

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 605 235**

51 Int. Cl.:

C12N 9/54 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

C12N 9/34 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2010 PCT/US2010/058375**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2012 WO12064351**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2010 E 10795112 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2638154**

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

30 Prioridad:

08.11.2010 US 411044 P

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

13.03.2017

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (50.0%)

Krogshoejvej 36

2880 Bagsvaerd, DK y

NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

MORANT, MARC DOMINIQUE;

SASA, MIKAKO;

AYABE, KEIICHI y

COWARD-KELLY, GUILLERMO

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 605 235 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 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 [0001] La presente invención se refiere a polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos. La invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores y células huésped que comprenden los polinucleótidos al igual que métodos para producir y utilizar los polipéptidos, y al uso de glucoamilasas de la invención para la conversión de almidón para producir productos de fermentación, tales como etanol, y jarabes, tales como glucosa. La invención también se refiere a una composición que comprende una glucoamilasa de la invención.

15 Descripción de las técnicas relacionadas

[0002] Glucoamilasa (1,4-alfa-D-glucono glucohidrolasa, EC 3.2.1.3) es una enzima, que cataliza la liberación de D-glucosa a partir de las extremidades no reducidas de almidón o moléculas de oligo y polisacáridos relacionadas. Las glucoamilasas se producen por varios hongos filamentosos y levadura, con los de *Aspergillus* siendo comercialmente más importantes.

25 [0003] Comercialmente, las glucoamilasas se utilizan para convertir material amiláceo, que ya está parcialmente hidrolizado por una alfa-amilasa, en glucosa. La glucosa puede luego ser convertida directa o indirectamente en un producto de fermentación utilizando un organismo fermentador. Ejemplos de productos de fermentación comercial 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 succínico, ácido 2,5-diceto-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 utilizan también habitualmente en las industrias del alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), de los productos lácteos (por ejemplo, en la producción de yogur y queso).

35 [0004] El producto final también puede ser un 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 por glucosa y fructosa. Esta mezcla, o una mezcla además enriquecida con fructosa, es el jarabe de maíz rico en fructosa (HFCS, por su sigla en inglés) usado más frecuentemente comercializado en todo el mundo.

40 [0005] Es un objeto de la presente invención proporcionar polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos y que proporcionan un rendimiento elevado en los procesos de producción de productos de fermentación, tales como los procesos de producción de etanol, incluyendo procesos de fermentación de etanol de fase única a partir de almidón crudo (o no cocido) no gelatinizado.

45 [0006] Uniprot: BOCVJ1 divulga un polipéptido de *Laccaria bicolor* y WO 2006/069289 describe una glucoamilasa de *Trametes cingulata*, que se demuestra que proporciona un alto rendimiento de etanol en un proceso de producción de etanol, incluyendo un proceso de fermentación de etanol de una fase a partir de almidón crudo no gelatinizado.

Resumen de la invención

50 [0007] Polipéptidos producidos por el hongo *Nigrofomes* y que tienen actividad de glucoamilasa se han identificado y caracterizado. En una forma de realización particularmente, el *Nigrofomes sp.* es seleccionado del grupo que consiste en *Nigrofomes castaneus* y *Nigrofomes melanoporus*.

55 [0008] Por consiguiente, la presente invención se refiere en un primer aspecto a un polipéptido aislado que tiene actividad de glucoamilasa, seleccionado del grupo que consiste en: (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene preferiblemente al menos 85% de identidad con el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2; (b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad con el dominio catalítico mostrado como los aminoácidos 18 a 472 de SEC ID n.º: 2; (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1.

60 [0009] La presente invención se refiere en un segundo aspecto a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido del primer aspecto.

65

[0010] En otros aspectos, la invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos, un vector de expresión recombinante, una célula huésped recombinante, una planta transgénica, una parte de planta o célula vegetal que comprende el polinucleótido del segundo aspecto.

- 5 [0011] En otros aspectos más, la invención se refiere a un método para producir el polipéptido, usos del polipéptido y una composición que incluye una alfa-amilasa y el polipéptido.

Definiciones

10 [0012] Glucoamilasa: el término glucoamilasa (1,4-alfa-D-glucano glucohidrolasa, EC 3.2.1.3) se define como una enzima, que cataliza la liberación de D-glucosa a partir de las extremidades no reducidas de almidón o moléculas de oligo y polisacáridos relacionadas. Para fines de la presente invención, la actividad de glucoamilasa se determina según el procedimiento descrito en la sección "Materiales y métodos" más adelante.

15 [0013] Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos 20%, preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente al menos 45%, más preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 55%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 65%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, aún más preferiblemente al menos 90%, de la forma más preferible al menos 95%, e
20 incluso de la forma más preferible al menos 100% de la actividad de glucoamilasa del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2 o los polipéptidos homólogos que incluyen una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad con el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2 de preferiblemente al menos 82%, más preferiblemente al menos 83%, más preferiblemente al menos 84%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 86%, más preferiblemente al menos 87%, más preferiblemente al menos 88%, más preferiblemente al menos 89%, más
25 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 al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o incluso 100% de identidad.

30 [0014] Polipéptido aislado: el término "polipéptido aislado" como se usa aquí se refiere a un polipéptido que es aislado de una fuente. Preferiblemente, el polipéptido es al menos 1% puro, preferiblemente al menos 5% puro, más preferiblemente al menos 10% puro, más preferiblemente al menos 20% puro, más preferiblemente al menos 40% puro, más preferiblemente al menos 60% puro, aún más preferiblemente al menos 80% puro, y de la forma más preferible al menos 90% puro, según se determina por SDS-PAGE.

35 [0015] Polipéptido sustancialmente puro: el término "polipéptido sustancialmente puro" denota aquí una preparación de polipéptido que contiene como mucho 10%, preferiblemente como mucho 8%, más preferiblemente como mucho 6%, 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 de polipéptido con el cual está asociado de forma nativa
40 o recombinante. Por lo tanto, se prefiere que el polipéptido sustancialmente puro sea al menos 92% puro, preferiblemente al menos 94% puro, más preferiblemente al menos 95% puro, más preferiblemente al menos 96% puro, más preferiblemente al menos 96% puro, más preferiblemente al menos 97% puro, más preferiblemente al menos 98% puro, aún más preferiblemente al menos 99%, de la forma más preferible al menos 99,5% puro, e incluso de la forma más preferible 100% puro en peso del material de polipéptido total presente en la preparación.
45 Los polipéptidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura, es decir, que la preparación de polipéptido está libre esencialmente de otro material de polipéptido con el cual está asociado de forma nativa o recombinante. Esto se puede realizar, por ejemplo, preparando el polipéptido por métodos recombinantes bien conocidos o por métodos de purificación tradicional.

50 [0016] Polipéptido maduro: el término "polipéptido maduro" se refiere a 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 19 a 575 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 18 de SEC ID n.º: 2, son un péptido señal. La secuencia definida por los aminoácidos 18 a 472 de SEC ID n.º: 2
55 es el dominio catalítico. La secuencia definida por los aminoácidos 479 a 575 de SEC ID n.º: 2 es un dominio de unión al almidón.

[0017] Secuencia codificante del polipéptido maduro: el término "secuencia codificante del polipéptido maduro" se define aquí como una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad de glucoamilasa. Preferiblemente, la secuencia codificante del polipéptido maduro es las posiciones de nucleótidos 55 a
60 159,230 a 506,554 a 698,761 a 920,982 a 1720,1774 a 1869,1922 a 2070 de SEC ID n.º: 1.

[0018] Identidad: la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad".

65

[0019] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) según es implementado 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 EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y es calculado de la siguiente manera:

5
10
$$(\text{Residuos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de alineamiento} - \text{Número total de espacios en el alineamiento})$$

[0020] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias desoxirribonucleótidas es determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, *supra*) según es implementado 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 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 es calculado de la siguiente manera:

15
20
$$(\text{Desoxirribonucleótidos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud de alineamiento} - \text{Número total de espacios en el alineamiento})$$

[0021] Fragmento de polipéptido: el término "fragmento de polipéptido" se define aquí como un polipéptido que tiene un o más (varios) aminoácidos eliminados del amino y/o carboxilo término del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2; donde el fragmento tiene actividad de glucoamilasa. Preferiblemente, un fragmento contiene al menos 500 residuos de aminoácidos, más preferiblemente al menos 450 aminoácido, y de la forma más preferible al menos 400 residuos de aminoácidos, del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2. Un fragmento particular es la secuencia definida por los aminoácidos 18 a 472 de SEC ID n.º: 2 que comprenden el dominio catalítico del polipéptido de la invención.

[0022] Subsecuencia: el término "subsecuencia" se define aquí como una secuencia de nucleótidos que tiene uno o más (varios) nucleótidos eliminados del extremo 5' y/o 3' de la secuencia de codificación del polipéptido maduro de SEC ID n.º 1 donde la subsecuencia codifica un fragmento de polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa. Preferiblemente, una subsecuencia contiene al menos 1.500 nucleótidos, más preferiblemente al menos 1.400 nucleótidos, y de la forma más preferible al menos 1.200 nucleótidos de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1.

[0023] Variante alélica: el término "variante alélica" denota aquí cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge naturalmente a través de la mutación, y puede dar como resultado polimorfismo dentro de poblaciones. Las mutaciones génicas 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.

[0024] Polinucleótido aislado: el término "polinucleótido aislado" como se usa aquí se refiere a un polinucleótido que es aislado a partir de una fuente. Preferiblemente, 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, según se determina por electroforesis de agarosa.

[0025] Polinucleótido sustancialmente puro: el término "polinucleótido sustancialmente puro" como se usa aquí se refiere a una preparación de polinucleótidos libre de otros nucleótidos extraños o no deseados y en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteína genéticamente modificada. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como mucho 10%, preferiblemente como mucho 8%, más preferiblemente como mucho 6%, más preferiblemente como mucho 5%, más preferiblemente como mucho 4%, más preferiblemente como mucho 3%, 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 de polinucleótido con el cual está asociado de forma nativa o recombinante.

Un polinucleótido sustancialmente puro puede, sin embargo, incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural y, 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%, 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 de polinucleótido está libre esencialmente de otro material de polinucleótido con el cual está asociado de forma nativa o recombinante. Los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, ADNc, ARN, semisintético, sintético, o cualquier combinación de los mismos.

[0026] Secuencia codificante: 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 se determinan generalmente 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 extremidades 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.

[0027] ADNc: el término "ADNc" se refiere a una molécula de ADN que se pueden preparar por transcripción inversa de una molécula de ARNm madura, empalmada, obtenida a partir de una célula eucariota. ADNc carece de secuencias de intrones que están normalmente presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcripto de ARN primario inicial es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de pasos antes de aparecer como ARNm empalmado maduro. Estos pasos incluyen la eliminación de secuencias de intrones por un proceso llamado empalme. El ADNc derivado de ARNm carece, por lo tanto, de cualquier secuencia de intrones.

[0028] Constructo de ácidos nucleicos: el término "constructo de ácidos nucleicos" se refiere a una molécula de ácido nucleico, bien uni- o bicatenaria, que es aislada de un gen de origen natural o que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de manera que no existirían de otro modo en la naturaleza o que es sintético. El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0029] Secuencias de control: el término "secuencias de control" se refiere a todos los componentes necesarios para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o foránea de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o nativa o foránea entre sí. Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, una secuencia de poliadenilación líder, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal y terminador de transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional. Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlaces para fines de introducir sitios de restricción específicos que facilitan el ligamiento de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

[0030] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" denota aquí una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia de codificación de la secuencia de polinucleótidos de modo que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

[0031] Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitado a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0032] 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.

[0033] Célula huésped: el término "célula huésped", como se utiliza en este caso, incluye cualquier tipo de célula que sea susceptible de transformación, transfección, transducción y similar con un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención.

[0034] Modificación: el término "modificación" se refiere aquí a cualquier modificación química del polipéptido que consiste en el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2; al igual que la manipulación genética del ADN que codifica tal polipéptido. La modificación puede ser una sustitución, una eliminación y/o una inserción de uno o más (varios) aminoácidos al igual que reemplazos de uno o más (varias) cadenas laterales de aminoácidos.

[0035] Variante: el término "variante" se refiere a un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa que incluye una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o eliminación de uno o más (varios) residuos de aminoácidos en una o más (varias) posiciones. Una sustitución se refiere a un reemplazo de un aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una eliminación se refiere a una retirada de un aminoácido que ocupa una posición; y una inserción se refiere a añadir 1-3 aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa

[0036] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que incluyen una secuencia de aminoácidos que tienen un grado de identidad con el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2 de al menos 85%, más preferiblemente al menos 86%, más preferiblemente al menos 87%, más preferiblemente al menos 88%, más

preferiblemente al menos 89%, 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 al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o incluso 100% de identidad, que tiene actividad de glucoamilasa. En una forma de realización particular, los polipéptidos tienen una secuencia de aminoácidos que difiere en diez aminoácidos, preferiblemente en cinco aminoácidos, más preferiblemente en cuatro aminoácidos, aún más preferiblemente en tres aminoácidos, de la forma más preferible en dos aminoácidos, e incluso de la forma más preferible en un aminoácido del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.

