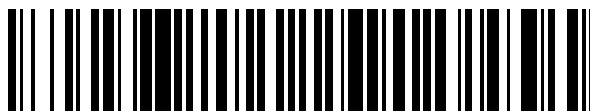


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 011**

51 Int. Cl.:

C07K 14/385 (2006.01)

C12N 9/30 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.09.2012** **PCT/CN2012/082436**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.04.2013** **WO13044867**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.09.2012** **E 12836934 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.03.2017** **EP 2751131**

54 Título: **Polipéptidos con actividad de alfa-amilasa y polinucleótidos que codifican los mismos**

30 Prioridad:

30.09.2011 WO PCT/CN2011/080465

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.09.2017

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (50.0%)

Krogshoejvej 36

2880 Bagsvaerd, DK y

NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

LI, MING;

DUAN, JUNXIN;

TSUTSUMI, NORIKO;

COWARD-KELLY, GUILLERMO y

LUNDKVIST, HENRIK

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 632 011 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 con actividad de alfa-amilasa y polinucleótidos que codifican los mismos.

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 [0001] La presente invención se refiere a polipéptidos con actividad de alfa-amilasa, dominios catalíticos y dominios de unión de carbohidrato, y polinucleótidos que codifican los polipéptidos, dominios catalíticos y dominios de unión de carbohidrato.

La invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos, vectores y células huésped que comprenden los polinucleótidos al igual que métodos de producción y uso de los polipéptidos, dominios catalíticos y dominios de unión de carbohidrato.

15 Descripción de las técnicas relacionadas

[0002] Alfa-amilasas (alfa-1,4-glucan-4-glucanohidrolasas, EC. 3.2.1.1) constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de almidón y otros lineales y ramificados 1,4-glucosídico oligo y polisacáridos.

20 [0003] Durante un número de años, han usado enzimas de alfa-amilasa para una variedad de fines diferentes, el más importante de los cuales es licuefacción de almidón, desecolado textil, lavado textil, modificación de almidón en el papel e industria de pulpa, y para la destilación, producción de etanol y cocción.

25 [0004] El objeto de la presente invención es proporcionar alfa-amilasas para la conversión de almidón en maltodextrinas, mono- y disacáridos y/o útil en procesos que implican licuefacción de almidón, lavado textil, desecolado textil, modificación de almidón en el papel e industria de pulpa, y para la elaboración de cerveza, producción de etanol y cocción.

30 [0005] Un polipéptido de *Aspergillus fumigatus* con actividad de alfa-amilasa se describe en la WO 2003/012071 (GeneseqP:ABB80178).

Un polipéptido de *Aspergillus terreus* con actividad de alfa-amilasa se describe en la WO 2010/091221.

Una alfa-amilasa putativa de *Aspergillus flavus* se describe en UNIPROT:B8N2R4 B8N2R4 ASPFN.

Una alfa-amilasa putativa de *Neosartorya fischeri* se describe en UNIPROT:A1CYB1 A1CYB1 NEOFI.

35 Resumen de la invención

[0006] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de alfa-amilasa seleccionada del grupo que consiste en:

40 (a) un polipéptido con 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 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia para amino ácidos 21-619 de SEC ID N.º: 4; donde % de identidad se determina utilizando el programa Needle del paquete EMBOSS con una penalización por apertura de espacio de 10, una penalización por extensión de espacio de 0,5, y el EBLOSUM62 por el cálculo: (residuos idénticos x 100)/(longitud de alineamiento - número total de espacios en el alineamiento).

[0007] La presente invención también se refiere a polipéptidos aislados que comprenden un dominio catalítico seleccionado del grupo que consiste en:

50 (a) un dominio catalítico con al menos 95 % de identidad de secuencia con amino ácidos 21 a 493 de la SEC ID N.º: 4.

[0008] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican los polipéptidos de la presente invención y métodos de producción de los polipéptidos.

55 [0009] La presente invención también se refiere a usar la presente alfa-amilasa para la conversión de almidón, modificación de almidón en el papel e industria de pulpa, licuefacción de almidón, lavado textil, desecolado textil, destilación, producción de etanol y/o cocción.

60 [0010] La presente invención también se refiere a una composición que comprende el polipéptido de la presente invención y una enzima seleccionada del grupo que consiste en: una alfa-amilasa fúngica (EC 3.2.1.1), una beta-amilasa (E.C. 3.2.1.2), una glucoamilasa (E.C.3.2.1.3), unas pululanases (E.C. 3.2.1.41), una fitasa (E.C.3.1.2.28) y una proteasa (E.C. 3.4.).

65 [0011] La presente invención también se refiere a una formulación de caldo completo o composición de cultivo celular que comprende el polipéptido de la invención.

Breve descripción de las figuras

[0012]

- 5 La Figura 1 muestra una construcción de P243SV y pLIZG8HQ.
La Figura 2 muestra una construcción de P23WU1 y pLIZG8HQ.

Definiciones

[0013]

- 10 Alfa-amilasa: el término "alfa-amilasa" significa una actividad de alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que cataliza la endohidrólisis de enlaces (1→4)-alpha-D-glucosídico en polisacáridos que contienen tres o más unidades de D-glucosa (1→4)-alpha-vinculadas.
- 15 El término "actividad de alfa-amilasa" corresponde a las enzimas reagrupadas en E.C. 3.2.1.1. para fines de la presente invención, la actividad de alfa-amilasa se determina según el procedimiento descrito en los ejemplos.
- 20 En un aspecto, los polipéptidos de la presente invención tienen al menos 20 %, por ejemplo, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 100 % de la actividad de alfa-amilasa del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 2 o el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 4.
- Actividad de glucoamilasa: el término "actividad de glucoamilasa (1,4-alfa-D-glucan glucohidrolasa, EC 3,2,1,3)" se define aquí como una actividad enzimática, que cataliza la liberación de D-glucosa desde las extremidades no-reducidas de almidón o moléculas oligo- y polisacáridas relacionadas.
- 25 La actividad de glucoamilasa se puede medir en unidades AGU.
- Variante alélica: el término "variante alélica" significa 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 resultar en el polimorfismo dentro de poblaciones.
- 30 Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (ningún cambio en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos con secuencias de aminoácidos alteradas.
- Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.
- Dominio de unión de carbohidrato: el término "dominio de unión de carbohidrato" o "CBD" se define aquí como una secuencia de aminoácidos que comprende un CBD de familia 20, conocido también como un dominio de unión de almidón (SBD).
- 35 En la SEC ID N.º: 4, los aminoácidos 511 a 619 son el CBD.
- Dominio catalítico: el término "dominio catalítico" significa la región de una enzima que contiene la maquinaria catalítica de la enzima.
- ADNc: el término "ADNc" significa una molécula de ADN que se puede preparar por transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm madura, unida obtenida a partir de una célula eucariótica o procariótica.
- 40 ADNc carece de secuencias de intrones que pueden estar presentes en el ADN genómico correspondiente.
- La transcripción de ARN inicial primaria es un precursor para ARNm que se procesa a través de una serie de pasos, incluyendo la unión antes de aparecer como ARNm maduro unido.
- Secuencia codificante: el término "secuencia codificante" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de un polipéptido.
- 45 Los límites de la secuencia de codificación se determinan generalmente por un marco de lectura abierto, que empieza con un codón de inicio tal como ATG, GTG o TTG y extremidades con un codón de terminación tal como, TAA, TAG o TGA.
- La secuencia codificante puede ser un ADN genómico, ADNc, ADN sintético o una combinación de los mismos.
- 50 Secuencias de control: el término "secuencias de control" significa secuencias de ácido nucleico necesarias para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro de la presente invención.
- Cada secuencia de control puede ser nativa (es decir, desde el mismo gen) o foránea (es decir, a partir de un gen diferente) al polinucleótido que codifica el polipéptido o nativo o foráneo entre sí.
- 55 Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal y terminador de transcripción.
- Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcional y traslacional.
- Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlaces con motivo de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la ligadura de las secuencias de control con la región de codificación del polinucleótido que codifica un polipéptido.
- 60 Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción de un polipéptido que incluye, pero no de forma limitativa, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

Vector de expresión: el término "vector de expresión" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido y está operativamente vinculado para controlar secuencias que proveen para su expresión.

