa de *Penicillium oxalicum*

[0237] Ensamblaje de secuencia y anotación. Las secuencias de ADN fueron obtenidas de la empresa SinoGenoMax, recortadas para eliminar partes de secuencia originadas de la secuencia de transposón y vector. Las secuencias recortadas fueron reagrupadas en secuencias contiguas usando el programa PhredPhrap (Ewing *et al.*, 1998, Genome Research 8: 175-185; Ewing and Green, 1998, Genome Research 8: 186-19). Todas las secuencias contiguas fueron posteriormente comparadas con las secuencias disponibles en las bases de datos públicas estándar de ADN y de secuencias proteínicas (TrEMBL, SWALL, PDB, EnsemblPep, GeneSeqP) usando el programa BLASTX 2.0a19MP-WashU [14-Jul-1998] [Build linux-x86 18:51:44 30-Jul-1998] (Gish *et al.*, 1993, Nat. Genet. 3: 266-72). El gen de glucoamilasa de la familia GH15 fue identificado directamente por análisis de los resultados de BlastX.

[0238] Preparación de ADNc de la cepa de *Penicillium oxalicum*. El ADNc fue sintetizado siguiendo la instrucción de amplificación rápida 3' del sistema de extremo de ADNc (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.).

[0239] Clonación del gen de glucoamilasa de la cepa de *Penicillium oxalicum*. Basado en la información del gen de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* obtenida por TAST el cebador oligonucleótido mostrado más adelante fue diseñado para amplificar el gen a partir del extremo 5' de glucoamilasa.

Cebador sentido: 5'-ATGCGTCTCACTCTATTATCAGGTG-3' (SEC ID n.º: 7)

[0240] El gen en toda su longitud fue amplificado por PCR con cebador sentido y AUAP (suministrado por amplificación rápida 3' de sistema de extremo de ADNc) usando polimerasa de ADN Platinum HIFI Taq DNA (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.). La reacción de amplificación estaba compuesta por 5 µl de 10x tampón PCR, 2 µl de 25mM de MgCl₂, 1 µl de 10mM de dNTP, 1 µl de 10uM cebador de sentido, 1 µl de 10 uM AUAP, 2 µl del ADNc de primera cadena, 0,5 µl de HIFI Taq y 37,5 µl de agua desionizada. El programa PCR fue: 94°C, 3mins; 10 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 60°C 40 segundos con 1°C de reducción por ciclo, 68°C durante 2 min.; 25 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 50°C durante 40 segundos, 68°C durante 2 min.; extensión final a 68°C durante 10 minutos.

[0241] El fragmento de PCR obtenido fue clonado en el vector pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.) utilizando un Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.) para generar plásmido AMG 1. El gen de glucoamilasa insertado en el plásmido AMG 1 fue confirmado por secuenciación. TOP10 de la cepa de *E. coli* que contenían plásmido AMG 1 (designado NN059173), fueron depositadas con el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) el 23 de noviembre de 2009, y el número de registro asignado fue DSM 23123.

Ejemplo 7: expresión de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* clonada

[0242] El gen de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* fue reclonado a partir del plásmido AMG 1 en un vector de expresión de *Aspergillus* por PCR usando dos cebadores de clonación F y cebador R mostrados más adelante, que fueron diseñados basados en la secuencia conocida se les añadieron etiquetas para clonación directa por estrategia IN-FUSION™.

[0243] Cebador F: 5' ACACAACTGGGGATCCACCATGCGTCTCACTCTATTATC (SEC ID n.º: 8)

[0244] Cebador R: 5' AGATCTCGAGAAGCTTAAACTGCCACACGTCGTTGG (SEC ID n.º: 9)

[0245] Una reacción por PCR fue realizada con plásmido AMG 1 para amplificar el gen en toda su longitud. La reacción por PCR estaba compuesta por 40 µg del ADN de plásmido AMG 1, 1 µl de cada cebador (100 µM); 12,5 µl de 2X Extensor Hi-Fidelity master mix (Extensor Hi-Fidelity Master Mix, ABgene, Reino Unido) y 9,5 µl de agua de grado de PCR. La reacción por PCR fue realizada utilizando un máquina de PCR DYAD (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.) programada durante 2 minutos a 94°C seguido de 25 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 50°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto; y luego 10 minutos a 72°C.

[0246] Los productos de reacción fueron aislados por 1,0% de electroforesis en gel de agarosa utilizando 1 x tampón TAE donde una banda de producto de PCR de aproximadamente 1,9 kb fue escindida del gel y purificada utilizando un ADN de PCR GFX® y equipo de purificación de banda de gel (GE Healthcare, Reino Unido) según las instrucciones del fabricante. El ADN que se correspondía con el gen de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* fue clonado en un vector de expresión *Aspergillus* linealizado con BamHI y HindIII, usando un equipo de clonación por PCR IN-FUSION™ Dry-Down (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La construcción del vector linealizado es como se describe en la WO2005042735A1.

[0247] Un volumen de 2 µl de la mezcla de ligamiento fue usado para transformar 25 µl de células de *E. coli* Blue Fusion (incluidas en el equipo de clonación por PCR IN-FUSION™ Dry-Down). Después de que un choque térmico a 42°C durante 45 seg, y enfriamiento en hielo, 250 µl de medio de SOC fue añadido, y las células fueron incubadas a 37°C a 225 r.p.m. durante 90 min antes de ser colocadas en placas de agar LB que contenían 50 µg de ampicilina por ml, y cultivadas durante toda la noche a 37°C. Colonias seleccionadas fueron inoculadas en 3 ml de medio LB suplementado con 50 µg de ampicilina por ml e incubadas a 37°C a 225 r.p.m. durante toda la noche. ADN plásmido de las colonias seleccionadas fue purificado utilizando Mini JETSTAR (Genomed, Alemania) según las instrucciones del fabricante. La

secuencia de genes de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* fue verificada por secuenciación de Sanger antes de expresión heteróloga. Uno de los plásmidos fue seleccionado para expresión posterior, y fue denominado XYZ.