[0037] Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2 o una variante alélica de la misma; o un fragmento del mismo que tiene actividad de glucoamilasa. Preferiblemente, el polipéptido 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 o una variante alélica del mismo; o un fragmento del mismo que tiene actividad de glucoamilasa. En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2 o una variante alélica del mismo; o un fragmento del mismo que tiene actividad de glucoamilasa. En otro aspecto preferido, el polipéptido consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n.º: 2.

[0038] En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de glucoamilasa que son codificados por polinucleótidos que hibridan bajo preferiblemente condiciones de astringencia muy bajas, más preferiblemente condiciones de astringencia baja, más preferiblemente condiciones de astringencia media, más preferiblemente condiciones de astringencia medio alta, aún más preferiblemente condiciones de astringencia muy alta, y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy alta con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en SEC ID n.º: 1, (iii) una subsecuencia de (i) o (ii), o (iv) una cadena complementaria en toda su longitud de (i); (ii), o (iii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, New York). Una subsecuencia de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 contiene al menos 100 nucleótidos contiguos o preferiblemente al menos 200 nucleótidos contiguos. Además, la subsecuencia puede codificar un fragmento de polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa. Preferiblemente, la cadena complementaria es la cadena complementaria en toda su longitud de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1.

[0039] 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 puede usar para diseñar sondas de ácido nucleico para identificar y clonar polipéptidos de codificación de ADN que tienen actividad de glucoamilasa a partir de cepas de géneros o especies diferentes 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, después de procedimientos de transferencia de Southern estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente en el mismo. Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían ser 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 sea al menos 100 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la sonda de ácidos nucleicos puede ser 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 larga incluso pueden ser utilizadas, por ejemplo, sondas de ácido nucleico que son preferiblemente al menos 600 nucleótidos, más preferiblemente al menos 700 nucleótidos, aún más preferiblemente al menos 800 nucleótidos, o de la forma más preferible al menos 900 nucleótidos de longitud. Tanto sondas de ADN como de ARN pueden usarse. Las sondas son típicamente marcadas para la detección del gen correspondiente (por ejemplo, con ³³P, ³²P, ³H, ³⁵S, biotina o avidina). Tales sondas están abarcadas por la presente invención.

[0040] Una genoteca de ADN genómico o ADNc obtenido a partir de tales otras cepas se puede, por lo tanto, seleccionar para ADN que hibridiza con las sondas anteriormente descritas y codifica un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa. ADN genómico u otro de tal 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 SEC ID n.º: 1; o una subsecuencia de la misma; el material portador es preferiblemente usado en una transferencia de Southern.

[0041] 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 ADNc contenida en SEC ID n.º: 1; su cadena complementaria en toda su longitud; o una subsecuencia de la misma; bajo condiciones de astringencia de muy baja a altísima. Moléculas a las que la sonda de ácidos nucleicos hibridiza bajo estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, película radiográfica.

[0042] Preferiblemente, 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 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 SEC ID n.º: 1.

[0043] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, condiciones de astringencia de muy baja a altísima son definidas como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3% SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado y bien 25% de formamida para astringencias muy bajas y bajas, 35% de formamida para astringencias medias y medio altas, o 50% de formamida para astringencias altas y muy altas, después de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas óptimamente.

[0044] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador es finalmente lavado tres veces cada uno durante 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2% de SDS preferiblemente a 45°C (astringencia muy baja), más preferiblemente a 50°C (astringencia baja), más preferiblemente a 55°C (astringencia media), más preferiblemente a 60°C (astringencia medio alta), aún más preferiblemente a 65°C (astringencia alta), y de la forma más preferible a 70°C (astringencia muy alta).

[0045] Para sondas cortas que son de aproximadamente 15 nucleótidos a aproximadamente 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia son definidas como prehibridación, hibridación y post-hibridación de lavado en aproximadamente 5°C a aproximadamente 10°C por debajo de la 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 después de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas óptimamente.

[0046] Para sondas cortas que son 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 a 5°C a 10°C por debajo de la T_m calculada.

[0047] En un aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de glucoamilasa codificada por polinucleótidos que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que tienen un grado de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 de 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 al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, que codifica un polipéptido activo. Véase la sección polinucleótidos del documento.

[0048] La presente divulgación también se refiere a variantes artificiales que comprenden una sustitución, eliminación y/o inserción de uno o más (o varios) aminoácidos del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2. Preferiblemente, los cambios de aminoácidos son de una naturaleza menor, esto es sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que significativamente no afectan al plegado y/o la actividad de la proteína; deleciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeña 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 epítopo antigénico o un dominio de unión.

[0049] Ejemplos de sustituciones conservadoras están en el grupo de los aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y son descritas, por ejemplo, por H. Neurath and R.L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, New 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.

[0050] Además de los 20 aminoácidos estándar, aminoácidos no estándar (tales como 4-hidroxiprolina, lisina de 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y alfa-metil serina) se pueden sustituir por residuos de aminoácidos de un polipéptido de tipo salvaje. Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no se codifican por el código genético, y aminoácidos no naturales se pueden sustituir por residuos de aminoácidos. "Aminoácidos no naturales" han sido modificados después de síntesis de proteína, y/o tienen una estructura química en su(s) cadena(s) lateral(es) diferentes de los aminoácidos de estándar. Los aminoácidos no naturales pueden ser químicamente sintetizados, y preferiblemente, están disponibles comercialmente, e incluyen ácido pipercolico, ácido carboxílico de tiazolidina, dehidroprolina, 3- y 4-metilprolina y 3,3-dimetilprolina.

[0051] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físico químicas de los polipéptidos son alteradas. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo y similares.

[0052] Aminoácidos esenciales en el polipéptido original pueden ser identificados 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 técnica anterior, mutaciones de alanina únicas se introducen en cada residuo de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de glucoamilasa para identificar residuos de aminoácidos que son críticas 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 puede también ser determinado por análisis físico de estructura, como se determina por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente 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 aminoácidos esenciales también pueden ser inferidas a partir del análisis de identidades con polipéptidos que están relacionados con un polipéptido según la invención.

[0053] Sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples, deleciones y/o inserciones pueden ser hechas y evaluadas usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o redistribución, seguidas de un procedimiento de selección pertinente, tal como los descritos por Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625.

Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman *et al.*, 1991, Biochem. 30: 10832-10837; Patente de EE.UU. 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).

[0054] Métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con métodos de selección automatizados de alto rendimiento para detectar actividad de polipéptidos mutagenizados clonados expresados por células huésped (Ness *et al.*, 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar a partir de las células huésped y secuenciar rápidamente utilizando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.

[0055] El número total de sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones del polipéptido maduro, tales como aminoácidos del 19 al 575 de SEC ID n.º: 2, o el dominio catalítico, tales como los aminoácidos del 18 al 472 de SEC ID n.º: 2 es 10, preferiblemente 9, más preferiblemente 8, más preferiblemente 7, más preferiblemente como mucho 6, más preferiblemente 5, más preferiblemente 4, aún más preferiblemente 3, de la forma más preferible 2 e incluso de la forma más preferible 1.

Fuentes de polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa

[0056] Un polipéptido de la presente invención puede ser obtenido a partir de microorganismos de cualquier género. Para fines de la presente invención, el término "obtenido a partir de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente dada se refiere a que el polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos es producido por la fuente o por una cepa donde la secuencia de nucleótidos de la fuente ha sido insertada. Preferiblemente, el polipéptido obtenido a partir de una fuente dada es secretado extracelularmente.

[0057] Un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa de la presente invención es, en una forma de realización, un polipéptido de *Nigrofoves sp.* que tiene actividad de glucoamilasa. En una forma de realización particular el *Nigrofoves sp.* se selecciona del grupo que consiste en *Nigrofoves castaneus* y *Nigrofoves melanoporos*.

[0058] Se entiende que para las especies anteriormente mencionadas la invención abarca tanto los estados perfectos como los imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especie por el que son conocidos. Expertos en la técnica fácilmente reconocerán la identidad de equivalentes apropiados.

[0059] Cepas de estas especies son accesibles fácilmente para el público en un número de colecciones de cultivo, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

[0060] Además, tales polipéptidos se pueden identificar y obtener a partir de otras fuentes incluyendo microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas mencionadas arriba. Técnicas para el aislamiento de microorganismos de hábitats naturales se conocen en la técnica. El polinucleótido puede luego obtenerse por selección de forma similar de una genoteca de ADNc o genómica de tal microorganismo. Una vez que una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido ha sido detectado con la(s) sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que son bien conocidas por los expertos en la materia en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

[0061] Polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos divisibles de fusión donde otro polipéptido se fusiona en el N-termino o el C-termino del polipéptido o un fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado se produce por la fusión de una secuencia de nucleótidos (o una porción de la misma) que codifica otro polipéptido con una secuencia de nucleótidos (o una porción de la misma) de la presente invención.

Técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen ligamiento de las secuencias codificantes 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.

5 [0062] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión. En la secreción de la proteína de fusión, el sitio es dividido liberando el polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa 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: 568-76; Svetina *et al.*, 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward *et al.*, 1995, Biotechnology 13: 498-503; and Contreras *et al.*, 1991, Biotechnology 9: 378-381), un sitio Ile-(Glu o Asp)-Gly-Arg, que es dividido por una proteasa de Factor Xa después del residuo de arginina (Eaton *et al.*, 1986, Biochem. 25: 505-512); un sitio Asp-Asp-Asp-Asp-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 de 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 de Gin (Stevens, 2003, *supra*); y un sitio Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro, que es dividido por una forma genéticamente modificada de proteasa de rinovirus de humano 3C después del Gin (Stevens, 2003, *supra*).

20 Polinucleótidos

[0063] 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.

25 [0064] Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en SEC ID n.º: 1. En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1. 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.

35 [0065] La presente invención también se refiere a polinucleótidos mutantes que comprenden o consisten en al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, donde la secuencia de nucleótidos mutante codifica el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2.

40 [0066] 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 puede ser efectuada, 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, New York. Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico tales como reacción en cadena de la ligasa (LCR), transcripción activada ligada (LAT) y amplificación basada en secuencias de nucleótidos (NASBA) pueden ser utilizados. Los polinucleótidos se pueden clonar a partir de una cepa de *Penicillium*, u otro 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.

50 [0067] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que tienen un grado de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 de 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 al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o incluso 100% de identidad, que codifica un polipéptido activo.

55 [0068] La modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de polipéptidos sustancialmente similar al polipéptido. El término "sustancialmente similar" al polipéptido se refiere a formas que no se produzcan de forma natural del polipéptido. Estos polipéptidos pueden diferir en alguna manera diseñada del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes artificiales que difieren en la actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo o similar. La secuencia variante se puede construir basándose en la secuencia de nucleótidos presentada como la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID 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 corresponde 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 sustituciones de nucleótidos, véase, por ejemplo, Ford *et al.*, 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

[0069] Será aparente para los expertos en la técnica que tales sustituciones se pueden hacer fuera de las regiones críticas para la función de la molécula y aún dar 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 técnica anterior, mutaciones se introducen 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 son críticos para la actividad de la molécula. Sitios de interacción sustrato-enzima también pueden ser determinados por análisis de la estructura tridimensional según 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*).

[0070] La presente divulgación también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican polipéptidos de la presente invención, que hibridan bajo condiciones de astringencia muy baja, condiciones de astringencia baja preferiblemente, más preferiblemente condiciones de astringencia media, condiciones de astringencia medio altas más preferiblemente, aún más preferiblemente condiciones de astringencia alta, y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy alta con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en SEC ID n.º: 1, o (iii) una cadena complementaria en toda su longitud de (i) o (ii); o variantes alélicas y subsecuencias de las mismas (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*), tal y como se define aquí. Preferiblemente, la cadena complementaria es la cadena complementaria en toda su longitud de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1.

[0071] La presente divulgación también se refiere a polinucleótidos aislados obtenidos por (a) hibridación de una población de ADN bajo condiciones de astringencia muy baja, medio baja, medio alta, alta o muy alta con (i) la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en SEC ID n.º: 1, o (iii) una cadena complementaria en toda su longitud de (i) o (ii); y (b) aislamiento del polinucleótido de hibridación, que codifica un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa. Preferiblemente, la cadena complementaria es la cadena complementaria en toda su longitud de la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1.