Fragmento: el término "fragmento" significa un polipéptido o un catalítico o dominio de unión de carbohidrato con uno o más (por ejemplo; diferentes) aminoácidos ausentes del amino y/o carboxilo terminal de un polipéptido maduro o dominio; donde el fragmento tiene alfa-amilasa o actividad de unión de carbohidrato.

En un aspecto, un fragmento contiene al menos 508 residuos de aminoácidos, preferiblemente, al menos 538 residuos de aminoácidos, más preferiblemente 568 residuos de aminoácidos de la SEC ID N.º: 4.

[0014] En una forma de realización específica, un fragmento comprende aminoácidos 21 a 493 de la SEC ID N.º: 4.

En una forma de realización específica, un fragmento comprende aminoácidos 511 a 619 de SEC ID N.º: 4.

Célula huésped: el término "célula huésped" significa cualquier tipo celular que sea susceptible de transformación, transfección, transducción o similar con un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención.

El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntica a la célula madre debido a mutaciones que se producen durante la replicación.

Aislado: el término "aislado" significa una sustancia en una forma o ambiente que no se produce en la naturaleza.

Ejemplos no limitativos de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no se produzca de forma natural, (2) cualquier sustancia que incluya, pero no se limite a, cualquier enzima, variante, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se retire al menos parcialmente de uno o más o todos los constituyentes de origen natural con los cuales se asocia en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por la mano del hombre con respecto a la sustancia encontrada en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada mediante el aumento de la cantidad de la sustancia con respecto a otros componentes con los que se asocia naturalmente (por ejemplo, producción recombinante en una célula huésped; copias múltiples de un gen que codifica la sustancia; y uso de un promotor más fuerte que el promotor naturalmente asociado al gen que codifica la sustancia).

Polipéptido maduro: el término "polipéptido" significa un polipéptido en su forma final siguiente a la traducción y cualquier modificación postraduccional, tal como tratamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro es aminoácidos 21 a 619 de la SEC ID N.º: 4, basado en los programas (por ejemplo, péptido señal (Nielsen et al., 1997, Protein Engineering 10: 1-6)) que predice que los aminoácidos 1 a 20 de la SEC ID N.º: 4 son péptidos señal.

Se conoce en la técnica que una célula huésped puede producir una mezcla de dos o más polipéptidos maduros diferentes (es decir, con un C-terminal diferente y/o aminoácido N-terminal) expresado por el mismo polinucleótido.

La secuencia codificadora del polipéptido maduro: el término "polipéptido maduro que codifica la secuencia" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro con actividad de alfa-amilasa.

En un aspecto, la secuencia de codificación del polipéptido maduro es nucleótidos 61 a 2351 de la SEC ID N.º: 3 o nucleótidos 76 a 1584 de la SEC ID N.º: 1 o la secuencia de ADNc de los mismos, basada en el programa por ejemplo, SignalP (Nielsen et al., 1997, supra) que predice que los nucleótidos 1 a 60 de la SEC ID N.º: 3 codifican un péptido señal.

Condiciones de astringencia bajas: el término "condiciones de astringencia bajas" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % SDS, 200 microgramos/ml ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y 25 % de formamida, seguida de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas.

El material portador finalmente se lava tres veces cada 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % SDS a 50 °C.

Condiciones de astringencia media: el término "condiciones de astringencia media" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, 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 35 % de formamida, seguida de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas.

El material portador finalmente se lava tres veces cada 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % SDS a 55 °C.

Condiciones de astringencia medio altas: el término "condiciones de astringencia medio altas" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, 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 cualquiera de 35 % de formamida, seguida de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas.

El material portador es finalmente lavado tres veces cada 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2% SDS a 60°C.

Condiciones de astringencia altas: el término "condiciones de astringencia altas" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, 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 50 % de formamida, seguida de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas.

El material portador es finalmente lavado tres veces cada 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % SDS a 65°C.

Constructo de ácidos nucleicos: el término "constructo de ácidos nucleicos" significa una molécula de ácido nucleico, bien uni- o bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o bien se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de forma que de otro modo no existirían en la naturaleza o que es sintético, que comprende una o más secuencias de control.

Operativamente vinculado: el término "operativamente vinculado" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca a una posición apropiada relativa a la secuencia de codificación de un polinucleótido tal que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia de codificación.

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

Para fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior.

Los parámetros usados son la penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (EMBOSS versión BLOSUM62).

El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

$$(\text{residuos idénticos} \times 100) / (\text{longitud de alineamiento} - \text{número total de espacios de alineamiento})$$

[0015] Para fines de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina utilizando el algoritmo Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, supra) como se ha implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), preferiblemente versión 5.0.0 o posterior.

Los parámetros usados son la 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 se calcula de la siguiente manera:

$$(\text{Deoxirribonucleótidos idénticos} \times 100) / (\text{longitud de alineamiento} - \text{número total de espacios de alineamiento})$$

Subsecuencia: el término "subsecuencia" significa un polinucleótido con uno o más (por ejemplo; diferentes) nucleótidos ausentes del extremo 5' y/o 3' de una secuencia de codificación del polipéptido maduro; donde la subsecuencia codifica un fragmento con actividad de alfa-amilasa.

En un aspecto, una subsecuencia contiene al menos 1524 nucleótidos, preferiblemente, al menos 1614 nucleótidos, más preferiblemente, al menos 1704 nucleótidos de la SEC ID N.º 3.

Variante: el término "variante" significa un polipéptido con actividad de alfa-amilasa que incluye una alteración, es decir, una sustitución, inserción, y/o delección, a una o más (por ejemplo; diferentes) posiciones.

Una sustitución significa la sustitución del aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una eliminación implica la delección del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa que se añade un aminoácido adyacente a e inmediatamente después del aminoácido que ocupa una posición.

Condiciones de astringencia muy altas: el término "condiciones de astringencia muy altas" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, 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 50 % de formamida, seguida de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas.

El material portador finalmente se lava tres veces cada 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % SDS a 70°C.

Condiciones de astringencia muy bajas: el término "condiciones de astringencia muy bajas" significa para sondas de al menos 100 nucleótidos de longitud, 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 25 % de formamida, seguida de procedimientos de transferencia de Southern estándar durante 12 a 24 horas.

El material portador finalmente se lava tres veces cada 15 minutos utilizando 2X SSC, 0,2 % SDS a 45 °C.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos con actividad de alfa-amilasa

[0016] En una forma de realización, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEC ID N.º 4 de 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%, al menos 99% o 100%, que tiene actividad de alfa-amilasa.

[0017] En un aspecto, los polipéptidos difieren en no más de 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, del polipéptido maduro de la SEC ID N.º 4.

[0018] Un polipéptido de la presente invención preferiblemente comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º 4.

En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID N.º 4.

En otro aspecto, el polipéptido comprende o consiste en los aminoácidos 21 a 619 de la SEC ID N.º: 4.

[0019] En otra forma de realización, la presente descripción se refiere a un polipéptido aislado con actividad de alfa-amilasa codificada por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de astringencia muy bajas, condiciones de astringencia bajas, condiciones de astringencia medias, condiciones de astringencia medio altas, condiciones de astringencia altas o condiciones de astringencia muy altas con (i) la secuencia de codificación del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 3, (ii) la secuencia de ADNc del mismo o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii) (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edición, Cold Spring Harbor, New York).