[0248] Protoplastos de *Aspergillus niger* MBin118 fueron preparados como se describe en la WO 95/02043. Cien µl de suspensión de protoplasto fue mezclada con 2,5 µg del plásmido XYZ y 250 microlitros de 60% de PEG 4000 (Applichem) (polietilenglicol, peso molecular 4.000), 10 mM de CaCl₂, y 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 fueron adicionados y suavemente mezclados. La mezcla fue incubada a 37°C durante 30 minutos y los protoplastos fueron mezclados con 6% de agarosa de bajo punto de fusión (Biowhittaker Molecular Applications) en placas (1M) de sacarosa de COVE (Cove, 1996, Biochim. Biophys. Acta 133:51-56) suplementadas con 10 mM de acetamida y 15 mM de CsCl y adicionado como una capa superior en placas de sacarosa de COVE (1 M) suplementadas con 10 mM de acetamida y 15 mM de CsCl para selección de transformantes (4 ml de agar superior por placa). Tras la incubación durante 5 días a 37°C, esporas de dieciséis transformantes fueron recogidas y sembradas en 750 µl YP-2% medio de maltosa en placas MT de 96 pocillos profundos. Después de 5 días de cultivo estacionario a 30°C, 10 µl del caldo de cultivo de cada pocillo fueron analizados en un gel SDS-PAGE (electroforesis en gel de sodio dodecil sulfato-poliacrilamida), gel prefundido Griton XT (BioRad, CA, EE.UU.) para identificar los mejores transformantes basados en la capacidad para producir gran cantidad de glucoamilasa. Un transformante seleccionado fue identificado en la placa de transformación original y fue conservado como esporas en un 20% de reserva de glicerol y almacenado en congelación (-80°C).

[0249] Cultivo. El transformante seleccionado fue inoculado en 100ml de medios MLC y cultivado a 30 °C durante 2 días en frascos de agitación de 500 ml en una coctelera giratoria. 3 ml del caldo de cultivo fue inoculado a 100ml de medio M410 y cultivado a 30°C durante 3 días. El caldo de cultivo fue centrifugado y el sobrenadante fue filtrado utilizando filtros de membrana de 0,2 µm.

[0250] Gel de afinidad de alfa-ciclodextrina. Diez gramos de polvo de sefarosa 6B activada por epoxi (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, U.K) fueron suspendidos y lavados con agua destilada en un filtro de vidrio sinterizado. El gel fue suspendido en la solución de acoplamiento (100 ml de 12,5 mg/ml de alfa-ciclodextrina, 0,5 M de NaOH) e incubado a temperatura ambiente durante un día con agitación suave. El gel fue lavado con agua destilada en un filtro de vidrio sinterizado, suspendido en 100 ml de 1 M de etanolamina, pH 10, e incubado a 50 °C durante 4 horas para bloqueo. El gel fue luego lavado varias veces utilizando 50 mM de Tris-HCl, pH 8 y 50 mM de NaOAc, pH 4,0 alternativamente. El gel fue finalmente envasado en una columna de 35-40 ml utilizando un tampón de equilibrado (50 mM de NaOAc, 150 mM de NaCl, pH 4,5).

[0251] Purificación de glucoamilasa a partir de caldo de cultivo. El caldo de cultivo de fermentación de *A. niger* MBin118 que contenía el gen de glucoamilasa fue filtrado a través de un filtro PES de 0,22 µm, y aplicado en una columna de gel de afinidad de alfa-ciclodextrina previamente equilibrada en 50 mM de NaOAc, 150 mM de NaCl, tampón de pH 4,5. Material no unido fue lavado fuera de la columna con tampón de equilibrado y la glucoamilasa fue eluida usando lo mismo tampón que contenía 10 mM de beta-ciclodextrina sobre volúmenes de 3 columnas.

[0252] La actividad de la glucoamilasa del eluyente fue controlada para ver si la glucoamilasa se había ligado al gel de afinidad de alfa-ciclodextrina. La muestra de glucoamilasa purificada fue luego dializada contra 20 mM de NaOAc, pH 5,0. La pureza fue finalmente controlada por SDS-PAGE, y solo una única banda fue descubierta (véase la figura 1).

Ejemplo 8: caracterización de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*

[0253] Sustrato. Sustrato: 1% almidón soluble (Sigma S-9765) en agua desionizada

[0254] Tampón de reacción: 0,1 M de tampón de acetato en pH 5,3

[0255] Equipo de determinación de concentración de glucosa: equipo de ensayo de glucosa Wako (LabAssay glucose, WAKO, número de catálogo 298-65701).

[0256] Condición de reacción. 20 µl de almidón soluble y 50 µl de tampón de acetato en pH 5,3 fueron mezclados. 30µl de solución enzimática (50 µg de proteína enzimática/ml) se añadió a un volumen final de 100 µl seguido de incubación a 37 °C durante 15 min.

[0257] La concentración de glucosa fue determinada por equipos Wako.

[0258] Todo el trabajo se realizó paralelamente.

[0259] Temperatura óptima. Para valorar la temperatura óptima de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* el ensayo de condición de reacción anteriormente descrito se realizó a 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90 y 95 °C. Los resultados se muestran en la tabla 1.

ES 2 565 060 T3

Tabla 1 Temperatura óptima

Temperatura (°C)	20	30	40	50	60	70	80	85	90	95
Actividad relativa (%)	63,6	71,7	86,4	99,4	94,6	100,0	92,9	92,5	82,7	82,8

[0260] De los resultados se puede observar que la temperatura óptima para glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en las condiciones dadas es entre 50 °C y 70 °C y la glucoamilasa mantiene más del 80% de actividad a 95 °C.

[0261] Estabilidad térmica. Para valorar la estabilidad térmica de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* el ensayo de condición de reacción fue modificado en que la solución enzimática y el tampón de acetato se preincubaron durante 15 min a 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90 y 95 °C. Después de la incubación, 20 µl de almidón se añadió a la solución y el ensayo se realizó como se ha descrito anteriormente.

[0262] Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 2 Estabilidad térmica

Temperatura (°C)	20	30	40	50	60	70	80	85	90	95
Actividad relativa (%)	91,0	92,9	88,1	100,0	96,9	86,0	34,8	36,0	34,2	34,8

[0263] De los resultados, se puede observar que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* es estable hasta 70°C después de preincubación durante 15 min donde mantiene más del 80% de actividad.

[0264] PH óptimo. Para valorar el pH óptimo de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* el ensayo de condición de reacción anteriormente descrito fue realizado a pH 2,0, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0,6,0 7,0, 8,0, 9,0,10,0 y 11,0. En vez de usar el tampón de acetato descrito en el ensayo de condición de reacción, el siguiente tampón fue usado 100mM de ácido succínico, HEPES, CHES, CAPSO, 1 mM de CaCl₂, 150 mM de KCl, 0,01% de Tritón X-100, pH ajustado a 2,0, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0,6,0 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 o 11,0 con HCl o NaOH.

[0265] Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3 PH óptimo

PH	2,0	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0
Actividad relativa (%)	71,4	78,6	77,0	91,2	84,2	100,0	55,5	66,7	30,9	17,8	15,9	16,1

[0266] De los resultados, se puede observar que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en las condiciones dadas tienen la máxima actividad a pH 5,0. La glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* es activa en un margen de pH amplio, donde mantiene más del 50% de actividad de pH 2 a 7.