Enzimas híbridas

[0072] La presente divulgación también se refiere a enzimas híbridas que comprenden un dominio catalítico que tiene actividad enzimática (por ejemplo, actividad enzimática de degradación de almidón, tal como actividad de alfa-amilasa, amilopululanasa, beta-amilasa, CGTasa, glucoamilasa, isoamilasa, amilasa maltogénica y pululanasa), y un módulo de unión a carbohidratos (CBM). La enzima híbrida puede comprender además un enlazador.

[0073] El híbrido se puede producir por la fundición de una primera secuencia de ADN que codifica un dominio catalítico y una segunda secuencia de ADN que codifica un módulo de unión a carbohidratos, o el híbrido se puede producir como un gen completamente sintético basado en conocimiento de las secuencias de aminoácidos de CBMs, enlaces y dominios catalíticos adecuados.

[0074] El término "enzima híbrida" (también denominado "proteína de fusión", "híbrido", "polipéptido híbrido" o "proteína híbrida") se utiliza en este caso para caracterizar los polipéptidos híbridos de la invención que comprenden un módulo catalítico que tiene actividad enzimática (por ejemplo, actividad enzimática de degradación de almidón, tal como actividad de alfa-amilasa, amilopululanasa, beta-amilasa, CGTasa, glucoamilasa, isoamilasa, amilasa maltogénica y pululanasa) y un módulo de unión a carbohidratos donde el dominio catalítico y el módulo de unión a carbohidratos son derivados de distintas fuentes. El término "fuente" incluye, pero no está limitado a, una enzima original o una variante de la misma, por ejemplo, una amilasa o glucoamilasa, u otra actividad catalítica que comprende un módulo catalítico adecuado y/o un CBM adecuado y/o un enlazador adecuado. Sin embargo el CBM también se puede derivar de un polipéptido que no tiene ninguna actividad catalítica. El dominio catalítico y el módulo de unión a carbohidratos se puede derivar de la misma cepa microbiana, de cepas dentro de las mismas especies, de especies cercanamente relacionadas u organismos menos relacionados. Preferiblemente el dominio catalítico y el módulo de unión a carbohidratos de los híbridos están derivados de distintas fuentes, por ejemplo, de distintas enzimas de la misma cepa y/o especies, o por ejemplo, de cepas dentro de especies diferentes.

[0075] En un aspecto, la enzima híbrida comprende el CBM (conocido también como un dominio de unión a carbohidratos o CBD) según la invención y un dominio catalítico. El dominio catalítico es, en una forma de realización particular, un dominio catalítico de glucoamilasa.

Constructos de ácidos nucleicos

[0076] 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 (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.

5 [0077] Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la presente invención se puede manipular en una variedad de formas para proporcionar expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia de polinucleótidos antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar las secuencias polinucleótidas utilizando métodos de ADN recombinante se conocen bien en la técnica.

10 [0078] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, una secuencia de nucleótidos que es reconocida por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestre actividad transcripcional en la célula huésped de elección incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y se puede obtener a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares ya sean homólogos o heterólogo de la célula huésped.

15 [0079] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son los promotores obtenidos 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* (*glaA*), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, al igual que el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

20 [0080] En un huésped de levadura, promotores útiles se obtienen 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.

35 [0081] 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' término 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.

40 [0082] Terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos a partir de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

45 [0083] Terminadores preferidos para células huésped de levadura son obtenidos 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*.

50 [0084] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que sea importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está operativamente enlazada al 5' 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.

55 [0085] Líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

60 [0086] Líderes adecuados para células huésped de levadura son obtenidos 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).

65

[0087] 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 transcrita, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina para ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped de elección se puede utilizar en la presente invención.

[0088] Secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas son obtenidas 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*.

[0089] Secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura son descritas por Guo and Sherman, 1995, Molecular Cellular Biology 15: 5983-5990.

[0090] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante del péptido señal que codifica para una secuencia de aminoácidos enlazada al amino terminal de un polipéptido y que dirige 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 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 es foráneo de la secuencia codificante. La secuencia codificante del péptido señal foráneo se puede requerir cuando la secuencia codificante no contiene de forma natural una secuencia codificante del péptido señal. Alternativamente, la secuencia codificante del péptido señal foráneo puede sencillamente reemplazar 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.

[0091] Secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas 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 *Humicola lanuginosa*.

[0092] 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 los que favorecen 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*, *xyl* y *trp*. En la levadura, el sistema ADH2 o sistema GAL1 pueden ser utilizados. En hongos filamentosos, el promotor de TAKA alfa-amilasa, promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* se pueden utilizar como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son las que permiten amplificación génica. En sistemas eucarióticos, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato, y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido estaría operativamente enlazada con la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

[0093] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor, y señales de parada transcripcionales y traduccionales. Los diferentes ácidos nucleicos y secuencias de control descritos aquí se pueden unir para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más (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 la inserción de la secuencia de nucleótidos o un constructo de ácidos nucleicos que comprende la secuencia en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante esté operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0094] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o virus) que puede ser convenientemente sometido 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 introducido. Los vectores puede ser plásmidos lineales o cerrados circulares.

[0095] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica con el cromosoma(s) en el que ha sido integrado. Además, un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contengan el ADN total que va a ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón, puede ser utilizado.

[0096] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o más (varios) marcadores seleccionables que permiten la fácil selección de células transformadas, transfectada, 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.

[0097] Marcadores seleccionables para su uso en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *bar* (fosfonitricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-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*.

[0098] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen un(unos) elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0099] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede basarse en 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 en el(los) cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener preferiblemente un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10.000 pares de bases, preferiblemente de 400 a 10.000 pares de bases, y de la forma más preferible de 800 a 10.000 pares de bases, que tienen un grado alto de identidad con la secuencia objetivo correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que sea homóloga de la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos no codificantes o codificantes. Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no homóloga.

[0100] 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 funciona en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador plásmido" se define aquí como una secuencia de nucleótidos que permite que un plásmido o vector replique *in vivo*.

[0101] 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). Aislamiento del gen AMA1 y construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se pueden obtener según los métodos descritos en la WO 00/24883.

[0102] 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 lo tanto copias adicionales del polinucleótido, se puede seleccionar mediante el cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0103] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinante de la presente invención son conocidos por un experto en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Células huésped

[0104] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que incluyen un polinucleótido aislado de la presente invención, que se usan ventajosamente en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosomal autorreplicante como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no sea idéntico a la célula madre debido a mutaciones que se produzcan durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá, en gran parte, del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

[0105] 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.

- 5 [0106] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria gram-positiva o bacteria gram-negativa. Bacterias gram-positivas incluyen, pero no se limitan a, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Clostridium*, *Geobacillus* y *Oceanobacillus*. Bacterias gram negativas incluyen, pero no se limitan a, *E. coli*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Ilyobacter*, *Neisseria* y *Ureaplasma*.
- 10 [0107] La célula huésped también puede ser un eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta o fúngica.
- 15 [0108] Preferiblemente, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongos", como se utilizan en este caso, incluye los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota (como definidos por Hawkswort *et al.*, en, 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 Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*, página 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*).
- 20 [0109] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura", como se utiliza en este caso, incluye levadura ascoesporogénea (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).
- 25 [0110] En un aspecto aún más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.
- 30 [0111] En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.
- 35 [0112] 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 aeróbico estrictamente. 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.
- 40 [0113] 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*, *Tolypocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.
- 45 [0114] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.
- 60 [0115] Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplasto, transformación de los protoplastos y regeneración de la pared celular de manera conocida de por sí. Procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y de *Trichoderma* son descritas en la EP 0238023 y en Yelton *et al.*, 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474. Métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* son descritos por Malardier *et al.*, 1989, Gene 78: 147-156, y la WO 96/00787. La levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker and Guarente,
- 65

In Abelson, J.N. and Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology 194: 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito *et al.*, 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

5 Métodos de producción

[0116] 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. Preferiblemente, la célula es del género *Nigrofores*. En un aspecto más preferido, la célula es de la especie *Nigrofores castaneus* o *Nigrofores melanoporus*. 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 recombinante, como se describe en este caso, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

[0117] 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 recombinante bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido, donde la célula huésped comprende una secuencia de nucleótidos mutante que tiene al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.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.

[0118] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar por cultivo en matraz de agitación, y fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentaciones de lote continuo, lote alimentado o estado sólido) en laboratorio o fermentadores industriales realizadas en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan al polipéptido ser expresado y/o aislado. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Medios adecuados están disponibles 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.

[0119] Los polipéptidos se pueden detectar utilizando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, formación de un producto enzimático o desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, un ensayo enzimático se puede utilizar para determinar la actividad del polipéptido como se describe en este caso.

[0120] 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.

[0121] Los polipéptidos de la presente invención se pueden purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica incluyendo, pero no limitados a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (véase, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson and Lars Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puro.

50 Plantas

[0122] La presente divulgación también se refiere a plantas, por ejemplo, una planta transgénica, parte de planta, o célula vegetal, que incluye un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido que tiene actividad de glucoamilasa de la presente invención para expresar y producir el polipéptido en cantidades recuperables. El polipéptido se puede recuperar a partir 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.

[0123] 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 (mazorca).

[0124] Ejemplos de plantas dicotiledóneas son tabaco, leguminosas, tales como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisante, judía y semilla de soja, y plantas crucíferas (familia Brassicaceae), tales como coliflor, semilla de colza y el organismo de modelo cercanamente relacionado *Arabidopsis thaliana*.

[0125] 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, mesofilo, parénquima, tejidos vasculares, meristemos. 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 aislada para facilitar la utilización de la invención son también considerados partes de planta, por ejemplo, embriones, endospermas, aleurona y revestimientos de semillas.

[0126] También se incluyen dentro del campo de la presente divulgación los descendientes de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

[0127] La planta transgénica o 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 la incorporación de uno o más (varios) constructos de expresión que codifican un polipéptido de la presente invención en el genoma huésped de la planta o genoma de cloroplasto y propagando la planta o célula vegetal modificada resultante en una planta transgénica o célula vegetal.

[0128] 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 con 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 ha sido integrado y secuencias de ADN necesarias para la introducción del constructo en la planta en cuestión (esto depende del método de introducción de ADN que se va a usar).

[0129] La elección de secuencias reguladoras, tales como secuencias promotoras y terminadoras y opcionalmente secuencias de señal o 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 ser previsto para un tejido específico o parte de planta tal como semillas u hojas. Las secuencias reguladoras son, por ejemplo, descritas por Tague *et al.*, 1988, *Plant Physiology* 86: 506.

[0130] Para expresión constitutiva, el promotor de 35S-CaMV, de ubiquitina-1 de maíz y 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 sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata y frutas (Edwards & Coruzzi, 1990, *Ann. Rev. Genet.* 24: 275-303) o de tejidos sumidero metabólicos tales como meristemos (Ito *et al.*, 1994, *Plant Mol. Biol.* 24: 863-878), un promotor específico de semilla como el promotor de glutelina, prolamina, globulina o albúmina de arroz (Wu *et al.*, 1998, *Plant and Cell Physiology* 39: 885-889), un promotor de *Vicia faba* de la legúmina B4 y el gen de proteína de semilla desconocido de *Vicia faba* (Conrad *et al.*, 1998, *Journal of Plant Physiology* 152: 708-711), un promotor de una proteína del cuerpo oleaginoso 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 (Kyoizuka *et al.*, 1993, *Plant Physiology* 102: 991-1000), el promotor del gen de la adenina metiltransferasa del virus de *Chlorella* (Mitra and Higgins, 1994, *Plant Molecular Biology* 26: 85-93), o el promotor del gen *aldP* de arroz (Kagaya *et al.*, 1995, *Molecular and General Genetics* 248: 668-674), o un promotor inducible por daño como el promotor de patata *pin2* (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 inducidos por sustancias aplicadas exógenamente que activan el promotor, por ejemplo, etanol, estrógenos, hormonas vegetales tal como etileno, ácido abscísico y ácido giberélico, y metales pesados.

[0131] 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 es colocado 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.

[0132] El gen marcador seleccionable y cualquiera de las otras partes del constructo de expresión se pueden elegir de los disponibles en la técnica.

[0133] 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 partículas, transformación biolística y electroporación (Gasser *et al.*, 1990, *Science* 244: 1293; Potrykus, 1990, *Bio/Technology* 8: 535; Shimamoto *et al.*, 1989, *Nature* 338: 274).