[0020] El polinucleótido de la SEC ID N.º: 3 o una subsecuencia del mismo, al igual que el polipéptido de la SEC ID N.º: 4 o un fragmento del mismo, se puede utilizar para diseñar sondas de ácido nucleico y clonar polipéptidos de codificación de ADN con actividad de alfa-amilasa de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocidos en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para la hibridación con el ADN genómico o ADNc de una célula de interés, seguida de procedimientos de transferencia de Southern estándar, para identificar y aislar el gen correspondiente en estos.

Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían ser al menos 15, por ejemplo, al menos 25, al menos 35 o al menos 70 nucleótidos de longitud.

Preferiblemente, la sonda de ácidos nucleicos es al menos 100 nucleótidos de longitud, por ejemplo, al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800 nucleótidos o al menos 900 nucleótidos de longitud.

Se pueden usar tanto sondas de ADN como de ARN.

Las sondas están típicamente marcadas para la detección del gen correspondiente (por ejemplo, con ^{32}P , ^3H , ^{35}S , biotina o avidina).

Tales sondas están incluidas en la presente invención.

[0021] Una genoteca de ADN genómico o ADNc obtenido a partir de tales otras cepas se puede seleccionar para ADN que hibridiza con las sondas anteriormente descritas y codifica un polipéptido con actividad de alfa-amilasa. Genómico u otro ADN de tales otras cepas se puede separar por electroforesis en gel de poli(acrilamida) o agarosa, u otras técnicas de separación.

ADN desde las bibliotecas o el ADN separado se puede transferir e inmovilizar en la nitrocelulosa u otro material portador adecuado.

Para identificar un clon o ADN que hibridiza con la SEC ID N.º: 3 o la secuencia de codificación del polipéptido maduro del mismo o una subsecuencia del mismo, el material portador se usa en una transferencia Southern.

[0022] Para fines de la presente descripción, la hibridación indica que el polinucleótido hibridiza a una sonda de ácidos nucleicos marcada que corresponde con la (i) SEC ID N.º: 3; (ii) la secuencia de codificación del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 3; (iii) la secuencia de ADNc del mismo; (iv) el complemento en toda su longitud del mismo; o (v) una subsecuencia del mismo; bajo condiciones de astringencia muy bajas a altísimas.

Moléculas a las que la sonda de ácidos nucleicos hibridiza bajo estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, una película radiográfica o cualquier otro medio de detección conocido en la técnica.

[0023] En un aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es nucleótidos 61 a 2351 de la SEC ID N.º: 3.

En otro aspecto de la divulgación, la sonda de ácidos nucleicos es un polinucleótido que codifica el polipéptido de la SEC ID N.º: 4; el polipéptido maduro de la misma; o un fragmento de la misma.

En otro aspecto, la sonda de ácidos nucleicos es la SEC ID N.º: 3 o la secuencia de ADNc de la misma.

[0024] En otra forma de realización, la presente descripción se refiere a un polipéptido aislado con actividad de alfa-amilasa codificada por un polinucleótido con una identidad de secuencia a la secuencia de codificación del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 3 o la secuencia de ADNc del mismo de al menos 80 %, por ejemplo, al menos 85 %, 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 %, al menos 99 % o 100 %.

En otra forma de realización, la presente divulgación se refiere a variantes del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 4 que comprenden una sustitución, delección y/o inserción a una o más (por ejemplo; diferentes) posiciones.

En una forma de realización, el número de sustituciones de aminoácidos, delecciones y/o inserciones introducidas en el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 4 es al menos 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10.

El aminoácido puede ser de una naturaleza menor, que las sustituciones de aminoácidos conservadores o inserciones que significativamente no afectan al plegado y/o actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de 1-30 ácidos de amino; extensiones terminadas de amino pequeño o carboxilo, tales como un residuo de metionina aminoterminal; un péptido enlazador pequeño de hasta 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación cargando la red de cambio u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0025] Ejemplos de sustituciones conservadoras son en los grupos de 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).

Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran una actividad específica se conocen en la técnica y son descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en *The Proteins*, Academic Press, New York.

Las sustituciones comunes 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.

[0026] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físico químicas de los polipéptidos se alteran.

Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo y similar.

[0027] Los aminoácidos esenciales en un polipéptido se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085).

En la técnica anterior, las mutaciones de alanina únicas se introducen en cada residuo en la molécula y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de alfa-amilasa para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula.

Ver 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 tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con la mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativo. Ver, 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.

La identidad de aminoácidos esenciales también se puede inferir a partir de un alineamiento con un polipéptido relativo.

[0028] Sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples, delecciones, y/o inserciones se pueden hacer y evaluar usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o redistribución, seguidos de un procedimiento de selección pertinente, tal como los descritos en Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU* 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625.

Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; patente EEUU nº 5,223,409; WO 92/06204), y mutagénesis dirigida por región (Derbyshire et al., 1986, *Gene* 46: 145; Ner et al., 1988, *DNA* 7: 127).

[0029] Métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con alto rendimiento, métodos de selección automatizados para detectar la actividad de polipéptidos clonados, mutagenizados expresados por células huésped (Ness et al., 1999, *Nature Biotechnology* 17: 893-896).

Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos de individuo en un polipéptido.

[0030] El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido donde una región de un polipéptido se fusiona en el N-terminal o el C-terminal de una región de otro polipéptido.

[0031] El polipéptido puede ser un polipéptido de fusión o polipéptido de fusión escindible donde otro polipéptido se fusiona en el N-terminal o el C-terminal del polipéptido de la presente invención.

Un polipéptido de fusión se produce por la fundición de un polinucleótido que codifica otro polipéptido a un polinucleótido de la presente invención.

Las técnicas para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica e incluyen la ligadura de las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estas están en el marco y que la expresión del polipéptido de fusión está bajo control del mismo promotor(es) y terminador.

Los polipéptidos de fusión también se pueden construir usando tecnología de inteína donde los polipéptidos de fusión se crean postraduccionalmente (cooper et al., 1993, *EMBO J.* 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, *Science* 266: 776-779).

[0032] Un polipéptido de fusión puede además comprender un sitio de escisión entre los dos polipéptidos.

En la secreción de la proteína de fusión, el sitio se divide liberando los dos polipéptidos.

Los ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero de forma no limitativa, los sitios descritos en el Martín et al., 2003, *J.*

Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina et al., 2000, *J. Biotechnol.* 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al., 1997, *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3488-3493; Ward et al., 1995, *Biotechnology* 13: 498-503; and Contreras et al., 1991, *Biotechnology* 9: 378-381; Eaton et al., 1986, *Biochemistry* 25: 505-512; Collins-Racie et al., 1995, *Biotechnology* 13: 982-987; Carter et al., 1989, *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 6: 240-248; and Stevens, 2003, *Drug Discovery World* 4: 35-48.

[0033] En un aspecto, los polipéptidos con actividad de alfa-amilasa de la presente invención muestran una termoestabilidad óptima.

Los polipéptidos con actividad de alfa-amilasa de las presentes invenciones son estables a 10 °C- 100 °C, preferiblemente 20 °C- 80 °C, más preferiblemente 30 °C- 70 °C.

Fuentes de polipéptidos con actividad de alfa-amilasa

[0034] Un polipéptido con actividad de alfa-amilasa de la presente invención se puede obtener de microorganismos de cualquier género.

Para fines de la presente invención, el término "se obtiene de" como se utiliza en este caso en relación con una fuente dada debe significar que el polipéptido codificado por un polinucleótido se produce por la fuente o por una cepa donde el polinucleótido ha sido insertado desde la fuente.

En un aspecto, el polipéptido obtenido a partir de una fuente dada es secretado extracelularmente.