[0267] Estabilidad de pH. Para valorar la estabilidad térmica de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*, el ensayo de condición de reacción fue modificado en que la solución enzimática (50 µg/ml) fue preincubada durante 20 horas en tampones con pH 2,0, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0,6,0 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 y 11,0, utilizando los tampones descritos en pH óptimo. Después de la preincubación, 20µl de almidón soluble a un volumen final de 100 µl se añadió a la solución y el ensayo fue realizado como se ha descrito anteriormente.

[0268] Los resultados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4 Estabilidad de pH

PH	2,0	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0
Actividad relativa (%)	17,4	98,0	98,0	103,2	100,0	93,4	71,2	90,7	58,7	17,4	17,0	17,2

[0269] De los resultados, se puede observar que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* es estable de pH 3 a pH 7 después de la preincubación durante 20 horas y reduce su actividad a pH 8.

Ejemplo 9: rendimiento de sacarificación de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*

[0270] El rendimiento de sacarificación de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* fue evaluado a 70°C con y sin la adición de alfa-amilasa ácida descrita como la variante JA001 en la WO 2005/003311. La sacarificación se realizó bajo las siguientes condiciones: sustrato: maltodextrina DE11, aprox. 30% DS (p/p) Temperatura: 70°C pH inicial: 4,3

5 Dosificación enzimática: glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*: 0,075 AGU/g DS con y sin alfa-amilasa ácida: 0,05 AFAU/g DS.

[0271] Como un control, glucoamilasa de *A. niger* (uniprot: P69328) se usó a 60°C con 0,225 AGU/g DS.

10 Sacarificación

[0272] El sustrato para sacarificación fue hecho por disolución de maltodextrina DE 11 (obtenida a partir de maíz común) en agua hirviendo Milli-Q y ajustando la sustancia seca a aproximadamente 30% (p/p). El pH fue ajustado a 4,3. Cinco mililitros de sustrato fueron transferidos a tubo de plástico de 15 ml y colocados al baño maría a 70°C, y luego las

15 enzimas fueron adicionadas en las concentraciones indicadas en la tabla 5. Se tomaron muestras periódicamente y se analizaron usando HPLC para determinar la composición de carbohidrato.

[0273] La glucosa producida durante la sacarificación se da en la tabla 5. Los números son % de DP1 (glucosa) en DS (sólidos secos). Un rendimiento de glucosa por encima de 95% se obtuvo después de 72 horas utilizando una dosificación enzimática de 0,075 AGU/g DS que se corresponde con 0,016 mg proteína enzimática/g DS. Ya que la dosificación de glucoamilasa de *A. niger* fue 0,225 AGU/g DS que corresponde con 0,12 mg de proteína enzimática/g DS, una dosificación de enzima significativamente inferior en mg de proteína enzimática de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* es por lo tanto necesaria en el proceso de sacarificación.

25 Tabla 5

	Glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> (70°C)		Glucoamilasa de <i>A. niger</i> (60°C)	
Tiempo (horas)	0,075 AGU + 0,05 AFAU	0,075 AGU	0,225 AGU + 0,05 AFAU	0,225 AGU
24	76,9	79,1	92,3	83,9
46	94,2	90,9	95,6	89,7
70	95,8	94,7	95,6	91,9

Ejemplo 10: evaluación de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en licuefacción a 80°C a pH 4,50 y 5,80

[0274] Este ejemplo ilustra que la licuefacción y la sacarificación pueden hacerse simultáneamente, alcanzando una pasta que se puede fermentar en etanol.

[0275] Muestras de inicio. Maíz molido y agua de proceso fueron obtenidos a partir de maíz LP (Iowa, EE.UU.) y usados para este experimento. Tres muestras de lodo con un objetivo de % de sólidos secos de 32,5% fueron preparadas en 160g de escala utilizando 58g de maíz molido, 53g de agua del grifo y 48g de agua de proceso. Dos de los lodos fueron

35 ajustados a pH 5,80 y uno fue ajustado a pH 4,50.

[0276] Tratamiento de licuefacción. Los 3 lodos recibieron una dosis de Termamyl™ SC (alfa-amilasa disponible comercialmente de Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca) de 0,1232 KNU-s/g DS (KNU-s/g sólidos secos). Uno de los lodos de pH 5,80 recibió una dosis de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* de 0,24 AGU/g DS (AGU/g sólidos secos), mientras que el otro no recibió nada (pasta de control). La pasta de pH 4,50 también recibió una dosis de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* de 0,24 AGU/g DS. Todos los lodos fueron incubados a 80°C durante un total de 2 horas en un baño maría precalentado, con mezcla periódica. Tras la incubación, las pastas fueron inmediatamente

40 enfriadas en hielo a temperatura ambiente. Las pastas fueron ajustadas a pH 5,0 y urea y penicilina fueron adicionadas para alcanzar concentraciones finales de 1.000 ppm y 3 ppm, respectivamente.

[0277] Fermentaciones. Antes de añadir aproximadamente 5g del la pasta preparada anteriormente en cada tubo, cada tubo vacío fue pesado. Después de la adición de las pastas en los tubos apropiados, todos los tubos fueron pesados nuevamente para medir los pesos de pasta iniciales. La glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se añadió a la pasta de control en una dosis de 0,24 AGU/g DS. Ninguna glucoamilasa se añadió a los tubos que contenían las otras dos pastas

50 2. La levadura RED STAR ETHANOL RED™ de LeSaffre Corp. (Wisconsin, EE.UU.) fue rehidratada en agua de grifo a 32°C durante 30 minutos (5,50g en 100mL de agua del grifo), y luego 100µl de esta suspensión se añadió a cada tubo utilizando una pipeta repetidora. Agua desionizada fue también añadida a cada tubo para mantener un % de DS inicial constante. Después de la glucoamilasa (como fuera apropiado), agua y levadura fueron adicionadas a cada tubo, se repesaron y luego se colocaron en un conjunto a temperatura ambiente constante a 32°C durante un total de 58 horas. Dos veces al día los tubos fueron retirados de la habitación, agitados en vórtex para su mezcla, repesados y luego

55 colocados de nuevo en la habitación para continuar las fermentaciones.

[0278] Después de 58 horas de fermentación, todos los tubos fueron agitados en vórtex, repesados y luego las fermentaciones fueron detenidas por la adición de 50 µl de 40% de H₂SO₄ en cada tubo, seguido de agitación en vórtex profunda. Los tubos fueron centrifugados a 1.500xg durante 10 minutos y luego los sobrenadantes fueron filtrados con jeringa a través de filtros de nilón de 0,45 µm en viales de HPLC marcados. Las muestras fueron luego analizadas por HPLC para su contenido en etanol.