[0134] 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 pueden usarse para la transformación de monocotiledóneas, aunque otros métodos de transformación son frecuentemente usados para estas plantas. Actualmente, el método de elección para generar monocotiledóneas transgénicas es el bombardeo de partículas (oro microscópico o partículas de tungsteno recubiertas con ADN de transformación) de callos embriogénicos 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 transformar monocotiledóneas se basa en transformación de protoplasto como se describe en Omirulleh *et al.*, 1993, Plant Molecular Biology 21: 415-428.

[0135] Tras la transformación, los transformantes que tienen incorporado el constructo de expresión se seleccionan y regeneran en plantas enteras según métodos bien conocidos en la técnica. Frecuentemente, el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes de selección bien durante la regeneración o en las siguientes generaciones usando, por ejemplo, cotransformación con dos constructos de T-ADN separados o escisión específica de sitio del gen de selección por una recombinasa específica.

[0136] 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 que tiene actividad de glucoamilasa de la presente invención bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

Composiciones

[0137] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención. Preferiblemente, las composiciones se enriquecen con tal polipéptido. El término "enriquecido" indica que la actividad de glucoamilasa de la composición ha sido aumentada, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1,1.

[0138] La composición puede comprender un polipéptido de la presente invención como el componente enzimático principal, por ejemplo, una composición monocomponente. Alternativamente, la composición puede comprender múltiples actividades enzimáticas, 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, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasas. La(s) enzima(s) adicional(es) puede(n) ser producida(s), por ejemplo, por un microorganismo del género *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *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*.

[0139] Las composiciones de polipéptido se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden ser en forma de un líquido o una composición seca. Por ejemplo, la composición de polipéptido puede ser en forma de un granulado o un microgranulado. El polipéptido que se va a incluir en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

[0140] Más adelante se dan ejemplos de usos preferidos de las composiciones de polipéptido de la invención. La dosificación de la composición de polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las que la composición se usa se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

Combinación de glucoamilasa y alfa-amilasa ácida

[0141] Según este aspecto de la invención una glucoamilasa de la invención se puede combinar con una alfa-amilasa, preferiblemente alfa-amilasa ácida en una proporción de entre 0,3 y 5,0 AFAU/AGU. Más preferiblemente la proporción entre actividad de alfa-amilasa ácida y actividad de glucoamilasa es al menos 0,35, al menos 0,40, al menos 0,50, al menos 0,60, al menos 0,7, al menos 0,8, al menos 0,9, al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,85, o incluso al menos 1,9 AFAU/AGU. Sin embargo, la proporción entre actividad de alfa-amilasa ácida y actividad de glucoamilasa debería preferiblemente ser menos de 4,5, menos de 4,0, menos de 3,5, menos de 3,0, menos de 2,5, o incluso menos de 2,25 AFAU/AGU. En AUU/AGI las actividades de alfa-amilasa ácida y glucoamilasa están preferiblemente presentes en una proporción de entre 0,4 y 6,5 AUU/AGI. Más preferiblemente la proporción entre actividad de alfa-amilasa ácida y actividad de glucoamilasa es al menos 0,45, al menos 0,50, al menos 0,60, al menos 0,7, al menos

0,8, al menos 0,9, al menos 1,0, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2,0, al menos 2,1, al menos 2,2, al menos 2,3, al menos 2,4, o incluso al menos 2,5 AUU/AGI. Sin embargo, la proporción entre actividad de alfa-amilasa ácida y actividad de glucoamilasa es preferiblemente menos de 6,0, menos de 5,5, menos de 4,5, menos de 4,0, menos de 3,5, o incluso menos de 3,0 AUU/AGI.

[0142] La composición anterior es adecuada para su uso en un proceso de conversión de almidón mencionado más adelante para producir jarabe y productos de fermentación, tal como etanol.

[0143] Más adelante se dan ejemplos de usos preferidos de las composiciones de polipéptido de la invención. La dosificación de la composición de polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las que la composición se usa se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

Usos

[0144] La presente invención se dirige también a procesos/métodos para utilizar los polipéptido que tienen actividad de glucoamilasa de la invención.

[0145] Usos según la invención incluyen conversión de almidón en, por ejemplo, jarabe y productos de fermentación, incluyendo etanol y bebidas. Ejemplos de procesos donde una glucoamilasa de la invención se puede usar incluyen aquellos descritos en la WO 92/20777, WO 03/066816, WO 03/066826, WO 2004/081193 y WO 2004/080923, que son por la presente todos incorporados por referencia.

Producción de productos de fermentación

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

[0146] En este aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación, especialmente etanol, a partir de material que contiene almidón, este procedimiento incluye un paso de licuefacción y pasos de sacarificación y fermentación realizados consecutivamente o simultáneamente.

[0147] La invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye las etapas de:

- (a) licuefacción de material que contiene almidón; preferiblemente utilizando una alfa-amilasa
- (b) sacarificación del material licuado obtenida en la etapa (a) utilizando una glucoamilasa de la invención; y
- (c) fermentación del material sacarificado utilizando un organismo fermentador.

[0148] El producto de fermentación, tal como especialmente etanol, puede opcionalmente ser recuperado después de la fermentación, por ejemplo, por destilación. Materias primas que contienen almidón adecuadas se enumeran en la sección "Materiales que contienen almidón" más abajo. Enzimas contempladas se enumeran en la sección de "Enzimas" más abajo. La licuefacción se lleva a cabo preferiblemente en presencia de una alfa-amilasa. La fermentación se realiza preferiblemente en presencia de levadura, preferiblemente una cepa de *Saccharomyces*. Organismos fermentadores adecuados se enumeran en la sección "Organismos fermentadores" más abajo. En formas de realización preferidas las etapas (b) y (c) se realizan consecutivamente o simultáneamente (es decir, como un proceso de SSF).

[0149] En una forma de realización particular, el proceso de la invención comprende además, antes de la etapa (a), las etapas de:

- x) reducir el tamaño de partícula del material que contiene almidón, preferiblemente por fresado; y
- y) formar un lodo que comprende el material que contiene almidón y agua.

[0150] El lodo acuoso puede contener de 10-40 % en peso, preferiblemente 25-35 % en peso de material que contiene almidón. El lodo se calienta por encima de la temperatura de gelatinización y la alfa-amilasa, preferiblemente alfa-amilasa bacteriana y/o fúngica ácida, se puede adicionar para iniciar licuefacción (diluyendo). El lodo se puede cocer a chorro, en una forma de realización, para gelatinizar adicionalmente el lodo antes de ser sometido a una alfa-amilasa en la etapa (a) de la invención.

[0151] Más específicamente, la licuefacción se puede realizar como un proceso de lodo caliente de tres pasos. El lodo se calienta hasta entre 60-95°C, preferiblemente 80-85°C, y la alfa-amilasa se añade para iniciar la licuefacción (diluyendo). Luego el lodo puede ser cocido por chorro a una temperatura entre 95-140°C, preferiblemente 105-125°C, durante 1-15 minutos, preferiblemente durante 3-10 minutos, especialmente alrededor de 5 minutos. El lodo se enfría a 60-95°C y más alfa-amilasa se añade para finalizar la hidrólisis (licuefacción secundaria). El proceso de licuefacción se realiza normalmente a pH 4,5-6,5, en particular a un pH entre 5 y 6. Granos enteros molidos y licuados se conocen como puré.

[0152] La sacarificación en la etapa (b) 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 solo hacer una pre-sacarificación de típicamente 40-90 minutos a una temperatura entre 30-65°C, típicamente aproximadamente 60°C, seguida de sacarificación completa durante la fermentación en un proceso de sacarificación y fermentación simultánea (proceso SSF). La sacarificación se realiza típicamente a temperaturas de 30-65°C, típicamente alrededor de 60°C, y a un pH entre 4 y 5, normalmente alrededor de pH 4,5.

[0153] El proceso más ampliamente usado en la producción del producto de fermentación, especialmente etanol, es el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF), donde no hay fase de retención para la sacarificación, lo que significa que el organismo fermentador, tal como levadura, y la(s) enzima(s) se puede adicionar juntas. La SSF puede típicamente efectuarse a una temperatura entre 25°C y 40°C, tal como entre 29°C y 35°C, tal como entre 30°C y 34°C, tal como alrededor de 32°C. Según la invención la temperatura se puede subir o bajar durante la fermentación.

[0154] Conforme a la presente invención la etapa de fermentación (c) incluye, sin limitación, el procesos de fermentación usado para producir alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H₂ y CO₂) antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B₁₂, beta-caroteno); y hormonas. Procesos de fermentación preferidos incluyen procesos de fermentación de alcohol, bien conocidos en la técnica. Los procesos de fermentación preferidos son los procesos de fermentación anaeróbica, como se conocen bien en la técnica.

Procesos para producir productos de fermentación a partir de materiales que contienen almidón no gelatinizado

[0155] En este aspecto, la invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón sin gelatinización del material que contiene almidón (es decir, material que contiene almidón crudo). En una forma de realización, solo una glucoamilasa de la invención se usa durante la sacarificación y la fermentación. Según la invención, el producto de fermentación deseado, tal como etanol, se puede producir sin licuefacción del lodo acuoso que contiene el material que contiene almidón. En una forma de realización, un proceso de la invención incluye sacarificación de material que contiene almidón (molido), por ejemplo, almidón granulado, por debajo de la temperatura de gelatinización en presencia de una glucoamilasa de la invención para producir azúcares que se pueden fermentar en el producto de fermentación deseado por un organismo fermentador adecuado.

[0156] Por consiguiente, en este aspecto la invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que comprende:

- (a) sacarificación del material que contiene almidón con una glucoamilasa madura según la invención, preferiblemente que tiene la secuencia mostrada como los aminoácidos 19 a 575 en SEC ID n.º: 2, a una temperatura inferior a la temperatura de gelatinización inicial de dicho material que contiene almidón,
- (b) fermentación utilizando un organismo fermentador.

[0157] Las etapas (a) y (b) del proceso de la invención se pueden realizar consecutivamente o simultáneamente. En una forma de realización, un lodo que comprende agua y material que contiene almidón, se prepara antes de la etapa (a).

[0158] El proceso de fermentación se puede llevar a cabo durante un periodo de 1 a 250 horas, es 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 60 a 150 horas, incluso aún más preferiblemente de 70 a 140 horas, y de la forma más preferible de 80 a 130 horas.

[0159] El término "temperatura de gelatinización inicial" significa la temperatura mínima a la que la gelatinización del almidón comienza. Almidón calentado en agua empieza a gelatinizar entre 50°C y 75°C; la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón específico, y puede ser determinada fácilmente por el experto en la materia. Así, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según la especie de planta, la variedad particular de las especies de planta al igual que con las condiciones de crecimiento. En el contexto de esta invención, la temperatura de gelatinización inicial de un material que contiene almidón dado es la temperatura en la que la birrefringencia se pierde en 5% de los gránulos de almidón utilizando el método descrito por Gorinstein and Lii, 1992, Starch/Stärke 44(12): 461-466.

[0160] Antes de la etapa (a) un lodo de material que contiene almidón, tal como almidón granulado, que tiene 10-55 % en peso de sólidos secos, 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 (backset), agua de lavado, condensado o destilado de evaporador, agua de separación lateral de destilación, u otra agua de proceso de planta de producto de fermentación. Debido a que el proceso de la invención se realiza por debajo de la temperatura de gelatinización y así ningún aumento de la viscosidad

significativo tiene lugar, niveles altos de vinaza se pueden utilizar si se desea. En una forma de realización, el lodo acuoso contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 70 % vol. de vinaza, preferiblemente 15-60 % vol. de vinaza, especialmente de aproximadamente 30 a 50 % vol. vinaza.

5 [0161] El material que contiene almidón se puede preparar reduciendo el tamaño de partícula, preferiblemente por molienda en húmedo o en seco, hasta 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente 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%, o preferiblemente al menos 99% de los sólidos secos del material que contiene almidón se convierte en un hidrolisato de almidón soluble.

[0162] El proceso de la invención se realiza a una temperatura inferior a la temperatura de gelatinización inicial. Preferiblemente la temperatura en la que la etapa (a) se realiza es entre 30-75°C, preferiblemente entre 45-60°C.

15 [0163] En una forma de realización preferida etapa (a) y etapa (b) se realizan como un proceso de sacarificación y de fermentación secuencial o simultáneo. En tal forma de realización preferida el proceso se lleva a cabo típicamente a una temperatura entre 25°C y 40°C, tal como entre 29°C y 35°C, tal como entre 30°C y 34°C, tal como alrededor de 32°C. Según la invención, la temperatura se puede subir o bajar durante la fermentación.