[0035] El polipéptido puede ser un polipéptido fúngico.

En otro aspecto, el polipéptido es un polipéptido de *Penicillium*, por ejemplo, un polipéptido obtenido de *Penicillium oxalicum*, *Penicillium funiculosum* o *Penicillium purpurogenum*.

[0036] Se entiende que para las especies anteriormente mencionadas, la invención abarca los estados perfectos e imperfectos y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especies por el que estos son conocidos.

Los expertos en la técnica fácilmente reconocerán la identidad de equivalentes apropiados.

[0037] Las cepas de estas especies son accesibles fácilmente al público en un número de colecciones de cultivo, tal como la (ATCC) 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).

[0038] El polipéptido se puede identificar y obtener de otras fuentes que incluyen microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente de materiales naturales (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas anteriormente mencionadas.

Las técnicas para el aislamiento de microorganismos y ADN directamente de hábitats naturales se conocen en la técnica. Un polinucleótido que codifica el polipéptido puede luego ser obtenido seleccionando de forma similar un ADN genómico o genoteca de ADNc de otro microorganismo o muestra de ADN mezclado.

Una vez un polinucleótido que codifica un polipéptido ha sido detectado con la sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar por la utilización de técnicas que se conocen por aquellos técnicos en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

Dominios catalíticos

[0039] En una forma de realización, la presente invención también se refiere a dominios catalíticos con una identidad de secuencia para amino ácidos 21 a 493 de la SEC ID N.º: 4 de al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 %.

En un aspecto, los dominios catalíticos comprenden secuencias de aminoácidos que difieren en hasta 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, de aminoácidos 21 a 493 de la SEC ID N.º: 4.

[0040] El dominio catalítico preferiblemente comprende o consiste en los aminoácidos 21 a 493 de la SEC ID N.º: 4.

[0041] En otra forma de realización, la presente descripción también se refiere a dominios catalíticos codificados por polinucleótidos que hibridan bajo condiciones de astringencia muy bajas, condiciones de astringencia bajas, condiciones de astringencia medias, condiciones de astringencia medio altas, condiciones de astringencia altas o condiciones de astringencia muy altas (como se ha definido arriba) con nucleótidos (i) 61 a 1973 de la SEC ID N.º: 3, (ii) la secuencia de ADNc de los mismos o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii) (Sambrook et al., 1989, supra).

[0042] En otra forma de realización, la presente descripción también se refiere a dominios catalíticos codificados por polinucleótidos con una identidad de secuencia para nucleótidos 61 a 1973 de la SEC ID N.º: 3 de al menos 80 %, por ejemplo, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % o la secuencia de ADNc de los mismos.

El polinucleótido que codifica el dominio catalítico preferiblemente comprende o consiste en los nucleótidos 61 a 1973 de la SEC ID N.º: 3.

Dominios de unión

[0043] En una forma de realización, la presente descripción también se refiere a dominios de unión de carbohidrato con una identidad de secuencia con amino ácidos 511 a 619 de la SEC ID N.º: 4 de al menos 80 %, por ejemplo, al menos 85 %, 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 %, al menos 99 % o 100 %.

En un aspecto, los dominios de unión de carbohidrato comprenden secuencias de aminoácidos que difieren en hasta 10 aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de aminoácidos 511 a 619 de la SEC ID N.º: 4.

[0044] El dominio de unión de carbohidrato preferiblemente comprende o consiste en los aminoácidos 511 a 619 de la SEC ID N.º: 4 o una variante alélica del mismo; o es un fragmento del mismo con actividad de unión de carbohidrato.

[0045] En otra forma de realización, la presente descripción también se refiere a dominios de unión de carbohidrato codificados por polinucleótidos que hibridan bajo condiciones de astringencia muy bajas, condiciones de astringencia bajas, condiciones de astringencia medias, condiciones de astringencia medio altas, condiciones de astringencia altas o condiciones de astringencia muy altas (como se ha definido arriba) con (i) los nucleótidos 2025 a 2351 de la SEC ID N.º: 3 (ii) la secuencia de ADNc de los mismos o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii) (Sambrook et al., 1989, supra).

[0046] En otra forma de realización, la presente descripción también se refiere a dominios de unión de carbohidrato codificados por polinucleótidos con una identidad de secuencia para nucleótidos 2025 a 2351 de la SEC ID N.º: 3 de al menos 80 %, por ejemplo, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, por ejemplo, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 %.

[0047] El polinucleótido que codifica el dominio de unión de carbohidrato preferiblemente comprende o consiste en los nucleótidos 2025 a 2351 de la SEC ID N.º: 3.

[0048] En otra forma de realización, la presente descripción también se refiere a variantes de dominio de unión de carbohidrato de aminoácidos 511 a 619 de la SEC ID N.º: 4 que comprende una sustitución, delección y/o inserción a una o más (por ejemplo; diferentes) posiciones.

En un aspecto, el número de sustituciones de aminoácidos, delecciones y/o inserciones introducidas en la secuencia de aminoácidos 511 a 619 de la SEC ID N.º: 4 es hasta 10, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 o 10.

[0049] Un dominio catalítico operativamente vinculado al dominio de unión de carbohidrato puede ser a partir de una amilasa, preferiblemente, una alfa-amilasa, más preferiblemente, una alfa-amilasa ácida.

El polinucleótido que codifica el dominio catalítico puede ser obtenido de cualquier procariótico, eucariota u otra fuente.

Polinucleótidos

[0050] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido, un dominio catalítico o dominio de unión de carbohidrato de la presente invención, como se describe en este caso.

[0051] Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido se conocen en la técnica e incluyen el aislamiento de ADN genómico o ADNc o una combinación del mismo.

La clonación de los polinucleótidos de ADN genómico se pueden efectuar, por ejemplo, usando la reacción en una cadena de polimerasa bien conocida (PCR) o selección de anticuerpo de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas.

Ver, por ejemplo, Innis et al., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, New York.

Se pueden utilizar otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico tales como (LCR) reacción en cadena de la ligasa, transcripción activada de ligadura (LAT) y amplificación basada en polinucleótido (NASBA).

Los polinucleótidos se pueden clonar a partir de una cepa de polipéptido de *Penicillium* o un organismo relativo y así, por ejemplo, puede ser un alélico o variante de especies del polipéptido que codifican la región del polinucleótido.

[0052] La modificación de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención se puede necesitar para la sintetización de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido.

El término "sustancialmente similar" al polipéptido se refiere a formas que no se producen de manera natural del polipéptido.

Estos polipéptidos pueden diferir en alguna vía diseñada del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, variantes que difieren en la actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo o similar.

Las variantes se pueden construir basándose en el polinucleótido presentado como la secuencia de codificación del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 3 o la secuencia de ADNc del mismo, por ejemplo, una subsecuencia del mismo y/o por introducción de sustituciones de nucleótido que no suponen un cambio en la secuencia de

aminoácidos del polipéptido, pero que corresponden al uso de codón del organismo huésped destinado a la producción de la enzima o por introducción de sustituciones de nucleótido que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente.

Para una descripción general de sustitución de nucleótido, ver, por ejemplo, Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

Constructos de ácidos nucleicos

[0053] La presente descripción también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente vinculada a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia de codificación en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0054] Un polinucleótido se puede manipular en una variedad de vías para proveer la expresión del polipéptido. La manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser deseable o necesaria dependiendo del vector de expresión.

Las técnicas para la modificación de polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante se conocen en la técnica.

[0055] La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido que se reconoce por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención.

El promotor contiene secuencias de control transcripcionales que median la expresión del polipéptido.

El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre la actividad transcripcional en la célula huésped incluyendo mutante, truncado y promotores híbridos, y puede ser obtenido de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares bien homólogos o heterólogos a la célula huésped.