[0279] Los resultados se muestran en la tabla 6. Se puede observar que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* impulsó la cantidad de etanol, especialmente cuando se usó en licuefacción a pH 4,50.

Tabla 6

Muestra	Etanol, g/L
0.24 AGU/g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción, pH 4.50	120,36
0.24 AGU/g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción, pH 5.80	119,21
Control, ningún <i>Penicillium</i> glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción pero en la fermentación, pH 5.80	118,88

Ejemplo 11: evaluación de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en licuefacción a 85°C en dosis-respuesta a pH 4,50

[0280] Muestras de inicio. Maíz molido y agua de proceso se obtuvieron a partir de LP de maíz y se usaron para este experimento. Diez muestras de lodo con un objetivo de % en sólidos secos de 32,5% fueron preparados en 125g de escala utilizando 45g de maíz molido, 42g de agua del grifo y 38g de agua de proceso. Cinco de los lodos fueron ajustados a pH 4,50. Uno de los lodos sirvió como control.

[0281] Tratamiento de licuefacción. Todos los 5 lodos recibieron una dosis de Termamyl™ SC de 0,1232 KNU-s/g DS. Los cinco lodos a pH 4,50 recibieron las siguientes dosis de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*: 0 - 0,0048 - 0,024 - 0,048 - 0,24 AGU/g DS. Todos los lodos fueron incubados a 85°C durante un total de 2 horas en un baño maría precalentado, con mezcla periódica. Tras la incubación, las pastas fueron inmediatamente enfriadas en hielo a temperatura ambiente. Las pastas fueron ajustadas a pH 5,0 y urea y penicilina fueron adicionadas para alcanzar concentraciones finales de 1.000 ppm y 3 ppm, respectivamente.

[0282] Fermentaciones. Antes de añadir aproximadamente 5g de la pasta en cada tubo, cada tubo vacío fue pesado. Después de la adición de las pastas en los tubos apropiados, todos tubos fueron pesados nuevamente para medir los pesos de pasta inicial. Se añadió glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* a cada tubo a una concentración de 0,50 AGU/g DS. Levadura RED STAR ETHANOL RED™ de LeSaffre Corp. fue rehidratada en agua del grifo a 32°C durante 30 minutos (5,50g en 100mL de agua del grifo), y luego 100 µL de esta suspensión se añadió a cada tubo utilizando una pipeta repetidora. Agua desionizada fue también añadida a cada tubo para mantener un % de DS inicial constante. Después de la glucoamilasa de *Talaromyces emersonii*, agua y levadura fueron adicionadas a cada tubo, éstos fueron repesados y luego colocados en un conjunto de temperatura ambiente constante a 32°C durante un total de 54 horas. Dos veces al día los tubos fueron quitados de la habitación, agitados en vórtex para mezcla, repesados, y luego colocados de nuevo en la habitación para continuar las fermentaciones.

[0283] Después de 54 horas de fermentación, todos los tubos fueron agitados en vórtex, repesados y luego las fermentaciones fueron detenidas por la adición de 50 µl de 40% de H₂SO₄ en cada tubo, seguido de agitación en vórtex profunda. Los tubos fueron centrifugados a 1.500xg durante 10 minutos y luego los sobrenadantes fueron filtrados con jeringa a través de filtros de nilón de 0,45 µm en viales de HPLC marcados. Las muestras fueron luego analizadas por HPLC para su contenido en etanol.

[0284] Los resultados se muestran en la tabla 7. Se puede observar que el etanol producido a partir de maíz molido y agua de proceso es mejorado por glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en licuefacción en respuesta a la dosis.

Tabla 7

Muestra	Etanol, g/L
Control, ningún glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción	128,33
0,0048 AGU/g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción	128,57
0,024 AGU/g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción	128,75
0,048 AGU/g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción	130,51
0,24 AGU/g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción	132,27

Ejemplo 12: más evaluación de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en la licuefacción a pH 4,5 y 85 °C

[0285] Muestra de lodo. Una muestra de lodo preparada en la planta piloto en el National Corn to Ethanol Research Center (NCERC) durante mayo de 2008 fue usada como materia prima para este estudio. La muestra fue preparada

utilizando todo el maíz molido (sin agua de proceso) en un objetivo de % de sólidos secos de 32,0%. Se licuó en pH 5,80, 85°C durante 30 minutos utilizando 0,0492 KNU-s/g DS de Termamyl™ SC.

[0286] Tratamiento de licuefacción. Seis pastas de maíz completamente licuadas diferentes fueron preparadas utilizando la muestra del NCERC de lodo anteriormente descrita como materia prima. Abreviadamente, aproximadamente 110g de la pasta de lodo fue pesada en 5 botellas de Nalgene separadas de 250ml. Muestras de pasta del lodo fueron ajustadas a pH 4,50 usando 40% de H₂SO₄. Partes alícuotas de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* fueron luego añadidas a cada pasta para alcanzar dosis de enzima finales de 0 -0,0048 - 0,024 - 0,048 -0,096 - 0,24 AGU/g de DS. 0,0740 KNU-s/g DS de Termamyl™ SC fue también añadido a cada pasta. Las pastas fueron incubadas a 85°C durante 1.5 horas adicionales en un baño maría precalentado, con mezcla periódica. Tras la incubación, las pastas fueron inmediatamente enfriadas en hielo a temperatura ambiente. Las pastas fueron ajustadas a pH 5,0 usando 10% de NaOH y urea y penicilina fueron adicionadas para alcanzar concentraciones finales de 1.000 ppm y 3 ppm, respectivamente. Muestras pequeñas de cada pasta se tomaron para análisis de HPLC para medir la cantidad del almidón disponible que se convirtió en glucosa durante la licuefacción. Para estos cálculos, el porcentaje del maíz molido inicial que era almidón se asumió que era 30,0%.

[0287] Los resultados se muestran en la tabla 8. Se puede observar que el porcentaje de almidón convertido en glucosa en la licuefacción fue mejorado por adición de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en el tratamiento de licuefacción.