20 [0164] En una forma de realización, la sacarificación y fermentación simultánea se realiza de modo que el nivel de azúcar, tal como el nivel de glucosa, se mantenga en un nivel bajo tal como por debajo de 6 % en peso, preferiblemente por debajo de aproximadamente 3 % en peso, preferiblemente por debajo de aproximadamente 2 % en peso, más preferiblemente por debajo de aproximadamente 1 % en peso, aún más preferiblemente por debajo de aproximadamente 0,5 % en peso, o aún más preferiblemente 0,25 % en peso, tal como por debajo de aproximadamente 0,1 % en peso. Tales bajos niveles de azúcar se pueden conseguir utilizando sencillamente cantidades ajustadas de enzima y organismo fermentador. Una persona experta en la técnica puede fácilmente determinar qué cantidades de enzima y organismo fermentador usar. Las cantidades empleadas de enzima y organismo fermentador también se puede seleccionar para mantener bajas concentraciones de maltosa en el caldo de fermentación. Por ejemplo, el nivel de maltosa se puede mantener por debajo de aproximadamente 0,5 % en peso o debajo aproximadamente 0,2 % en peso.

[0165] El proceso de la invención se puede llevar a cabo en el rango de pH entre 3 y 7, preferiblemente de pH 3,5 a 6, o más preferiblemente de pH 4 a 5.

35 Materiales que contienen almidón

[0166] Cualquier materia prima que contiene almidón adecuada, incluyendo almidón granulado, se puede utilizar según la presente invención. La materia prima se selecciona generalmente basada en el producto de fermentación deseado. Ejemplos de materias primas que contienen almidón, adecuados para su uso en un proceso de la presente invención, incluyen tubérculos, raíces, varillas, granos enteros, granos, mazorcas, trigo, cebada, centeno, mijo, 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 residuos de madera o planta, o mezclas derivadas. Se contemplan tanto tipos cerosos como no cerosos de maíz y cebada.

45 [0167] El término "almidón granulado" significa almidón no cocido crudo, es decir, almidón en su forma natural encontrada en cereales, tubérculos o granos. El almidón se forma dentro de las células vegetales tales como gránulos ínfimos insolubles en agua. Cuando se introducen en agua fría, los gránulos de almidón pueden absorber una pequeña cantidad del líquido e hincharse. A temperaturas hasta 50°C a 75°C la hinchazón pueden ser reversible. Sin embargo, con temperaturas más altas comienza una hinchazón irreversible llamada "gelatinización". El almidón granulado que se va a procesar puede ser una calidad de almidón altamente refinado, preferiblemente al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o al menos 99,5% puro o puede ser un material que contiene almidón más crudo que comprende grano entero molido incluyendo fracciones no amiláceas tales como residuos de germen y fibras. La materia prima, tal como el grano entero, se muele para descubrir la estructura y permitir posterior tratamiento. Dos procesos de molienda se prefieren según la invención: molienda en seco y en húmedo. En la molienda en seco se muelen y usan granos enteros. La molienda en húmedo da una buena separación de germen y harina (gránulos de almidón y proteína) y se aplica frecuentemente en lugares donde el hidrolisato de almidón se usa en la producción de jarabes. Tanto la molienda en húmedo como en seco son bien conocidas en la técnica del tratamiento de almidón y se contemplan igualmente para el proceso de la invención.

60 [0168] El material que contiene almidón se reduce en tamaño de partícula, preferiblemente por molienda en húmedo o en seco, para exponer más área de superficie. En una forma de realización, el tamaño de partícula está entre 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente 0,1-0,5 mm, o de modo que al menos 30%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 70%, aún más preferiblemente al menos 90% del material que contiene almidón pase a través de una criba con una pantalla de 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente una pantalla de 0,1-0,5 mm.

Productos de fermentación

[0169] El término "producto de fermentación" significa un producto producido por un proceso que incluye un paso de fermentación que utiliza un organismo fermentador. Productos de fermentación contemplados según la invención incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H₂ y CO₂) antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B₁₂, beta-caroteno); y hormonas. En una forma de realización preferida, 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 del alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), industria lechera (por ejemplo, productos lácteos fermentados), industria del cuero e industria del tabaco. Tipos de cerveza preferida comprenden cerveza inglesa de malta, cerveza negra, cerveza porters, cerveza rubia, cerveza amarga, licores de malta, cerveza happoushu, cerveza con alto grado de alcohol, cerveza baja en alcohol, cerveza baja en calorías o cerveza ligera. Procesos de fermentación preferidos usados incluyen procesos de fermentación alcohólica, como se conocen en la técnica. Los procesos de fermentación preferidos son los procesos de fermentación anaeróbicos, como se conocen bien en la técnica.

Organismos fermentadores

[0170] "Organismo fermentador" 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 fermentadores 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 fermentadores incluyen organismos fúngicos, tales como levadura. La levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces* spp., en particular, *Saccharomyces cerevisiae*. Levadura disponible comercialmente incluye, por ejemplo, Red Star™/Lesaffre Ethanol Red (disponible de Red Star/Lesaffre, USA) FALI (disponible de Fleischmann's Yeast, una división de Burns Philp Food Inc., USA), SUPERSTART (disponible de Alltech), GERT STRAND (disponible de Gert Strand AB, Sweden) y FERMIOL (disponible de DSM Specialties).

Enzimas

Glucoamilasa

[0171] 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. El término "glucoamilasa" (1,4-alfa-D-glucano glucosidasa, EC 3.2.1.3) es una enzima, que cataliza la liberación de D-glucosa a partir de las extremidades no reducidas de almidón o moléculas de oligo y polisacáridos relacionados.

[0172] La glucoamilasa se puede adicionar en una cantidad de 0,001 a 10 AGU/g sustancia seca, preferiblemente de 0,01 a 5 AGU/g sustancia seca, tal como alrededor de 0,1, 0,3, 0,5, 1 o 2 AGU/g sustancia seca, especialmente 0,1 a 0,5 AGU/g sustancia seca o 0,02-20 AGU/g sustancia seca, preferiblemente 0,1-10 AGU/g sustancia seca.

Alfa-amilasa

[0173] La alfa-amilasa puede ser, según la invención, de cualquier origen. Se prefieren las alfa-amilasas de origen fúngico o bacteriano.

[0174] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, por ejemplo, alfa-amilasa ácida fúngica o alfa-amilasa ácida bacteriana. El término "alfa-amilasa ácida" se refiere a una alfa-amilasa (EC 3.2.1.1) que añadida en una cantidad eficaz tiene actividad óptima en un rango de pH de 3 a 7, preferiblemente de 3,5 a 6, o más preferiblemente de 4-5.

Alfa-amilasas bacterianas

[0175] Según la invención, una alfa-amilasa bacteriana puede preferiblemente derivar del género *Bacillus*.

[0176] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa de *Bacillus* se deriva de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* o *B. stearothermophilus*, pero también se puede derivar de otra especie de *Bacillus*. Ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (BLA) mostrada en SEC ID 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 identidad de SEC n.º 1, 2, 3, 4 o 5, respectivamente, en WO 99/19467.

[0177] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrido, especialmente uno descrito en cualquiera de las WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059 y WO 02/10355 (todos los documentos incorporados por la presente por referencia). Variantes de alfa-amilasa contempladas específicamente se describe en la patente de EE.UU. n.º: 6.093.562, 6.187.576 y 6.297.038 (por la presente incorporada por referencia) e incluyen variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (alfa-amilasa BSG) que tienen una eliminación de uno o dos aminoácidos en la posición 179 a 182, preferiblemente una eliminación doble descrita en la WO 96/23873 - véase, por ejemplo, página 20, líneas 1-10 (por la presente incorporada por referencia), preferiblemente correspondiente a delta(181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa de tipo salvaje BSG expuesta en SEC ID n.º: 3 descrita en la WO 99/19467 o eliminación de aminoácidos 179 y 180 utilizando SEC ID n.º: 3 en la WO 99/19467 para numeración (cuya referencia es incorporada por la presente por referencia). Aún más preferidas son las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, que tienen una eliminación doble correspondiente a delta(181-182) y además comprenden una sustitución N193F (también denominada I181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa de tipo salvaje BSG expuesta en SEC ID n.º: 3 descrita en la WO 99/19467.

[0178] La alfa-amilasa también puede ser una alfa-amilasa maltogénica. Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa, EC 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 es descrita en las patentes de EE.UU. n.º: 4.598.048, 4.604.355 y 6.162.628, que son incorporadas por la presente como referencia.

Alfa-amilasas híbridas bacterianas

[0179] Una alfa-amilasa híbrida específicamente contemplada comprende 445 residuos de aminoácidos C-terminal de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada como SEC ID n.º: 3 en la WO 99/19467) y los 37 residuos de aminoácidos N-terminal de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada como SEC ID n.º: 5 en la WO 99/19467), con una o más, especialmente todas, de las siguientes sustituciones:

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 eliminación de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferiblemente eliminación de E178 y G179 (utilizando la numeración de la SEC ID n.º: 5 de la WO 99/19467).

[0180] La alfa-amilasa bacteriana se puede añadir en cantidades que son bien conocidas en la técnica. Cuando se miden en unidades KNU (descritas abajo en la sección "Materiales y métodos") la actividad de la alfa-amilasa está preferiblemente presente en una cantidad de 0,5-5.000 NU/g de sustancia seca, en una cantidad de 1-500 NU/g de sustancia seca, o más preferiblemente en una cantidad de 5-1.000 NU/g de sustancia seca, tal como 10-100 NU/g sustancia seca.

Alfa-amilasas fúngicas

[0181] Alfa-amilasas ácidas fúngicas incluyen alfa-amilasas ácidas derivadas de una cepa del género *Aspergillus*, tales como alfa-amilasas de *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus kawachii*.

[0182] 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 el 100% de identidad con la parte madura de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n.º: 10 en la WO 96/23874.

[0183] Otra alfa-amilasa ácida preferida es la derivada de una cepa de *Aspergillus niger*. En una forma de realización preferida la alfa-amilasa fúngica ácida es la de *A. niger* descrita como "AMYA_ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TrEMBL bajo el número de acceso 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 es incorporada por la presente como 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 SEC ID n.º: 1 en la WO 2004/080923 son contempladas. Una alfa-amilasa ácida fúngica disponible comercialmente adecuada derivada de *Aspergillus niger* es SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

[0184] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es derivada de *Aspergillus kawachii* y descrita por Kaneko *et al.*, 1996, J. Ferment. Bioeng. 81:292-298, "Molecular-cloning and determination of the nucleotide-

sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachii*"; y además como EMBL:#AB008370.

5 [0185] La alfa-amilasa ácida fúngica también puede ser una enzima de tipo salvaje que comprende un módulo de unión a carbohidratos (CBM) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir, un no híbrido), o un variante del mismo. En una forma de realización, la alfa-amilasa ácida de tipo salvaje es derivada de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

10 Alfa-amilasas híbridas fúngicas

[0186] En una forma de realización preferida 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 publicación de solicitud de EE.UU. n.º: 2005/0054071 (Novozymes) o solicitud de patente de EE.UU. n.º: 60/638.614 (Novozymes) que es incorporada en la presente como referencia. Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico de alfa-amilasa (CD) y un dominio/módulo de unión a carbohidratos (CBM) y un enlazador opcional.

15 [0187] Ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen los descritos en la solicitud de EE.UU. n.º: 60/638.614 incluyendo variante de Fungamyl con dominio catalítico JA118 y *Athelia rolfsii* SBD (SEC ID n.º: 100 en la solicitud EE.UU. n.º: 60/638.614), Alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador *Athelia rolfsii* AMG y SBD (SEC ID n.º: 101 en la solicitud de EE.UU. n.º: 60/638.614) y alfa-amilasa de *Meripilus giganteus* con enlazador de glucoamilasa de *Athelia rolfsii* y SBD (SEC ID n.º: 102 en la solicitud de EE.UU. n.º: 60/638.614).

20 [0188] Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen los descritos en la publicación de solicitud de EE.UU. n.º: 2005/0054071, incluyendo los de la tabla 3 de la página 15, tal como la alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con enlazador de *Aspergillus kawachii* y dominio de unión al almidón.

25 Productos de alfa-amilasa comerciales

[0189] 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, GC358, GC980, SPEZYME™ RSL, y SPEZYME™ DELTA AA (Genencor Int.), y la alfa-amilasa fúngica ácida vendida bajo el nombre comercial SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

30 [0190] Una alfa-amilasa ácida se puede añadir según la invención en una cantidad de 0,1 a 10 AFAU/g sustancia seca, preferiblemente de 0,10 a 5 AFAU/g sustancia seca, especialmente de 0,3 a 2 AFAU/g sustancia seca.