[0056] Los ejemplos de promotores adecuados para transcripción dirigente de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped bacteriana son los promotores obtenidos del gen de alfa-amilasa *Bacillus amyloliquefaciens* (amyQ), gen de alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amilo), gen de penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP), gen de amilasa maltogénica *Bacillus stearothermophilus* (amyM), gen de levansucrasa de *Bacillus subtilis* (sacB), genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis*, gen *Bacillus thuringiensis crillia* (Agaisse y Lereclus, 1994, Molecular Microbiology 13: 97-107), operón lac de *E. Coli*, promotor trc de *E. Coli* (Egon et al., 1988, Gene 69: 301-315), gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor* (dagA) y gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff et al., 1978, Proc.Natl. Acad. Sci. EE.UU 75: 3727-3731), al igual que el promotor tac (DeBoer et al., 1983, Proc.Natl. Acad. Sci. EE.UU 80: 21-25).

Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Gilberto et al., 1980, Scientific American 242: 74-94; y en Sambrook et al., 1989, supra.

Ejemplos de promotores en conjunto se describen en la WO 99/43835.

[0057] Ejemplos de promotores adecuados para la transcripción dirigente de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son promotores obtenidos de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* o glucoamilasa de *Aspergillus awamori* (glaA), TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa de *Trichoderma reesei* I, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa de *Trichoderma reesei* I, xilanasa de *Trichoderma reesei* II, xilanasa de *Trichoderma reesei* III, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei* y factor de alargamiento de traducción de *Trichoderma reesei*, al igual que el promotor NA2-tpi (un promotor modificado a partir de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido a partir de un gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus*; ejemplos no limitativos incluyen promotores modificados a partir de un gen de alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* donde el líder no traducido ha sido sustituido por un líder no traducido a partir de un *Aspergillus nidulans* o gen de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*); y mutante, truncado, y promotores híbridos de los mismos.

Otros promotores se describen en la patente EEUU nº 6,011,147.

[0058] En un huésped de levadura, los promotores útiles se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), galactocinasa de *Saccharomyces cerevisiae* (GAL1), deshidrogenasa de dehidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato de alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH1, aDH2/GAP) triosa fosfato isomerasa de *Saccharomyces cerevisiae*, (TPI) metalotioneína de *Saccharomyces cerevisiae* (CUP1) y quinasa de 3-fosfoglicerato de *Saccharomyces cerevisiae*.

Otros promotores útiles para células huésped de levadura se describen por Romanos et al., 1992, Yeast 8: 423-488.

[0059] La secuencia de control también puede ser un terminador de transcripción, que se reconoce por una célula huésped para terminar la transcripción.

El terminador está operativamente vinculado al 3'-terminus del polinucleótido que codifica el polipéptido.

5 Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped se puede utilizar en la presente invención.

[0060] Los terminadores preferidos para células huésped bacterianas son obtenidas de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus clausii* (aprH), alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (amilo) y RNA ribosómico de *Escherichia coli* (runB).

10 [0061] Los terminadores preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa de *Trichoderma reesei* I, xilanasa de *Trichoderma reesei* II, xilanasa de *Trichoderma reesei* III, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei* y factor de alargamiento de traducción de *Trichoderma reesei*.

20 [0062] Los terminadores preferidos para células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo de *Saccharomyces cerevisiae* C (CYC1) y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Otros terminadores útiles para células huésped de levadura se describen en Romanos et al., 1992, supra.

25 [0063] La secuencia de control también puede ser una región de estabilizador de ARNm abajo de un promotor y arriba de la secuencia de codificación de un gen que aumenta la expresión del gen.

[0064] Ejemplos de regiones estabilizadoras de ARNm adecuado se obtienen a partir de un gen bacillus thuringiensis crIII A (WO 94/25612) y un gen bacillus subtilis SP82 (Hue et al., 1995, Journal of bacteriology 177: 3465-3471).

30 [0065] La secuencia de control también puede ser un líder, una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped.

El líder está operativamente vinculado al 5'-terminal del polinucleótido que codifica el polipéptido.

35 Cualquier líder que sea funcional en la célula huésped puede ser utilizado.

[0066] Líderes preferidos para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

40 [0067] Los líderes adecuados para células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (ENO-1), quinasa de 3-fosfoglicerato de *Saccharomyces cerevisiae*, alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* y deshidrogenasa de deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato de alcohol de *Saccharomyces cerevisiae* (ADH2/GAP).

45 [0068] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente vinculada al 3'-terminal del polinucleótido y, cuando se transcribe, se reconoce por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito.

Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped puede ser utilizada.

50 [0069] Las secuencias de poliadenilación preferidas para células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger* TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

55 [0070] Las secuencias de poliadenilación útiles para células huésped de levadura se describen en Guo y Sherman, 1995, Mol. Cellular Biol. 15: 5983-5990.

[0071] La secuencia de control también puede ser una región de codificación del péptido señal que codifica un péptido señal vinculado al N-terminal de un polipéptido y dirige el polipéptido a la vía secretora de la célula.

60 El 5'-extremo de la secuencia de codificación del polinucleótido puede contener intrínsecamente una secuencia de codificación del péptido señal naturalmente vinculado en el marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia de codificación que codifica el polipéptido.

Alternativamente, el 5'-extremo de la secuencia de codificación puede contener una secuencia de codificación del péptido señal que es extranjera a la secuencia de codificación.

65 Se puede requerir una secuencia de codificación del péptido señal foráneo donde la secuencia de codificación naturalmente no contiene una secuencia de codificación del péptido señal.

Alternativamente, una secuencia de codificación del péptido señal foráneo puede sencillamente reemplazar la secuencia de codificación del péptido señal natural para mejorar la secreción del polipéptido.

Sin embargo, cualquier secuencia de codificación del péptido señal que dirige el polipéptido expresado en la vía secretora de una célula huésped puede ser utilizada.

[0072] Las secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped bacterianas son las secuencias de codificación del péptido señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, proteasas neutrales de *Bacillus stearothermophilus* (nprT, nprS, nprM) y *Bacillus subtilis* prsA.

Otros péptidos señal se describen en Simonen y Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.

[0073] Las secuencias codificantes del péptido señal eficaces para células huésped fúngicas filamentosas son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas de los genes para amilasa neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, celulasa de *Humicola insolens*, endoglucanasa V de *Humicola insolens*, lipasa *Humicola lanuginosa* y proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*.

[0074] Los péptidos señal útiles para células huésped de levadura se obtienen de los genes para alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

Otras secuencias codificantes del péptido señal útiles se describen en Romanos et al., 1992, *supra*.

[0075] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante del propéptido que codifica un propéptido posicionado en el N-terminal de un polipéptido.

El polipéptido resultante se conoce como una proenzima o propolipéptido (o un zimógeno en algunos casos).

Un propolipéptido es inactivo generalmente y se puede convertir a un polipéptido activo por escisión catalítica o autocatalítica del propéptido desde el propolipéptido.

La secuencia codificante del propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina de *Bacillus subtilis* (aprE), proteasa neutra de *Bacillus subtilis* (nprT), lacasa myceliophthora thermophila (WO 95/33836), proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei* y alfa-factor de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0076] Donde están presentes ambos péptidos señal y secuencias de propéptido, la secuencia de propéptido está

situada junto al N-terminal de un polipéptido y la secuencia de péptido señal está situada junto al N-terminal de la secuencia de propéptido.

[0077] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que regulen la expresión del polipéptido relativa al crecimiento de la célula huésped.

Ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que causan expresión del gen que se va a activar o desactivar en respuesta a una sustancia química o estímulo físico, con la presencia de un compuesto regulador.