Tabla 8

Pasta	Glucosa (g/L)	% de almidón en glucosa
Control, sin glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción	8,4	3,6%
0,0048 AGU /g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción	9,2	4,0%
0,024 AGU /g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción	22,9	9,9%
0,048 AGU /g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción	39,4	17,1%
0,096 AGU/g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción	71,9	31,1%
0,24 AGU /g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción	123,7	53,5%

[0288] Fermentaciones. Antes de añadir aproximadamente 5g de la pasta generada en el tratamiento de licuefacción anterior a cada tubo, cada tubo vacío fue pesado. Después de la adición de las pastas en los tubos apropiados, todos los tubos fueron pesados nuevamente para medir los pesos de pasta inicial. La solución madre de glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* fue luego añadida a cada uno de los tubos para una dosis inicial de 0,50 AGU/g DS. Levadura de RED STAR ETHANOL RED™ de LeSaffre Corp. fue rehidratada en agua del grifo a 32°C durante 30 minutos (5,50g en 100mL de agua del grifo), y luego 100µl de esta suspensión de levadura se añadió a cada tubo utilizando una pipeta repetidora. Agua desionizada fue también añadida a cada tubo para mantener un % DS inicial constante. Después de la glucoamilasa de *Talaromyces emersonii*, agua y levadura fueron adicionadas a cada tubo, éstos fueron repesados y luego colocados en un conjunto de temperatura ambiente constante a 32°C durante un total de 54 horas. Dos veces al día los tubos fueron retirados de la cámara, agitados en vórtex para mezcla, repesados y luego colocado de nuevo en la cámara para continuar las fermentaciones.

[0289] Después de 54 horas de fermentación, todos los tubos fueron agitados en vórtex, repesados y luego las fermentaciones fueron detenidas por la adición de 50 µl de 40% de H₂SO₄ en cada tubo, seguido de agitación en vórtex profunda. Los tubos fueron centrifugados a 1.500xg durante 10 minutos y luego los sobrenadantes fueron filtrados con jeringa a través de filtros de nilón de 0,45 µm en viales de HPLC marcados. Las muestras fueron luego analizadas por HPLC para su contenido en etanol.

[0290] Los resultados se muestran en la tabla 9. Se puede observar que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* mejoró la producción de etanol cuando se usó en la licuefacción a pH 4,5.

Tabla 9

Tratamiento	Etanol, g/L
Control, sin glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción	110,14
0.0048 AGU /g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción	110,75
0.024 AGU /g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción	111,70
0.048 AGU /g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción	112,25
0.096 AGU /g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción	112,70
0.24 AGU /g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la licuefacción	113,31

Ejemplo 13: evaluación de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en la pre-sacarificación a pH 5,0 y 70°C

[0291] Este ejemplo describe un proceso de producción de etanol donde glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se usa en un proceso de pre-sacarificación seguido de un proceso de fermentación sin uso de glucoamilasa adicional. Este proceso se compara con un proceso de producción de etanol tradicional donde el proceso de licuefacción está seguido de un proceso de SSF que utiliza una glucoamilasa no termoestable.

[0292] Muestra de lodo. Una muestra de lodo preparada en la instalación piloto en el National Corn to Ethanol Research Center (NCERC) durante mayo de 2008 fue usada como materia prima para este estudio. La muestra fue preparada utilizando el maíz molido entero (sin agua de proceso) en un objetivo de % de sólidos secos de 32,0%. Fue licuado a pH 5,80, 85°C durante 30 minutos utilizando 0,0246 KNU-s/g DS de Termamyl™ SC.

[0293] Tratamiento de licuefacción. Una pasta de maíz completamente licuado se preparó utilizando la muestra del NCERC de lodo anteriormente descrita como materia prima. En resumen, aproximadamente 400g de la pasta de lodo fue pesada en una botella de Nalgene de 1 L; la muestra de pasta de lodo fue ajustada a pH 5,80 usando 40% de H₂SO₄. 0,0740 KNU-s/g DS de Termamyl™ SC fue adicionado a la pasta que fue luego incubada a 85°C durante 1,5 horas más en un baño maría precalentado, con mezcla periódica.

[0294] Pre-sacarificación. Tras la incubación, la pasta fue dividida en partes alícuotas en dos botellas de Nalgene de 100mL, enfriadas hasta 70°C al baño maría y partes alícuotas de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* fueron adicionadas a cada pasta para alcanzar enzima final de 0 y 0,24 AGU/gDS. Las pastas fueron incubadas a 70°C durante 2 horas más en el baño maría, con mezcla periódica. Tras la incubación, las pastas fueron inmediatamente enfriada a temperatura ambiente. Las pastas fueron ajustadas a pH 5,0 usando 10% de NaOH y urea y penicilina fueron adicionadas hasta alcanzar concentraciones finales de 1.000 ppm y 3 ppm, respectivamente. Muestras pequeñas de cada pasta se tomaron para análisis de HPLC.

[0295] Los resultados se muestran en la tabla 10. Se puede observar que el porcentaje de almidón convertido en glucosa en la pre-sacarificación fue mejorado por la adición de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*.

Tabla 10

Pasta	Glucosa (g/l)	% de almidón en glucosa
Control, sin glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la pre-sacarificación	8,43	3,6%
0.24 AGU /g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la pre-sacarificación	136,91	58,5%

[0296] Fermentaciones. Antes de la adición de aproximadamente 5g de pasta en cada tubo, cada tubo vacío fue pesado. Después de la adición de las pastas en los tubos apropiados, todos los tubos fueron pesados nuevamente para medir los pesos de pasta inicial. La solución madre de glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* fue luego añadida al tubo de control para una dosis inicial de 0,50 AGU/g DS mientras que ninguna glucoamilasa adicional se añadió a la muestra que recibió glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en la presacarificación.

[0297] Levadura RED STAR ETHANOL RED™ de LeSaffre Corp. fue rehidratada en agua del grifo a 32°C durante 30 minutos (5,50g en 100mL de agua del grifo), y luego 100 µl de esta suspensión se añadió a cada tubo utilizando una pipeta repetidora. Agua desionizada fue también añadida a cada tubo para mantener un % de DS inicial constante. Después de la glucoamilasa de *Talaromyces emersonii*, agua y levadura fueron adicionadas a cada tubo, éstos fueron repesados y luego colocados en un conjunto de temperatura ambiente constante a 32°C durante un total de 54 horas. Dos veces al día los tubos fueron retirados de la cámara, agitados en vórtex para mezcla, repesados y luego colocado de nuevo en la cámara para continuar las fermentaciones.

[0298] Después de 54 horas de fermentación, todos los tubos fueron agitados en vórtex, repesados y luego las fermentaciones fueron detenidas por la adición de 50 µl de 40% de H₂SO₄ en cada tubo, seguidos de agitación en vórtex profunda para mezcla. Los tubos fueron centrifugados a 1.500xg durante 10 minutos y luego los sobrenadantes fueron filtrados con jeringa a través de filtros de nilón de 0,45 µm en viales de HPLC marcados. Las muestras fueron luego analizadas por HPLC para su contenido de etanol.