35 Producción de jarabe

[0191] La presente invención también proporciona un proceso del uso de una glucoamilasa de la invención para producir jarabe, tal como glucosa y similares, a partir de material que contiene almidón. Materias primas adecuadas se ejemplifican en la sección "Materiales que contienen almidón" por encima. Generalmente, el proceso comprende las etapas de hidrolización parcialmente (licuefacción) del material que contiene almidón en presencia de alfa-amilasa y luego posterior sacarificación de la liberación de glucosa a partir de las extremidades no reducidas del almidón o las moléculas de oligo y polisacáridos relacionadas en presencia de glucoamilasa de la invención.

[0192] La licuefacción y la sacarificación se pueden llevar a cabo como se ha descrito anteriormente para producir un producto de fermentación.

40 [0193] La glucoamilasa de la invención también se puede usar en forma inmovilizada. Esto es adecuado y frecuentemente usado para producir jarabes de especialidad, tales como jarabes de maltosa, y además para el flujo de refinado de oligosacáridos en relación con la producción de jarabes de fructosa, por ejemplo, jarabe rico en fructosa (HFS).

45 [0194] Consecuentemente, este aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de producción del jarabe a partir de material que contiene almidón, que comprende:

- (a) licuefacción del material que contiene almidón en presencia de una alfa-amilasa,
- (b) sacarificación del material obtenido en la etapa (a) utilizando una glucoamilasa de la invención.

50 [0195] Un jarabe se puede recuperar a partir del material sacarificado obtenido en la etapa (b).

[0196] Detalles de condiciones adecuadas se pueden encontrar por encima

55 Elaboración de cerveza

[0197] Una glucoamilasa de la invención también puede usarse en un proceso de elaboración de cerveza. La glucoamilasa de la invención se añade en cantidades eficaces que pueden ser fácilmente determinadas por la persona experta en la técnica.

5 [0198] La presente invención se describe más mediante los ejemplos siguientes.

Materiales y métodos

[0199] Levadura: RED STAR™ disponible de Red Star/Lesaffre, USA

10

Medios y reactivos:

[0200] Productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos calidad reactiva.

15

[0201] PDA: 39 g/L agar de dextrosa de patata, 20 g/L agar, 50 ml/L glicerol

Métodos

20 [0202] A menos que se especifique de otro modo, las manipulaciones y las transformaciones de ADN se realizaron utilizando métodos estándar de biología molecular como se describe en Sambrook *et al.*, 1989,, Molecular cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. *et al.* (eds.) "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R., and Cutting, S. M. (eds.) "Molecular Biological Methods for Bacillus". John Wiley and Sons, 1990.

25

Actividad de glucoamilasa

[0203] La actividad de glucoamilasa se puede medir en unidades AGI o en unidades de glucoamilasa (AGU).

30

Actividad de glucoamilasa (AGI)

[0204] La glucoamilasa (equivalente a amiloglicosidasa) convierte el almidón en glucosa. La cantidad de glucosa es determinada aquí por el método de glucosa-oxidasa para la determinación de la actividad. El método descrito en la sección 76-11 de Starch-Glucoamylase Method with Subsequent Measurement of Glucose with Glucose Oxidase en "Approved methods of the American Association of Cereal Chemists". Vol.1-2 AACCC, de la American Association of Cereal Chemists, (2000); ISBN: 1-891127-12-8.

35

[0205] Una unidad de glucoamilasa (AGI) es la cantidad de enzima que formará 1 micro mol de glucosa por minuto bajo las condiciones estándar del método.

40

Condiciones estándar/condiciones de reacción:

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

[0206] El almidón debe ser almidón Lintner, que es un almidón de ebullición fina usado en el laboratorio como indicador colorimétrico. El almidón Lintner se obtiene por tratamiento de ácido clorhídrico diluido de almidón natural de modo que éste retenga la capacidad de dar color azul con yodo.

45

Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0207] La unidad Novo de glucoamilasa (AGU) se define como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándar 37°C, pH 4,3, sustrato: maltosa 23,2 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

50

[0208] Un sistema autoanalizador puede ser utilizado. Mutarotasa se añade al reactivo de glucosa deshidrogenasa de modo que cualquier alfa-D-glucosa presente se convierta en beta-D-glucosa. La glucosa deshidrogenasa

reacciona específicamente con beta-D-glucosa en la reacción mencionada anteriormente, formando NADH que se determina usando un fotómetro a 340 nm como una medida de la concentración de glucosa original.

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

5

Actividad de alfa-amilasa (KNU)

[0209] La actividad de alfa-amilasa se puede determinar utilizando almidón de patata como sustrato. Este método está basado en la descomposición de almidón de patata modificado por la enzima, y la reacción es seguida de mezcla de muestras de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo. Inicialmente, se forma un color azul negruzco, pero durante la descomposición del almidón el color azul se hace más débil y gradualmente se vuelve marrón rojizo, que se compara con un estándar de vidrio coloreado.

[0210] Una Unidad Kilo Novo (KNU) de alfa amilasa se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (es decir, a 37°C +/- 0,05; 0,0003 M Ca²⁺; y pH 5,6) dextriniza 5260 mg de sustancia seca de almidón Merck Amylum soluble.

Actividad de alfa-amilasa ácida

[0211] Cuando se usa según la presente invención, la actividad de cualquier alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida). Alternativamente la actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AAU (unidades de alfa-amilasa ácida).

Unidades de alfa-amilasa ácida (AAU)

[0212] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AAU (unidades de alfa-amilasa ácida), que es un método absoluto. Una unidad de amilasa ácida (AAU) es la cantidad de enzima que convierte 1 g de almidón (100% de sustancia seca) por hora bajo condiciones estandarizadas en un producto que tiene una transmisión a 620 nm después de la reacción con una solución de yodo de fuerza conocida igual al del color de referencia.

30

Condiciones estándar/condiciones de reacción:

Sustrato:	Almidón soluble. Concentración aprox. 20 g sustancia seca/L
Tampón:	Citrato, aprox. 0,13 M, pH=4,2
Solución de yodo:	40,176 g yoduro potásico + 0,088 g yodo/L
Agua de ciudad:	15°-20°dH (dureza de grado alemán)
PH:	4,2
Temperatura de incubación:	30°C
Tiempo de reacción:	11 minutos
Longitud de onda:	620 nm

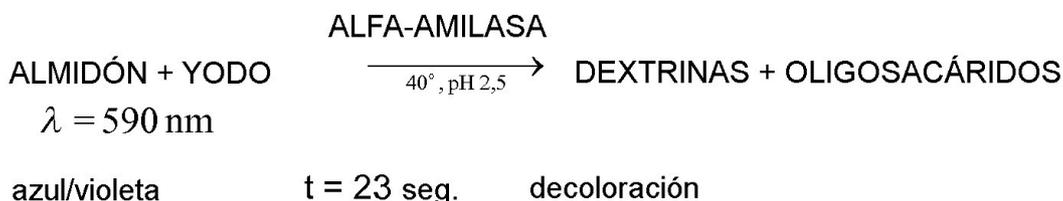
Concentración enzimática: 0,13-0,19 AAU/mL
 Rango de trabajo de enzima: 0,13-0,19 AAU/mL

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

5 Actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)

[0214] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida), que se determinan con respecto a un estándar enzimático. 1 AFAU se define como la cantidad de enzima que degrada 5,260 mg de sustancia seca de almidón por hora bajo las condiciones estándar mencionadas debajo.

[0215] Alfa-amilasa ácida, una endo-alfa-amilasa (1,4-alfa-D-glucano-glucanohidrolasa, EC 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 formado con yodo es directamente proporcional a la concentración de almidón. La actividad de amilasa es determinada utilizando colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón bajo las condiciones analíticas específicas.



20 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:	590 nm
Concentración enzimática:	0,025 AFAU/mL
Rango de trabajo de enzima:	0,01-0,04 AFAU/mL

Ejemplo 1:

Sacarificación y fermentación simultánea (SSF) con *Nigroformes sp.* AMG

25 [0216] El rendimiento de SSF de las glucoamilasas de *Nigroformes sp.* fue evaluado en dosis de enzima diferentes. La fermentación fue realizada bajo las condiciones siguientes:

30 Sustrato: maíz molido fue mezclado con agua de proceso y ajustada su sustancia seca en aproximadamente 32% (p/p). Fue licuado a 85°C y pH 5,8. El puré licuado tuvo un DE de 13,4.

Temperatura: 32°C
 pH inicial: 5,0

35 Dosis enzimática: *Nigroformes sp.* AMG producido en el *Aspergillus niger* a 30, 40, 55 y 70 microgramos de proteína enzimática/g sustancia seca. Las enzimas fueron comparadas con unas muestras purificadas de *Talaromyces emersonii* AMG y *Trametes cingulata* AMG dosificados en las mismas dosificaciones. La dosis más alta de *Talaromyces emersonii* AMG es equivalente a una cantidad pertinente en la industria de 0,56 AGU/g sustancia seca. Un control para sacarificación obtenible máxima se preparó utilizando cantidades en exceso de AMG comercial y alfa-amilasa.

Fermentación

[0217] Al sustrato para SSF, 1.000 ppm de urea como fuente de nitrógeno y 3 ppm de penicilina para control bacteriano fueron añadidos; el pH fue ajustados a 5,0 con H₂SO₄. Partes alícuotas de 5 g de triturado fueron transferidas a 15 ml de tubos centrífugos con un agujero taladrado en la parte superior para liberación de CO₂. Enzimas y levadura fueron adicionadas y los tubos fueron colocados al baño maría sin agitación a 32°C durante 54 horas. Se analizaron muestras en HPLC para determinar el etanol producido durante la fermentación. Los resultados se muestran en las tablas por debajo.

Tabla 1. Rendimiento de etanol producido durante SSF con <i>Nigrofores sp.</i> AMG a 30, 40, 55 y 70 microgramos de proteína enzimática/g sustancia seca en comparación con <i>Talaromyces emersonii</i> AMG y <i>Trametes cingulata</i> AMG. Control resultó en 100% rendimiento.				
	Dosis enzimática (microgramos proteína enzimática/g sustancia seca)			
	30	40	55	70
<i>Nigrofores sp.</i> , SEC ID n.º: 2	85%	93%	98%	98%
<i>Trametes cingulata</i> AMG G1, SEC ID n.º: 4	87%	90%	97%	98%
<i>Talaromyces emersonii</i> , T-AMG, SEC ID n.º: 6	83%	90%	94%	95%

Ejemplo 2:

[0218] Actividad específica de *Nigrofores* AMGs en comparación con *Trametes cingulata* AMG. La actividad específica fue calculada por la división de la actividad AGU de glucoamilasa (según el procedimiento de arriba) y proteína enzimática de cada preparación (análisis de AA). La tabla inferior a muestra resultados para *Nigrofores sp.* AMGs en comparación con AMG mejor del estado de la técnica, *Trametes cingulata* AMG.

Tabla 2. Actividad específica	
	[AGU/mg]
<i>Trametes cingulata</i> AMG G1, SEC ID n.º: 4	5,6
<i>Nigrofores sp.</i> , SEC ID n.º: 2	7,4

Temperatura: 32°C
pH inicial: 5,0

Dosis enzimática: *Nigrofores sp.* AMG producido en *Aspergillus niger* a 30, 40, 55 y 70 microgramos proteína enzimática/g sustancia seca. Las enzimas fueron comparadas con unas muestras purificadas de *Talaromyces emersonii* AMG y *Trametes cingulata* AMG dosificado a las mismas dosificaciones. La dosis máxima de *Talaromyces emersonii* AMG es equivalente a una cantidad pertinente en la industria de 0,56 AGU/g sustancia seca. Un control para sacarificación máxima obtenible se preparó utilizando cantidades en exceso de AMG comercial y alfa-amilasa.

Fermentación

[0219] Al sustrato para SSF, 1.000 ppm de urea como fuente de nitrógeno y 3 ppm de penicilina se añadieron para control bacteriano; el pH fue ajustado a 5,0 con H₂SO₄. Partes alícuotas de 5 g de trituración fueron transferidas a tubos centrífugadores de 15 ml con un agujero taladrado en la parte superior para liberación de CO₂. Enzimas y levadura fueron adicionadas y los tubos fueron colocados al baño maría sin agitación a 32°C durante 54 horas. Las muestras fueron analizadas en HPLC para la determinación del etanol producido durante la fermentación. Los resultados se muestran en las tablas por debajo.