Las secuencias reguladoras en sistemas procarióticos incluyen sistemas operadores lac, tac y trp.

En la levadura, se puede utilizar el sistema ADH2 o sistema GAL1.

En hongos filamentosos, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger*, promotor de TAKA alfa-amilasa *Aspergillus oryzae* y promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*, promotor de celobiohidrolasa de *Trichoderma reesei* I y promotor de celobiohidrolasa de *Trichoderma reesei* II se puede utilizar.

Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten para 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, el polinucleótido que codifica el polipéptido estaría operativamente vinculado a la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

[0078] La presente descripción también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor y señales de parada transcripcionales y traslacionales.

Las varias secuencias de nucleótidos y de control se pueden unir para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución del polinucleótido que codifica el polipéptido a tales sitios.

Alternativamente, el polinucleótido se puede expresar por la inserción del polinucleótido o un constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión.

En la creación del vector de expresión, la secuencia de codificación se localiza en el vector de modo que la secuencia de codificación está operativamente enlazada con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0079] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o viral) que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinantes y pueden provocar la expresión del polinucleótido.

La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector debe ser introducido.

El vector puede ser un plásmido lineal o cerrado circular.

[0080] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual 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 haya introducido en la célula huésped, se integre en el genoma y se replique con el cromosoma(s) en que se ha integrado.

Además, se puede usar un vector único o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula huésped o un transposón.

[0081] El vector contiene preferiblemente uno o más marcadores seleccionables que permiten la selección fácil de células transformadas, transfectadas, transducidas o similar.

Una etiqueta seleccionable es un gen, el producto del cual proporciona resistencia biocida o vírica, resistencia a metales pesados, prototrofia para auxótrofos y similar.

[0082] Ejemplos de marcadores seleccionables bacterianos son bacillus licheniformis o genes dal de Bacillus subtilis, o marcadores que confieren resistencia antibiótica tal como ampicilina, cloranfenicol, canamicina, neomicina, espectinomycin o resistencia a tetraciclina.

Los marcadores adecuados para células huésped de levadura incluyen, pero de forma no limitativa, ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRP1 y URA3.

Los marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero de forma no limitativa, adeA (sintasa de fosforribosilaminoimidazol-succinocarboxamida), adeB (sintasa de fosforribosilaminoimidazole), amdS (acetamidasa), argB (ornitina-carbamoyltransferasa), bar (fosfonitrilina acetiltransferasa), hph (higromicina fosfotransferasa), niaD (nitrato-reductasa), pyrG (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), sC (adeniltransferasa de sulfato) y trpC (antranilato sintasa), al igual que equivalentes de los mismos.

Preferidos para usar en una célula de Aspergillus son *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* amdS y genes pyrG y un gen bar *Streptomyces hygroscopicus*.

Preferidos para usar en una célula de Trichoderma son adeA, adeB, amdS, hph y genes pyrG.

[0083] El marcador seleccionable puede ser un sistema de marcador seleccionable doble como se describe en la WO 2010/039889.

En un aspecto, el marcador seleccionable doble es un sistema de marcador seleccionable doble hf-tk.

[0084] El vector contiene preferiblemente un elemento(s) que permite la integración del vector en el genoma de la célula huésped o replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0085] Para la integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia del polinucleótido 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 polinucleótidos adicionales para dirigir la integración por recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped a una ubicación(es) precisa en el cromosoma(s).

Para aumentar la probabilidad de integración a una ubicación precisa, los elementos integracionales deberían contener un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como 100 a 10,000 pares de bases, 400 a 10,000 pares de bases y 800 a 10,000 pares de bases, que tienen un alto grado de identidad de secuencia a la secuencia diana correspondiente para mejorar la probabilidad de recombinación homóloga.

Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia que es homóloga a la secuencia diana en el genoma de la célula huésped.

Además, los elementos integracionales pueden ser polinucleótidos de no codificación o codificación.

Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped por recombinación no-homóloga.

[0086] Para replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación que permita al vector replicarse autónomamente en la célula huésped en cuestión.

El origen de replicación puede ser cualquier replicador de plásmido que media la replicación autónoma que funciona en una célula.

El término "origen de replicación" o "replicador de plásmido" significa un polinucleótido que permite replicar in vivo un plásmido o vector.

[0087] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de plásmidos pBR322; pUC19; pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en el *E. Coli*, y pUB110; pE194; pTA1060 y pAM β 1 que permiten la replicación en el *Bacillus*.

- 5 [0088] Ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el origen de replicación de 2 micras, ARS1, ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, y la combinación de ARS4 y CEN6.

[0089] 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 Res. 15: 9163-9175; WO 00/24883).

- 10 El aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprenden el gen se pueden realizar según los métodos descritos en la WO 00/24883.

[0090] Más de una copia de un polinucleótido de la presente invención se puede insertar en una célula huésped para aumentar la producción de un polipéptido.

- 15 Un aumento en el número de copias del polinucleótido se puede obtener por la integración de al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable amplificable con el polinucleótido donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable y, por tanto, copias adicionales del polinucleótido, se puede seleccionar por el cultivo de las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0091] Los procedimientos usados para enlazar los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención se conocen por un experto en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook et al., 1989, supra).

- 25 Células huésped

[0092] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención operativamente vinculado a una o más secuencias de control que dirigen la producción de un polipéptido de la presente invención.

- 30 Una construcción o vector que comprende un polinucleótido se introduce en una célula huésped de modo que la construcción o vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosomal que se duplica como se describe anteriormente.

El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a mutaciones que se producen durante la replicación.

- 35 La elección de una célula huésped dependerá en gran parte del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

[0093] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, por ejemplo, una procariota o una eucariota.

- 40 [0094] La célula huésped procariótica puede ser cualquier bacteria gram-positiva o gram-negativa. Bacterias gram-positivas incluyen, pero de forma no limitativa, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Streptomyces*.

Las bacterias gram-negativas incluyen, pero de forma no limitativa, *Campylobacter*, *E. Coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *helicobacteria*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Ureaplasma*.

- 45 [0095] La célula huésped bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus* que incluye, pero no está limitado a, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y Células *Bacillus thuringiensis*.

- 50 [0096] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula *Streptococcus* que incluye, pero no está limitada a, *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus equi subesp. células de Zooepidemicus*.

- 55 [0097] La célula huésped bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces* que incluya, pero no esté limitada a, *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y células de *Streptomyces lividans*.

- 60 [0098] La introducción de ADN en una célula de *Bacillus* se puede efectuar por transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Chang and Cohen, 1979, Mol.Gen. Genet. 168: 111-115), transformación celular competente (ver, por ejemplo, Young y Spizizen, 1961, J.Bacteriol. 81: 823-829 o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, J.Mol. Biol. 56: 209-221), electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988 Biotechniques 6: 742-751) o conjugación (ver, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, J. Bacteriol. 169: 5271-5278). La introducción de ADN en una célula de *E. coli* se puede efectuar por transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Hanahan, 1983,

J.Mol. Biol. 166: 557-580) o electroporación (ver, por ejemplo, Dower et al., 1988, ácidos nucleicos Res. 16: 6127-6145).

La introducción de ADN en una célula de *Streptomyces* se puede efectuar por transformación de protoplasto, electroporación (ver, por ejemplo, Gong et al., 2004, Folia Microbiol. (Praha) 49: 399-405), conjugación (ver, por ejemplo, Mazodier et al., 1989, J.Bacteriol. 171: 3583-3585) o transducción (ver, por ejemplo, Burke et al., 2001, Proc.Natl. Acad. Sci. EE.UU 98: 6289-6294).