[0299] Los resultados se muestran en la tabla 11. Se puede observar que glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* cuando se usa en la etapa de presacarificación a pH 5,80 a 70 °C produjo una cantidad de etanol equivalente a la cantidad de etanol producida por el proceso convencional (control). Este es un resultado óptimo considerando que solo la mitad de la cantidad de actividad de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* fue usada en comparación con la actividad de glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* (0,5 AGU/g DS).

Tabla 11

Tratamiento	Etanol, g/L
Control, sin glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la pre-sacarificación, pero 0,5 AGU/g DS glucoamilasa de <i>Talaromyces emersonii</i> en la fermentación	110,14
0,24 AGU /g DS glucoamilasa de <i>Penicillium oxalicum</i> en la pre-sacarificación	110,86

Depósito de material biológico

- 5 [0300] El siguiente material biológico se ha depositado según los términos del tratado de Budapest con el *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ), Mascheroder Weg 1 B, D-38124 Braunschweig, Alemania y le fue asignado el siguiente número de registro:

- 10 Depósito cepa de *E. coli* NN059173 con plásmido que comprende la secuencia glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*
Número de registro DSM 23123 fecha de depósito 23 de noviembre, 2009

- 15 [0301] La cepa ha sido depositada bajo condiciones que garantizan que el acceso al cultivo estará disponible durante la pendency de esta solicitud de patente para una persona determinada por las leyes de patente extranjera con derecho a ella. El depósito representa un cultivo sustancialmente puro de la cepa depositada. El depósito está disponible como es requerido por las leyes de patentes extranjeras en países donde homólogos de la presente solicitud, o su progenie sean presentados. Sin embargo, se debe entender que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para poner en práctica la presente invención en derogación de los derechos de patentes concedidos por la acción gubernamental.

- 20 Listado de secuencias

- [0302]
<110> Novozymes A/S
<120> Polipéptidos que tienen actividad de la glucoamilasa y polinucleótidos que codifican los mismos
- 25 <130> 11697-WO-PCT[2]
<160> 9
<170> Versión de patentIn 3.5
<210> 1
- 30 <211> 1851
<212> ADN
<213> *Penicillium oxalicum*
<220>
<221> CDS
- 35 <222> (1)..(1851)
<400> 1

atg cgt ctc act cta tta tca ggt gta gcc ggc gtt ctc tgc gca gga Met Arg Leu Thr Leu Leu Ser Gly Val Ala Gly Val Leu Cys Ala Gly 1 5 10 15	48
cag ctg acg gcg gcg cgt cct gat ccc aag ggt ggg aat ctg acg ccg Gln Leu Thr Ala Ala Arg Pro Asp Pro Lys Gly Gly Asn Leu Thr Pro 20 25 30	96
ttc atc cac aaa gag ggc gag cgg tcg ctc caa ggc atc ttg gac aat Phe Ile His Lys Glu Gly Glu Arg Ser Leu Gln Gly Ile Leu Asp Asn 35 40 45	144
ctc ggt ggg cga ggt aag aaa aca ccc ggc act gcc gca ggg ttg ttt Leu Gly Gly Arg Gly Lys Lys Thr Pro Gly Thr Ala Ala Gly Leu Phe 50 55 60	192
att gcc agt cca aac aca gag aat cca aac tat tat tat aca tgg act Ile Ala Ser Pro Asn Thr Glu Asn Pro Asn Tyr Tyr Tyr Thr Trp Thr 65 70 75 80	240
cgt gac tca gct ttg act gcc aag tgc ttg atc gac ctg ttc gaa gac Arg Asp Ser Ala Leu Thr Ala Lys Cys Leu Ile Asp Leu Phe Glu Asp 85 90 95	288
tct cgg gca aag ttt cca att gac cgc aaa tac ttg gaa aca gga att Ser Arg Ala Lys Phe Pro Ile Asp Arg Lys Tyr Leu Glu Thr Gly Ile 100 105 110	336
cgg gac tac gtg tcg tcc caa gca atc ctc cag agt gtg tct aat cct Arg Asp Tyr Val Ser Ser Gln Ala Ile Leu Gln Ser Val Ser Asn Pro 115 120 125	384
tct gga acc ctg aag gat ggc tct ggt ctg ggt gaa ccc aag ttt gag Ser Gly Thr Leu Lys Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu 130 135 140	432
att gac ctg aat ccc ttt tcg ggt gcc tgg ggt cgg cct cag cgg gat Ile Asp Leu Asn Pro Phe Ser Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp 145 150 155 160	480
ggc cca gcg ctg cga gcg acc gct atg atc acc tac gcc aac tac ctg	528