Tabla 1. Rendimiento de etanol producido durante SSF con <i>Nigrofores sp.</i> AMG a 30, 40, 55 y 70 microgramos de proteína enzimática/g sustancia seca en comparación con <i>Talaromyces emersonii</i> AMG y <i>Trametes cingulata</i> AMG. Control resultó en 100% rendimiento.				
	Dosis enzimática (microgramos proteína enzimática/g sustancia seca)			
	30	40	55	70

<i>Nigrofores sp.</i> , SEC ID n.º: 2	85%	93%	98%	98%
<i>Trametes cingulata</i> AMG G1, SEC ID n.º: 4	87%	90%	97%	98%
<i>Talaromyces emersonii</i> , T-AMG, SEC ID n.º: 6	83%	90%	94%	95%

Ejemplo 2:

5 [0220] Actividad específica de *Nigrofores* AMGs en comparación con *Trametes cingulata* AMG. La actividad específica fue calculada por la división de la actividad de glucoamilasa AGU (según el procedimiento anterior) y proteína enzimática de cada preparación (análisis de AA). La tabla siguiente muestra los resultados para los *Nigrofores sp.* AMGs en comparación con el mejor AMG del estado de la técnica, *Trametes cingulata* AMG.

Tabla 2. Actividad específica	
	[AGU/mg]
<i>Trametes cingulata</i> AMG G1, SEC ID n.º: 4	5,6
<i>Nigrofores sp.</i> , SEC ID n.º: 2	7,4

10

Listado de secuencias

[0221]

15

<110> Morant, Marc Dominique Sasa, Mikako Ayabe, Keiichi Coward-Kelly, Guillermo
 <120> Polipéptidos que tienen actividad de glucoamilasa y polinucleótidos que codifican los mismos
 <130> 11738-WO-PCT

20

<150> US 61/411.044
 <151> 2010-11-08

<160> 6

25

<170> Versión de PatentIn 3.5

<210> 1
 <211> 2073
 <212> ADN
 <213> *Nigrofores sp.*

30

<400> 1

35

atgcgccctgc tcacattcgc caccctcgcc gcggtttgcg cgtccgtcct tggacagtcg 60

tccaccgccg cttcgtacgc agcgtccgag tcgcctatcg ccaaggcagg cctcctcgcg 120

aacatcgggtt ccagtggcgc caagtcgagc ggagccaagg tgcgataaat gttgtggcga 180

40

tggcgctccg aggtcgaact aacttccatc cgctcctacg ctatattagg caggagtgtg 240

aatcgccagc ccaagcacga cgaaccccga ctacctgtac acatgggtcc gagactcgtc 300

45

tctcgtggtc aaggatcatc tcgaccaata cagctcgga caagacacct cgacgcgcac 360

gctgatcgac cagttcgtct ctgctgagc gacggttcag cagactacga atcctagcgg 420

ttctgttacg acgggaggac ttggcgagcc gaaattcaac atcgacgaaa ccgctttcac 480

50

cggttcctgg ggtcgtcctc agcgaggtaa gcccatatct atggcccagc tgtggttgc 540

catgagtata tagacggacc tgctctccgc tccaccgcca tcatcaacta tgccaattgg 600

ES 2 605 235 T3

ctcatcgcca acggcaacac gacatatgta acgaacacct tgtggcctat catcgagctc 660
 5 gacctcaatt atgtagcgag caactggaac caatctacgt gagtgcattg cttcgcacga 720
 accggctgcc ttgtccattg agctgattca cctcatacag cttcgacctg tgggaggagg 780
 ttgactcgtc atccttcttc accactgccg tccagcaccg cgctttgcgt gaaggctctg 840
 10 ccttggctac caagattggc cagacttccg tcgtcagcaa cttaacacc caggccgcta 900
 acctcctctg cttcttgacg gtaagcaatc cacagtctgg ccgcatacac gggcatagtt 960
 15 tctaaatgaa ggctgttta gtcgtactgg aaccaagcg gcggctacat caccgccaac 1020
 actggtggag gacgctccgg caaggacgcc aacaccgtcc tcgcctccat tcacactttc 1080
 gaccccgtg caggctgcga tgatactacc ttccagccct gtcggacaa agctctgtcg 1140
 20 aacttgaagg tctacgtcga ctcttccgg tccatctact cggttaacag cggtatcgcg 1200
 tccaacgccg ctgtcgccac cggccgtac cccgaggacg tctactacaa cggcaaccg 1260
 25 tggtaacctg ccacctttgc cgtcgccgag cagctctacg acgcgctcat cacctggctg 1320
 aagcagggct cactgtccgt cacgagcacc tcgctcccct tcttcagca gttctccccg 1380
 ggcgtcgcca ccggcaccta cacttcatcc acatcgacct accagacact cacggctgcg 1440
 30 atcaagacct tcgccgacgg gttcgtcgcc atcaacgcca agtacacgcc gtcgggtgga 1500
 ggactctcgg agcagttcga caagacgacg ggagtgccca ctagtgcggt cgatctcacg 1560
 35 tggagctacg cttctgcggt gacagcgttt gaggcacgct ctggcttctc atcgcccagc 1620
 tggggagctg ctggtctgac tgtcccgtcg acttgctccg gcaacgctcg tagcactgtg 1680
 gcagtcactt tcaacgtcca ggctacgact gtattcgggg gtgagtatgg tccgagttag 1740
 40 aaaaatgcmc cgtttgtgct taccgtgaag cagagaacat atacatcacc ggctcgggtca 1800
 atgctctgca ggattggtct ccagacaccg ccctccttct ctctctgcg aactaccca 1860
 45 catggagcag tgagtatcag tatcagccaa aatttgtgca tctacttacg ttctgctaca 1920
 gtcaccgtca accttccggc aagcaccag atccagtaca agtacgtcag gaaggacgcc 1980
 agtaccggtg aactcacctg ggagtccgac ccgaacaacc agatcaccac cccggccagc 2040
 50 gggagcttta ctcagaacga tagctggcgt taa 2073

<210> 2
 <211> 575
 55 <212> PRT
 <213> *Nigrofomes* sp.
 <400> 2

ES 2 605 235 T3

Met Arg Leu Leu Thr Phe Ala Thr Leu Ala Ala Val Cys Ala Ser Val
 1 5 10 15
 5 Leu Gly Gln Ser Ser Thr Ala Ala Ser Tyr Ala Ala Ser Glu Ser Pro
 20 25 30
 10 Ile Ala Lys Ala Gly Leu Leu Ala Asn Ile Gly Ser Ser Gly Ala Lys
 35 40 45
 15 Ser Ser Gly Ala Lys Ala Gly Val Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Thr
 50 55 60
 20 Asn Pro Asp Tyr Leu Tyr Thr Trp Val Arg Asp Ser Ser Leu Val Phe
 65 70 75 80
 25 Lys Val Ile Ile Asp Gln Tyr Thr Ser Gly Gln Asp Thr Ser Thr Arg
 85 90 95
 30 Thr Leu Ile Asp Gln Phe Val Ser Ala Glu Ala Thr Leu Gln Gln Thr
 100 105 110
 35 Thr Asn Pro Ser Gly Ser Val Thr Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys
 115 120 125
 40 Phe Asn Ile Asp Glu Thr Ala Phe Thr Gly Ser Trp Gly Arg Pro Gln
 130 135 140
 45 Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ser Thr Ala Ile Ile Asn Tyr Ala Asn
 145 150 155 160
 50 Trp Leu Ile Ala Asn Gly Asn Thr Thr Tyr Val Thr Asn Thr Leu Trp
 165 170 175
 55 Pro Ile Ile Glu Leu Asp Leu Asn Tyr Val Ala Ser Asn Trp Asn Gln
 180 185 190
 Ser Thr Phe Asp Leu Trp Glu Glu Val Asp Ser Ser Ser Phe Phe Thr
 195 200 205
 Thr Ala Val Gln His Arg Ala Leu Arg Glu Gly Ser Ala Leu Ala Thr
 210 215 220
 Lys Ile Gly Gln Thr Ser Val Val Ser Asn Phe Asn Thr Gln Ala Ala
 225 230 235 240

ES 2 605 235 T3

Asn Leu Leu Cys Phe Leu Gln Ser Tyr Trp Asn Pro Ser Gly Gly Tyr
 245 250 255
 5
 Ile Thr Ala Asn Thr Gly Gly Gly Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr
 260 265 270
 10
 Val Leu Ala Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Ala Ala Gly Cys Asp Asp
 275 280 285
 15
 Thr Thr Phe Gln Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val
 290 295 300
 20
 Tyr Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr Ser Val Asn Ser Gly Ile Ala
 305 310 315 320
 25
 Ser Asn Ala Ala Val Ala Thr Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Tyr
 325 330 335
 30
 Asn Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Ala Thr Phe Ala Val Ala Glu Gln Leu
 340 345 350
 35
 Tyr Asp Ala Leu Ile Thr Trp Ser Lys Gln Gly Ser Leu Ser Val Thr
 355 360 365
 40
 Ser Thr Ser Leu Pro Phe Phe Gln Gln Phe Ser Pro Gly Val Ala Thr
 370 375 380
 45
 Gly Thr Tyr Thr Ser Ser Thr Ser Thr Tyr Gln Thr Leu Thr Ala Ala
 385 390 395 400
 50
 Ile Lys Thr Phe Ala Asp Gly Phe Val Ala Ile Asn Ala Lys Tyr Thr
 405 410 415
 55
 Pro Ser Gly Gly Gly Leu Ser Glu Gln Phe Asp Lys Ser Ser Gly Val
 420 425 430
 60
 Pro Thr Ser Ala Val Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ser Ala Leu Thr
 435 440 445
 65
 Ala Phe Glu Ala Arg Ser Gly Phe Ser Ser Pro Ser Trp Gly Ala Ala
 450 455 460
 70
 Gly Leu Thr Val Pro Ser Thr Cys Ser Gly Asn Val Gly Ser Thr Val
 465 470 475 480

ES 2 605 235 T3

Ala Val Thr Phe Asn Val Gln Ala Thr Thr Val Phe Gly Glu Asn Ile
 485 490 495
 5

Tyr Ile Thr Gly Ser Val Asn Ala Leu Gln Asp Trp Ser Pro Asp Thr
 500 505 510
 10

Ala Leu Leu Leu Ser Ser Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ile Thr Val
 515 520 525
 15

Asn Leu Pro Ala Ser Thr Gln Ile Gln Tyr Lys Tyr Val Arg Lys Asp
 530 535 540
 20

Ala Ser Thr Gly Glu Leu Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Asn Gln Ile
 545 550 555 560
 25

Thr Thr Pro Ala Ser Gly Ser Phe Thr Gln Asn Asp Ser Trp Arg
 565 570 575
 30

<210> 3
 <211> 1725
 <212> DNA
 <213> Trametes cingulata

<400> 3
 atgcgtttca cgctcctcac ctccctcctg ggcctcgccc tcggcgcggt cgcgcagtcg 60
 35 agtgcgcccg acgcgtacgt cgcgtccgaa tcgcccacgc ccaaggcggg tgtgctcgcc 120
 aacatcgggc ccagcggctc caagtccaac ggagcaaagg caggcatcgt gattgcaagt 180
 ccgagcacat ccaaccgaa ctacctgtac acatggacgc gcgactcgtc cctcgtgttc 240
 40 aaggcgcctca tcgaccagtt caccactggc gaagatacct cgctccgaac tctgattgac 300
 gagttcacct cggcggaggc catactccag caggtgccga acccgagcgg gacagtcagc 360
 45 actggaggcc tcggcgagcc caagttcaac atcgacgaga ccgcgttcac ggatgcctgg 420
 ggtcgtcctc agcgcgatgg tcccgtctc cgggcgactg ccatcatcac ctacgccaac 480
 tggctcctcg acaacaagaa cacgacctac gtgaccaaca ctctctggcc tatcatcaag 540
 50 ctcgacctcg actacgtcgc cagcaactgg aaccagtcca cgtttgatct ctgggaggag 600
 attaactcct cgtcgttctt cactaccgcc gtccagcacc gtgctctgcg cgagggcgcg 660
 55 actttcgcta atcgcatcgg acaaacctcg gtggtcagcg ggtacaccac ccaagcaaac 720
 aaccttctct gcttcttgca gtcgtactgg aaccccaccg gcggctatat caccgcaaac 780
 acgggcggcg gccgctctgg caaggacgcg aacaccgttc tcacgtcgat ccacaccttc 840