La introducción de ADN en una célula de *Pseudomonas* se puede efectuar por electroporación (ver, por ejemplo, Choi et al., 2006, J.Microbiol. Methods 64: 391-397) o conjugación (ver, por ejemplo, Pinedo y Smets, 2005, Appl. Environ. Microbiol. 71: 51-57).

La introducción de ADN en una célula de *Streptococcus* se puede efectuar por competencia natural (ver, por ejemplo, Perry y Kuramitsu, 1981, Infect.Immun. 32: 1295-1297), transformación de protoplasto (ver, por ejemplo, Catt y Jollick, 1991, Microbios 68: 189-207), electroporación (ver, por ejemplo, Buckley et al., 1999, Appl. Environ. Microbiol. 65: 3800-3804) o conjugación (ver, por ejemplo, Clewell, 1981, Microbiol. Rev. 45: 409-436).

Sin embargo, se puede usar cualquier método conocido en la técnica para la introducción de ADN en una célula.

[0099] La célula huésped también puede ser una eucariota, tal como un mamífero, insecto, planta o célula fúngica.

[0100] La célula huésped puede ser una célula fúngica. "Hongos" como se utiliza en este caso incluye el *Ascomycota* fila, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota* al igual que la *Oomycota* y todos los hongos mitospóricos (como se ha definido por Hawkswort et al., en, Ainswort and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8th edition, 1995, CAB Internacional, University Press, Cambridge, UK).

[0101] La célula huésped fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura" como se utiliza en este caso incluye levadura ascoesporógena (*Endomycetales*), levadura basidioesporogénea y levadura de los Fungi Imperfecti (*Blastomycetes*).

Ya que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe ser definida como se describe en *Biology and Activities of Yeast*, (Skinner, Passmore, and Davenport, editors, Soc. App.

Bacteriol. Serie de Simposios nº 9,1980).

[0102] La célula huésped de levadura puede ser una *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o célula de *Yarrowia*, tal como un *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis* o célula de *Yarrowia lipolytica*.

[0103] La célula huésped fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. "Fúngica filamentosa" incluye todas formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (como se ha definido 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.

Crecimiento vegetativo es por alargamiento hifal y catabolismo de carbono es aeróbico estrictamente.

En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* es por el injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

[0104] La célula huésped fúngica filamentosa puede ser un *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromices*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* o célula *Trichoderma*.

[0105] Por ejemplo, la célula huésped fúngica filamentosa puede ser un *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera*, *adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispore*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Fusarium bacridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola 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 célula de *Trichoderma viride*.

[0106] Las células fúngicas se pueden transformar por un proceso que implica la formación de protoplasto, transformación de los protoplastos y regeneración en cierto modo de la pared celular conocida *per se*.

Los procedimientos adecuados para transformación de *Aspergillus* y células huésped de *Trichoderma* se describen en EP 238023, Yelton et al., 1984, Proc.Natl. Acad. Sci. EE.UU 81: 1470-1474 y Christensen et al., 1988, Bio/Technology 6: 1419-1422.

Los métodos adecuados para la transformación de especies *Fusarium* se describen por Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156 y WO 96/00787.

La levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editors, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volume 194, pp 182-187, Academic Press, Inc., New York; Ito et al., 1983, J.Bacteriol. 153: 163; e Hinnen et al., 1978, Proc.Natl. Acad. Sci. EE.UU 75: 1920.

Métodos de producción

[0107] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprende (a) cultivo de una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones conductoras para la producción del polipéptido; y opcionalmente (b) recuperación del polipéptido.

En un aspecto preferido, la célula es una célula de *Penicillium*.

En un aspecto más preferido, la célula es una célula de *Penicillium oxalicum*.

[0108] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprende (a) cultivo de una célula huésped recombinante de la presente invención bajo condiciones conductoras para la producción del polipéptido; y opcionalmente (b) recuperación del polipéptido.

[0109] Las células huésped se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos de utilización conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden cultivar por cultivo en matraz de agitación o fermentación a pequeña o gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, lote, lote alimentado o de estado sólido) en el laboratorio o fermentadores industriales 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, que usan procedimientos conocidos en la técnica. Los 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 desde el medio.

Si el polipéptido no se segrega, se puede recuperar de lisatos de célula.

[0110] El polipéptido se puede detectar utilizando los métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos.

Estos métodos de detección incluyen, pero de forma no limitativa, 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.

[0111] El polipéptido se puede recuperar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar desde el medio nutritivo por procedimientos convencionales que incluyen, pero no de forma limitativa, colección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

En un aspecto, se recupera un caldo de fermentación entero que comprende el polipéptido.

[0112] El polipéptido se puede purificar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no están limitados a, cromatografía (por ejemplo, intercambio iónico, afinidad, cromatografía de exclusión de tamaño), procedimientos electroforéticos (por ejemplo, isoelectroenfoque preparativo), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación de sulfato amónico), SDS-PAGE o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, Janson and Ryden, editors, VCH Publishers, New York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

[0113] En un aspecto alternativo, el polipéptido no está recuperado, sino que una célula huésped de la expresión de presente invención del polipéptido se usa como una fuente del polipéptido.

Formulaciones de caldo de fermentación o composiciones celulares

[0114] La presente invención también se refiere a una formulación de caldo de fermentación o una composición celular que comprende un polipéptido de la presente invención.

El producto de caldo de fermentación comprende además ingredientes adicionales usados en el proceso de fermentación, tal como, por ejemplo, células (incluyendo, las células huésped con el gen que codifica de polipéptido de la presente invención que se usan para producir el polipéptido de interés), detrito celular, biomasa, medios de fermentación y/o productos de fermentación.

En algunas formas de realización, la composición es un caldo completo con inactivación celular que contiene ácido(s) orgánico(s), células inactivadas y/o detrito celular, y medio de cultivo.

[0115] El término "caldo de fermentación" como se utiliza en este caso se refiere a una preparación producida por fermentación celular que sufre una recuperación mínima o inexistente y/o purificación.

Por ejemplo, los caldos de fermentación se producen cuando los cultivos microbianos crecen para saturación, incubados bajo condiciones de limitación de carbón para permitir síntesis de proteína (por ejemplo, expresión de enzimas por células huésped) y secreción en el medio de cultivo celular.

El caldo de fermentación puede comprender contenidos no fraccionados o fraccionados de los materiales de fermentación derivados al final de la fermentación.

Típicamente, el caldo de fermentación no es fraccionado y comprende el medio de cultivo consumido y detrito celular presente después de las células microbianas (por ejemplo, células fúngicas filamentosas) son retiradas, por ejemplo, por centrifugación.

En algunas formas de realización, el caldo de fermentación contiene medio de cultivo celular consumido, enzimas extracelulares y células microbianas viables y/o no viables.

[0116] En una forma de realización, la formulación de caldo de fermentación y composiciones celulares comprenden un primer componente de ácido orgánico que comprende al menos un 1-5 ácido orgánico de carbono y/o una sal derivada y un segundo componente de ácido orgánico que comprende al menos un 6 o más ácido orgánico de carbono y/o una sal derivada.

En una forma de realización específica, el primer componente de ácido orgánico es ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, una sal derivada o una mezcla de dos o más de los anteriormente mencionados y el segundo componente de ácido orgánico es ácido benzoico, ácido ciclohexanecarboxílico, ácido 4-metilvalérico, ácido fenilacético, una sal derivada o una mezcla de dos o más de los anteriormente mencionados.

[0117] En un aspecto, la composición contiene un ácido(s) orgánico y opcionalmente otro contiene células inactivadas y/o detrito celular.

En una forma de realización, las células inactivadas y/o detrito celular se retiran a partir de un caldo completo con inactivación celular para proporcionar una composición que está libre de estos componentes.