Gly	Pro	Ala	Leu	Arg	Ala	Thr	Ala	Met	Ile	Thr	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Leu	
			165						170					175		
ata	tcc	cat	ggt	cag	aaa	tcg	gat	gtg	tca	cag	gtc	atg	tgg	ccg	att	576
Ile	Ser	His	Gly	Gln	Lys	Ser	Asp	Val	Ser	Gln	Val	Met	Trp	Pro	Ile	
			180					185					190			
att	gcc	aat	gat	cta	gca	tat	gtt	ggt	caa	tac	tgg	aat	aat	acc	gga	624
Ile	Ala	Asn	Asp	Leu	Ala	Tyr	Val	Gly	Gln	Tyr	Trp	Asn	Asn	Thr	Gly	
		195					200					205				
ttt	gac	ctg	tgg	gaa	gag	gtg	gat	ggg	tca	agc	ttt	ttc	acg	att	gcg	672
Phe	Asp	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Asp	Gly	Ser	Ser	Phe	Phe	Thr	Ile	Ala	
	210					215					220					
gtc	cag	cac	cga	gcc	ctt	gtt	gaa	ggc	tcg	caa	ctg	gcg	aaa	aag	ctc	720
Val	Gln	His	Arg	Ala	Leu	Val	Glu	Gly	Ser	Gln	Leu	Ala	Lys	Lys	Leu	
	225				230					235					240	
ggc	aag	tcc	tgc	gat	gcc	tgt	gat	tct	cag	cct	ccc	cag	ata	ttg	tgt	768
Gly	Lys	Ser	Cys	Asp	Ala	Cys	Asp	Ser	Gln	Pro	Pro	Gln	Ile	Leu	Cys	
				245					250					255		
ttc	ctg	cag	agt	ttc	tgg	aac	gga	aag	tac	atc	acc	tcc	aac	atc	aac	816
Phe	Leu	Gln	Ser	Phe	Trp	Asn	Gly	Lys	Tyr	Ile	Thr	Ser	Asn	Ile	Asn	
			260					265					270			
acg	caa	gca	agc	cgc	tct	ggt	atc	gac	ctg	gac	tct	gtc	ctg	gga	agc	864
Thr	Gln	Ala	Ser	Arg	Ser	Gly	Ile	Asp	Leu	Asp	Ser	Val	Leu	Gly	Ser	
		275					280					285				
att	cat	acc	ttt	gat	ccc	gaa	gca	gcc	tgt	gac	gat	gca	act	ttc	cag	912
Ile	His	Thr	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Ala	Cys	Asp	Asp	Ala	Thr	Phe	Gln	
	290					295					300					
cct	tgt	tct	gcc	cgc	gct	ctg	gcg	aac	cac	aag	gtc	tat	gtg	gat	tcc	960
Pro	Cys	Ser	Ala	Arg	Ala	Leu	Ala	Asn	His	Lys	Val	Tyr	Val	Asp	Ser	
	305				310					315					320	
ttc	cgc	tct	atc	tac	aag	att	aat	gcg	ggt	ctt	gca	gag	gga	tcg	gct	1008
Phe	Arg	Ser	Ile	Tyr	Lys	Ile	Asn	Ala	Gly	Leu	Ala	Glu	Gly	Ser	Ala	
				325					330					335		
gcc	aac	gtt	ggc	cgc	tac	ccc	gag	gat	gtt	tac	caa	gga	ggc	aat	cca	1056
Ala	Asn	Val	Gly	Arg	Tyr	Pro	Glu	Asp	Val	Tyr	Gln	Gly	Gly	Asn	Pro	
			340					345					350			
tgg	tat	ctc	gcc	acc	cta	ggc	gca	tct	gaa	ttg	ctt	tac	gac	gcc	ttg	1104
Trp	Tyr	Leu	Ala	Thr	Leu	Gly	Ala	Ser	Glu	Leu	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu	
			355				360					365				
tac	cag	tgg	gac	aga	ctt	ggc	aaa	ctt	gaa	gtc	tcg	gag	acc	tcg	ttg	1152
Tyr	Gln	Trp	Asp	Arg	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Leu	
	370					375					380					
tca	ttc	ttc	aaa	gac	ttt	gac	gcg	acc	gtg	aaa	att	ggc	tcg	tac	tcg	1200
Ser	Phe	Phe	Lys	Asp	Phe	Asp	Ala	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Ser	Tyr	Ser	
	385				390					395					400	
agg	aac	agc	aag	acc	tac	aag	aaa	ttg	acc	cag	tcc	atc	aag	tcg	tac	1248
Arg	Asn	Ser	Lys	Thr	Tyr	Lys	Lys	Leu	Thr	Gln	Ser	Ile	Lys	Ser	Tyr	
				405					410					415		
gcg	gac	ggg	ttc	atc	cag	tta	gtg	cag	cag	tac	act	cct	tct	aat	gga	1296
Ala	Asp	Gly	Phe	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Gln	Tyr	Thr	Pro	Ser	Asn	Gly	

420	425	430	
tct ctg gcc gag caa tac gat cgc aat acg gct gct cct ctc tct gca Ser Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Arg Asn Thr Ala Ala Pro Leu Ser Ala 435 440 445			1344
aac gat ctg act tgg tca ttt gcc tct ttc ttg acg gct acg caa cgc Asn Asp Leu Thr Trp Ser Phe Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Gln Arg 450 455 460			1392
cgc gat gcc gtg gtt cct ccc tcc tgg ggc gca aag tcg gca aac aaa Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Ser Trp Gly Ala Lys Ser Ala Asn Lys 465 470 475 480			1440
gtc cca acc act tgt tca gcc tcc cct gtt gtg ggt act tat aag gcg Val Pro Thr Thr Cys Ser Ala Ser Pro Val Val Gly Thr Tyr Lys Ala 485 490 495			1488
ccc acg gca act ttc tca tcc aag act aag tgc gtc ccc gct aaa gat Pro Thr Ala Thr Phe Ser Ser Lys Thr Lys Cys Val Pro Ala Lys Asp 500 505 510			1536
att gtg cct atc acg ttc tac ctg att gag aac act tac tat gga gag Ile Val Pro Ile Thr Phe Tyr Leu Ile Glu Asn Thr Tyr Tyr Gly Glu 515 520 525			1584
aac gtc ttc atg agt ggc aac att act gcg ctg ggt aac tgg gac gcc Asn Val Phe Met Ser Gly Asn Ile Thr Ala Leu Gly Asn Trp Asp Ala 530 535 540			1632
aag aaa ggc ttc cca ctc acc gca aac ctc tac acg caa gat caa aac Lys Lys Gly Phe Pro Leu Thr Ala Asn Leu Tyr Thr Gln Asp Gln Asn 545 550 555 560			1680
ttg tgg ttc gcc agt gtc gag ttc atc cca gca ggc aca ccc ttt gag Leu Trp Phe Ala Ser Val Glu Phe Ile Pro Ala Gly Thr Pro Phe Glu 565 570 575			1728
tac aag tac tac aag gtc gag ccc aat ggc gat att act tgg gag aag Tyr Lys Tyr Tyr Lys Val Glu Pro Asn Gly Asp Ile Thr Trp Glu Lys 580 585 590			1776
ggt ccc aac cgg gtg ttc gtc gct ccc acg gga tgc cca gtt cag cct Gly Pro Asn Arg Val Phe Val Ala Pro Thr Gly Cys Pro Val Gln Pro 595 600 605			1824
cac tcc aac gac gtg tgg cag ttt tga His Ser Asn Asp Val Trp Gln Phe 610 615			1851