ES 2 605 235 T3

gacccggccg ctggatgcga cgctggttacg ttccagccgt gctcggacaa ggcgctgtcg 900
 aacttgaagg tgtacgtcga tgcgttccgc tcgatctact ccatcaacag cgggatcgcc 960
 5 tcgaatgcgg ccgttgctac cggccgctac cccgaggaca gctacatggg cggaaacca 1020
 tggtaacctca ccacctccgc cgctcgtgag cagctctacg atgcgctcat tgtgtggaac 1080
 10 aaacttggcg ccctgaacgt cagcagcacc tcctcccct tcttccagca gttctcgtca 1140
 ggcgtcaccg tcggcaccta tgcctcatcc tcgtccacct tcaagacgct cacttccgcc 1200
 atcaagacct tcgccgacgg cttcctcgcg gtcaacgcca agtacacgcc ctcgaacggc 1260
 15 ggccttgctg aacagtacag ccggagcaac ggctcgccccg tcagcgtgtg ggacctgacg 1320
 tggagctatg ctgctgccct cacgtcgttt gctgcgcgct caggcaagac gtatgcgagc 1380
 20 tggggcgcgg cgggtttgac tgtcccgacg acttgctcgg ggagtggcgg tgctgggact 1440
 gtggccgtca cettcaacgt gcaggcgacc accgtgttcg gcgagaacat ttacatcaca 1500
 ggctcgggtcc ccgctctcca gaactggtcg cccgacaacg cgctcatcct ctcagcggcc 1560
 25 aactacccca cttggagcat caccgtgaac ctgccggcga gcacgacgat cgagtacaag 1620
 tacattcgca agttcaacgg cgcggtcacc tgggagtccg acccgaacaa ctcgatcacg 1680
 30 acgcccgcga gcggcacggt caccacagaac gacacctggc ggtag 1725

<210> 4
 <211> 574
 35 <212> PRT
 <213> Trametes cingulata

<400> 4
 40 Met Arg Phe Thr Leu Leu Thr Ser Leu Leu Gly Leu Ala Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 45 Phe Ala Gln Ser Ser Ala Ala Asp Ala Tyr Val Ala Ser Glu Ser Pro
 20 25 30
 50 Ile Ala Lys Ala Gly Val Leu Ala Asn Ile Gly Pro Ser Gly Ser Lys
 35 40 45
 Ser Asn Gly Ala Lys Ala Gly Ile Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Ser
 50 55 60
 55 Asn Pro Asn Tyr Leu Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Ser Leu Val Phe
 65 70 75 80

ES 2 605 235 T3

Lys Ala Leu Ile Asp Gln Phe Thr Thr Gly Glu Asp Thr Ser Leu Arg
 85 90 95
 5 Thr Leu Ile Asp Glu Phe Thr Ser Ala Glu Ala Ile Leu Gln Gln Val
 100 105 110
 10 Pro Asn Pro Ser Gly Thr Val Ser Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys
 115 120 125
 15 Phe Asn Ile Asp Glu Thr Ala Phe Thr Asp Ala Trp Gly Arg Pro Gln
 130 135 140
 20 Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Ile Ile Thr Tyr Ala Asn
 145 150 155 160
 25 Trp Leu Leu Asp Asn Lys Asn Thr Thr Tyr Val Ala Ser Asn Trp Asn Gln
 165 170 175
 30 Ser Thr Phe Asp Leu Trp Glu Glu Ile Asn Ser Ser Ser Phe Phe Thr
 195 200 205
 35 Thr Ala Val Gln His Arg Ala Leu Arg Glu Gly Ala Thr Phe Ala Asn
 210 215 220
 40 Arg Ile Gly Gln Thr Ser Val Val Ser Gly Tyr Thr Thr Gln Ala Asn
 225 230 235 240
 45 Asn Leu Leu Cys Phe Leu Gln Ser Tyr Trp Asn Pro Thr Gly Gly Tyr
 245 250 255
 50 Ile Thr Ala Asn Thr Gly Gly Gly Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr
 260 265 270
 55 Val Leu Thr Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Ala Ala Gly Cys Asp Ala
 275 280 285
 Val Thr Phe Gln Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val
 290 295 300
 Tyr Val Asp Ala Phe Arg Ser Ile Tyr Ser Ile Asn Ser Gly Ile Ala
 305 310 315 320

ES 2 605 235 T3

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

5
 Gly Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Thr Thr Ser Ala Val Ala Glu Gln Leu
 340 345 350

10
 Tyr Asp Ala Leu Ile Val Trp Asn Lys Leu Gly Ala Leu Asn Val Thr
 355 360 365

15
 Ser Thr Ser Leu Pro Phe Phe Gln Gln Phe Ser Ser Gly Val Thr Val
 370 375 380

20
 Gly Thr Tyr Ala Ser Ser Ser Ser Thr Phe Lys Thr Leu Thr Ser Ala
 385 390 395 400

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

25
 Pro Ser Asn Gly Gly Leu Ala Glu Gln Tyr Ser Arg Ser Asn Gly Ser
 420 425 430

30
 Pro Val Ser Ala Val Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Ala Leu Thr
 435 440 445

35
 Ser Phe Ala Ala Arg Ser Gly Lys Thr Tyr Ala Ser Trp Gly Ala Ala
 450 455 460

40
 Gly Leu Thr Val Pro Thr Thr Cys Ser Gly Ser Gly Gly Ala Gly Thr
 465 470 475 480

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

45
 Ile Tyr Ile Thr Gly Ser Val Pro Ala Leu Gln Asn Trp Ser Pro Asp
 500 505 510

50
 Asn Ala Leu Ile Leu Ser Ala Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ile Thr
 515 520 525

55
 Val Asn Leu Pro Ala Ser Thr Thr Ile Glu Tyr Lys Tyr Ile Arg Lys
 530 535 540

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

ES 2 605 235 T3

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

5
 <210> 5
 <211> 1857
 <212> DNA
 10 <213> *Talaromyces emersonii*
 <400> 5
 atggcgctccc tcggtgctgg cgctctctgc atcctggggc tgacgcctgc tgcatttgca 60
 15 cgagcgcgccg ttgcagcgcg agccaccggt tccctggact ctttctcgc aaccgaaact 120
 ccaattgccc tccaaggcgt gctgaacaac atcggggcca atgggtgctga tgtggcagga 180
 20 gcaagcgcgcg gcattgtggt tgccagtccg agcaggagcg acccaaatta tttctactcc 240
 tggacacgtg acgcagcgcg cacggccaaa tacctcgtcg acgccttcat cgcgggcaac 300
 aaggacctag agcagaccat ccagcagtac atcagcgcgc aggcgaaggt gcaaactatc 360
 25 tccaatccgt ccggagattt atccaccggt ggcttaggtg agcccaagtt caatgtgaat 420
 gagacggctt ttaccgggcc ctggggtcgt ccacagaggg acggaccagc gttgagagcg 480
 acggccctca ttgcgtatgc gaactatctc atcgacaacg gcgaggcttc gactgccgat 540
 30 gagatcatct ggccgattgt ccagaatgat ctgtcctaca tcaccaata ctggaactca 600
 tccaacctcg acctctggga agaagtagaa ggatcctcat tcttcacaac cgccgtgcaa 660
 35 caccgcgccc tggtcgaagg caatgcaactg gcaacaaggc tgaaccacac gtgctccaac 720
 tgcgtctctc aggccctca ggtcctgtgt ttctgcagc cactactggac cggatcgtat 780
 gttctggcca actttggtgg cagcggtcgt tccggcaagg acgtgaattc gattctgggc 840
 40 agcatccaca ctttgatcc cgccggaggc tgtgacgact cgacctcca gccgtgttcg 900
 gcccgctgcct tggcaaatca caaggtggtc accgactcgt tccggagtat ctatgcgatc 960
 45 aactcaggca tcgcagaggg atctgccgtg gcagtcggcc gctaccctga ggatgtctac 1020
 cagggcgggga acccctggta cctggccaca gcagcggctg cagagcagct ttacgacgcc 1080
 atctaccagt ggaagaagat cggctcgata agtatcacgg acgttagtct gccatthttc 1140
 50 caggatatct acccttctgc cgcggtgggc acctataact ctggctccac gactttcaac 1200
 gacatcatct cggccgtcca gacgtatggt gatggatatc tgagtattgt cgagaaatat 1260
 55 actccctcag acggctctct taccgaacaa ttctcccgta cagacggcac tccgctttct 1320
 gcctctgccc tgacttggtc gtacgcttct ctctaaccg cttcggcccg cagacagtcc 1380
 gtcgtccctg cttcctgggg cgaaagctcc gcaagcagcg tccttgcggt ctgctctgcc 1440

ES 2 605 235 T3

acctctgcca cgggccata cagcacggct accaacaccg tctggccaag ctctggctct 1500
 5 ggcagctcaa caaccaccag tagcgcccca tgcaccactc ctacctctgt ggctgtgacc 1560
 ttcgacgaaa tcgtcagcac cagttacggg gagacaatct acctggccgg ctcgatcccc 1620
 gagctgggca actgggtccac ggccagcgcg atccccctcc gcgcggatgc ttacaccaac 1680
 10 agcaaccgcg tctggtacgt gaccgtcaat ctgccccctg gcaccagctt cgagtacaag 1740
 ttcttcaaga accagacgga cgggaccatc gtctgggaag acgacccgaa ccggctcgtac 1800
 acgggtcccag cgtactgtgg gcagactacc gccattcttg acgatagttg gcagtga 1857
 15

<210> 6
 <211> 618
 <212> PRT
 20 <213> Talaromyces emersonii
 <400> 6

Met Ala Ser Leu Val Ala Gly Ala Leu Cys Ile Leu Gly Leu Thr Pro
 25 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 605 235 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 605 235 T3

Pro Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Asn Ser Gly Ser Thr Thr Phe Asn
 385 390 395 400
 5
 Asp Ile Ile Ser Ala Val Gln Thr Tyr Gly Asp Gly Tyr Leu Ser Ile
 405 410 415
 10
 Val Glu Lys Tyr Thr Pro Ser Asp Gly Ser Leu Thr Glu Gln Phe Ser
 420 425 430
 15
 Arg Thr Asp Gly Thr Pro Leu Ser Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Tyr
 435 440 445
 20
 Ala Ser Leu Leu Thr Ala Ser Ala Arg Arg Gln Ser Val Val Pro Ala
 450 455 460
 Ser Trp Gly Glu Ser Ser Ala Ser Ser Val Pro Ala Val Cys Ser Ala
 465 470 475 480
 25
 Thr Ser Ala Thr Gly Pro Tyr Ser Thr Ala Thr Asn Thr Val Trp Pro
 485 490 495
 30
 Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Thr Ser Ser Ala Pro Cys Thr
 500 505 510
 35
 Thr Pro Thr Ser Val Ala Val Thr Phe Asp Glu Ile Val Ser Thr Ser
 515 520 525
 40
 Tyr Gly Glu Thr Ile Tyr Leu Ala Gly Ser Ile Pro Glu Leu Gly Asn
 530 535 540
 Trp Ser Thr Ala Ser Ala Ile Pro Leu Arg Ala Asp Ala Tyr Thr Asn
 545 550 555 560
 45
 Ser Asn Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Asn Leu Pro Pro Gly Thr Ser
 565 570 575
 50
 Phe Glu Tyr Lys Phe Phe Lys Asn Gln Thr Asp Gly Thr Ile Val Trp
 580 585 590
 55
 Glu Asp Asp Pro Asn Arg Ser Tyr Thr Val Pro Ala Tyr Cys Gly Gln
 595 600 605
 Thr Thr Ala Ile Leu Asp Asp Ser Trp Gln
 610 615

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado que tiene actividad de glucoamilasa, seleccionado del grupo que consiste en:
- 5 (a) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad con el polipéptido maduro de SEC ID n.º: 2;
- (b) un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85% de identidad con el dominio catalítico mostrado como los aminoácidos 18 a 472 de SEC ID n.º: 2;
- 10 (c) un polipéptido codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, donde el polipéptido maduro es los aminoácidos 19 a 575 de SEC ID n.º: 2.
3. Polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
- 15 4. Constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido según la reivindicación 3 operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.
- 20 5. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 4.
6. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 4.
7. Método para producir el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende: (a) cultivo de una célula huésped que comprende un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.
- 25 8. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para la producción de jarabe y/o un producto de fermentación.
- 30 9. Uso según la reivindicación 8, donde la materia prima es material que contiene almidón gelatinizado o no gelatinizado.
- 35 10. Composición que incluye una alfa-amilasa y un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
11. Proceso de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye las etapas de:
- 40 (a) licuefacción de material que contiene almidón;
- (b) sacarificación del material licuado; y
- (c) fermentación con un organismo fermentador;
- 45 donde la etapa b) se realiza usando al menos una glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
12. Proceso de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón, que incluye las etapas de:
- 50 (a) sacarificación de material que contiene almidón a una temperatura inferior a la temperatura de gelatinización inicial de dicho material que contiene almidón; y
- (b) fermentación con un organismo fermentador;
- 55 donde la etapa (a) se realiza usando al menos una glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.
13. Proceso según cualquiera de las de las reivindicaciones 11 o 12, donde el producto de fermentación es etanol.
14. Proceso para la producción de jarabe a partir de material que contiene almidón, que comprende:
- 60 (a) licuefacción del material que contiene almidón en presencia de una alfa-amilasa,
- (b) sacarificación del material obtenido en la etapa (a) utilizando una glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-2.