<210> 2
 <211> 616
 <212> PRT
 <213> *Penicillium oxalicum*
 <400> 2

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

Gln Leu Thr Ala Ala Arg Pro Asp Pro Lys Gly Gly Asn Leu Thr Pro
 20 25 30

Phe Ile His Lys Glu Gly Glu Arg Ser Leu Gln Gly Ile Leu Asp Asn
 35 40 45
 Leu Gly Gly Arg Gly Lys Lys Thr Pro Gly Thr Ala Ala Gly Leu Phe
 50 55 60
 Ile Ala Ser Pro Asn Thr Glu Asn Pro Asn Tyr Tyr Tyr Thr Trp Thr
 65 70 75 80
 Arg Asp Ser Ala Leu Thr Ala Lys Cys Leu Ile Asp Leu Phe Glu Asp
 85 90 95
 Ser Arg Ala Lys Phe Pro Ile Asp Arg Lys Tyr Leu Glu Thr Gly Ile
 100 105 110
 Arg Asp Tyr Val Ser Ser Gln Ala Ile Leu Gln Ser Val Ser Asn Pro
 115 120 125
 Ser Gly Thr Leu Lys Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu
 130 135 140
 Ile Asp Leu Asn Pro Phe Ser Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp
 145 150 155 160
 Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile Thr Tyr Ala Asn Tyr Leu
 165 170 175
 Ile Ser His Gly Gln Lys Ser Asp Val Ser Gln Val Met Trp Pro Ile
 180 185 190
 Ile Ala Asn Asp Leu Ala Tyr Val Gly Gln Tyr Trp Asn Asn Thr Gly
 195 200 205
 Phe Asp Leu Trp Glu Glu Val Asp Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile Ala
 210 215 220
 Val Gln His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser Gln Leu Ala Lys Lys Leu
 225 230 235 240
 Gly Lys Ser Cys Asp Ala Cys Asp Ser Gln Pro Pro Gln Ile Leu Cys
 245 250 255
 Phe Leu Gln Ser Phe Trp Asn Gly Lys Tyr Ile Thr Ser Asn Ile Asn
 260 265 270
 Thr Gln Ala Ser Arg Ser Gly Ile Asp Leu Asp Ser Val Leu Gly Ser
 275 280 285

ES 2 565 060 T3

Ile His Thr Phe Asp Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp Ala Thr Phe Gln
 290 295 300
 Pro Cys Ser Ala Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Val Tyr Val Asp Ser
 305 310 315 320
 Phe Arg Ser Ile Tyr Lys Ile Asn Ala Gly Leu Ala Glu Gly Ser Ala
 325 330 335
 Ala Asn Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Gln Gly Gly Asn Pro
 340 345 350
 Trp Tyr Leu Ala Thr Leu Gly Ala Ser Glu Leu Leu Tyr Asp Ala Leu
 355 360 365
 Tyr Gln Trp Asp Arg Leu Gly Lys Leu Glu Val Ser Glu Thr Ser Leu
 370 375 380
 Ser Phe Phe Lys Asp Phe Asp Ala Thr Val Lys Ile Gly Ser Tyr Ser
 385 390 395 400
 Arg Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Lys Leu Thr Gln Ser Ile Lys Ser Tyr
 405 410 415
 Ala Asp Gly Phe Ile Gln Leu Val Gln Gln Tyr Thr Pro Ser Asn Gly
 420 425 430
 Ser Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Arg Asn Thr Ala Ala Pro Leu Ser Ala
 435 440 445
 Asn Asp Leu Thr Trp Ser Phe Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Gln Arg
 450 455 460
 Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Ser Trp Gly Ala Lys Ser Ala Asn Lys
 465 470 475 480
 Val Pro Thr Thr Cys Ser Ala Ser Pro Val Val Gly Thr Tyr Lys Ala
 485 490 495
 Pro Thr Ala Thr Phe Ser Ser Lys Thr Lys Cys Val Pro Ala Lys Asp
 500 505 510
 Ile Val Pro Ile Thr Phe Tyr Leu Ile Glu Asn Thr Tyr Tyr Gly Glu
 515 520 525
 Asn Val Phe Met Ser Gly Asn Ile Thr Ala Leu Gly Asn Trp Asp Ala
 530 535 540
 Lys Lys Gly Phe Pro Leu Thr Ala Asn Leu Tyr Thr Gln Asp Gln Asn

545		550		555		560
Leu Trp Phe Ala Ser Val Glu Phe Ile Pro Ala Gly Thr Pro Phe Glu						
		565		570		575
Tyr Lys Tyr Tyr Lys Val Glu Pro Asn Gly Asp Ile Thr Trp Glu Lys						
	580		585		590	
Gly Pro Asn Arg Val Phe Val Ala Pro Thr Gly Cys Pro Val Gln Pro						
	595		600		605	
His Ser Asn Asp Val Trp Gln Phe						
	610		615			

	<210> 3	
5	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
10	<400> 3	
	tcgcatccg tttcgcatc tatcgtgaaa cgct	34
	<210> 4	
	<211> 33	
	<212> ADN	
15	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 4	
	ccgcaaacgc tggtgaaagt aaaagatgct gaa	33
20	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador	
	<400> 5	
	agcgtttgcg gccgcgatcc	20
	<210> 6	
	<211> 21	
30	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 6	
35	ttattcggtc gaaaaggatc c	21
	<210> 7	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 7	
	atgcgtctca ctctattatc aggtg	25
	<210> 8	
45	<211> 39	

	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 8	
	acacaactgg ggatccacca tgcgtctcac tctattatc	39
	<210> 9	
	<211> 37	
	<212> ADN	
10	<213> secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 9	
	agatctcgag aagcttaaaa ctgccacacg tcgttgg	37
15		

REIVINDICACIONES

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

(a) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 91%, más preferiblemente al menos 92%, aún más preferiblemente 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%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% de identidad con el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2;

(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 91%, más preferiblemente al menos 92%, aún más preferiblemente 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%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1

2. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende o consistente en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2; o un fragmento de la misma que tiene actividad de glucoamilasa.

3. Polipéptido según la reivindicación 1, que comprende o consistente en el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.

4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el polipéptido maduro es los aminoácidos 22 a 616 de SEC ID n.º: 2.

5. Polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

6. Polinucleótido aislado según la reivindicación 5, que comprende o consistente en la SEC ID n.º: 1 o la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1.

7. Constructo de ácido nucleico o vector de expresión que comprende el polinucleótido según la reivindicación 5 o 6, operativamente enlazado a una o varias secuencias de control que dirige la producción del polipéptido en un huésped de expresión.

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

9. Célula huésped recombinante que comprende el vector de expresión recombinante según la reivindicación 8.

10. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, 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.

11. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende: (a) cultivo de una célula huésped que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

12. Composición que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

13. Uso del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para procesos de licuefacción, sacarificación y/o fermentación, preferiblemente en la conversión de almidón.

14. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para la producción de jarabe, bebida y/o un producto de fermentación.

15. Uso del polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para la elaboración de cerveza.

16. Proceso para producir un producto de licuefacción, sacarificación y/o fermentación a partir de material que contiene almidón que comprende el tratamiento del material que contiene almidón con un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

17. Proceso según la reivindicación 16, donde una alfa-amilasa se añade.

18. Proceso según la reivindicación 16 o 17, donde el tratamiento se realiza a una temperatura entre 40°C y 100°C, preferiblemente entre 65°C y 90°C, más preferiblemente entre 80°C y 85°C, y/o a un pH entre 2,0 y 7,0, preferiblemente entre pH 4,0 y pH 6,0, más preferiblemente entre pH 4,5 y pH 5,5.



Fig. 1