[0118] Las formulaciones de caldo de fermentación o composiciones celulares pueden comprender además un conservante y/o anti-microbiano (por ejemplo; agente bacterioestático), incluyendo, pero no de forma limitada, sorbitol, cloruro sódico, sorbato de potasio y otros conocidos en la técnica.

[0119] Las formulaciones de caldo de fermentación o composiciones celulares pueden comprender además actividades enzimáticas múltiples, tales como una o más (por ejemplo; diferentes) enzimas seleccionadas del grupo que comprende; una alfa-amilasa fúngica (EC 3.2.1.1), una beta-amilasa (E.C. 3.2.1.2), una glucoamilasa (E.C.3.2.1.3), unas pululanases (E.C. 3.2.1.41 una fitasa (E.C.3.1.2.28) y una proteasa (E.C. 3.4.). La glucoamilasa puede preferiblemente derivarse de una cepa de *Aspergillus sp.*, tal como *Aspergillus niger* o de una cepa de *Talaromyces sp.* y en particular derivarse de *Talaromyces leycettanus* como la glucoamilasa descrita en la patente EEUU no. Re. 32,153, *Talaromyces duponti* y/o *Talaromyces termopilas* tales como las glucoamilasas descritas en la patente EEUU nº 4,587,215 y más preferiblemente derivadas de *Talaromyces emersonii*.

De la forma más preferible, la glucoamilasa se deriva de la cepa de *Talaromyces emersonii* CBS 793.97 y/o con la secuencia descrita como SEC ID N.º: 7 en la WO 99/28448.

Mayormente, es preferible una glucoamilasa que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o incluso al menos 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada.

[0120] El caldo completo con inactivación celular o composición puede contener los contenidos no fraccionados de los materiales de fermentación derivados al final de la fermentación.

Típicamente, el caldo completo con inactivación celular o composición contiene el medio de cultivo consumido y detrito celular presente después de que las células microbianas (por ejemplo, células fúngicas filamentosas) crezcan por saturación, condiciones incubadas bajo limitación de carbón para permitir la síntesis de proteína (por ejemplo, expresión de celulasa y/o enzima(s) de glucosidasa).

En algunas formas de realización, el caldo completo con inactivación celular o composición contiene el medio de cultivo celular consumido, enzimas extracelulares y células fúngicas filamentosas sin actividad.

En algunas formas de realización, las células microbianas presentes en el caldo completo con inactivación celular o composición se pueden permeabilizar y/o lisar usando métodos conocidos en la técnica.

[0121] Un caldo completo o composición celular como se describe en este caso es típicamente un líquido, pero puede contener componentes insolubles, tales como células inactivadas, detrito celular, componentes de medios de cultivo y/o enzima(s) insolubles.

En algunas formas de realización, los componentes insolubles se pueden retirar para proporcionar una composición líquida clarificada.

[0122] Las formulaciones de caldo completo y composiciones celulares de la presente invención se pueden producir por un método descrito en la WO 90/15861 o la WO 2010/096673.

[0123] Abajo se dan ejemplos de usos preferidos de las composiciones de la presente invención.

- 5 La dosificación de la composición y otras condiciones bajo las que se usa la composición se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

Composiciones enzimáticas

- 10 [0124] 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 mejora celulolítica de la composición ha sido aumentada, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1.1.

- 15 [0125] Las composiciones pueden comprender un polipéptido de la presente invención como el componente enzimático principal, por ejemplo, una composición monocomponente.

Alternativamente, las composiciones pueden comprender actividades enzimáticas múltiples, tal como una o más (por ejemplo; varias) enzimas seleccionadas del grupo que comprende; una alfa-amilasa fúngica (EC 3.2.1.1), una beta-amilasa (E.C. 3.2.1.2), una glucoamilasa (E.C.3.2.1.3), unas pululanazas (E.C. 3.2.1.41), una fitasa (E.C.3.1.2.28) y una proteasa (E.C. 3.4.). La glucoamilasa preferiblemente se puede derivar de una cepa de *Aspergillus sp.*, tal como *Aspergillus niger* o de una cepa de *Talaromyces sp.* y en particular derivada de *Talaromyces leycettanus* como la glucoamilasa descrita en la patente EEUU nº.

- 20 Re. 32,153, *Talaromyces duponti* y/o *Talaromyces termopilas* tal como las glucoamilasas descritas en la patente EEUU nº 4,587,215 y, más preferiblemente, derivadas de *Talaromyces emersonii*.

De la forma más preferible, la glucoamilasa se deriva de la cepa *Talaromyces emersonii* CBS 793.97 y/o tienen la secuencia descrita como SEC ID N.º: 7 en la WO 99/28448.

Mayormente, es preferible una glucoamilasa que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o incluso al menos 99 % de identidad a la secuencia de aminoácidos anteriormente mencionada.

- 30 Una preparación comercial de glucoamilasa de *Talaromyces* se suministra por Novozymes A/S como SPIRIZYME FUEL.

[0126] Para una composición que comprende el polipéptido de la presente invención y una glucoamilasa también se prefieren polipéptidos con actividad de glucoamilasa que se derivan a partir de una cepa del género *Trametes*, preferiblemente *Trametes cingulata*.

Mayormente, es preferible polipéptido con actividad de glucoamilasa y tiene al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o incluso al menos 95 % de identidad con aminoácidos para polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 2 en la WO 2006/069289.

- 40 [0127] Para una composición que comprende el polipéptido de la presente invención y una glucoamilasa también se prefieren polipéptidos con actividad de glucoamilasa que se derivan de una cepa del género *Pachykytospora*, preferiblemente *Pachykytospora papyracea* o la cepa de *E. Coli* depositada en DSMZ y dado el nº. DSM 17105.

Además, se prefieren polipéptidos con actividad de glucoamilasa y con al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o incluso al menos 95 % de identidad con aminoácidos para polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 5 en la WO 2006/069289.

- 50 [0128] La composición anteriormente descrita puede comprender preferiblemente alfa-amilasa ácida presente en una cantidad de 0,01 a 10 AFAU/g DS, preferiblemente 0,1 a 5 AFAU/g DS, más preferiblemente 0,15 a 3 AFAU/g DS y de la forma más preferible 0,3 a 2 AFAU/g DS.

La dosificación de la composición de polipéptido de la invención y otras condiciones bajo las que se usa la composición se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

[0129] Las composiciones de polipéptido se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de un líquido o una composición seca.

Por ejemplo, la composición de polipéptido puede estar en forma de granulado o un microgranulado.

El polipéptido que se va a incluir en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

- 60 Usos

[0130] La presente invención también está dirigida a métodos para utilizar los polipéptidos con actividad de alfa-amilasa o composiciones de los mismos.

[0131] El polipéptido o la composición de la presente invención se puede utilizar en la conversión de almidón, conversión de almidón a azúcar y producción de etanol, etc, por ejemplo, en la licuefacción y/o sacarificación de un almidón gelatinizado o un almidón granulado, al igual que un almidón gelatinizado parcialmente.

Un almidón gelatinizado parcialmente es un almidón que hasta cierto punto está gelatinizado, es decir, donde parte del almidón se ha hinchado irreversiblemente y gelatinizado, y parte del almidón sigue estando presente en un estado granulado. Se puede usar en un proceso para el almidón de licuefacción, donde un sustrato de almidón granulado o gelatinizado se trata en un medio acuoso con la enzima.

El polipéptido o la composición de la presente invención también se puede usar en un proceso para sacarificación de un sustrato de almidón licuado.

Un uso preferido es en un proceso de fermentación donde un sustrato de almidón es licuado y/o sacarificado en presencia del polipéptido o la composición de la presente invención para producir glucosa y/o maltosa adecuada para la conversión en un producto de fermentación por un organismo fermentador, preferiblemente una levadura.

Tales procesos de fermentación incluyen un proceso para producir etanol para combustible o etanol potable (alcohol portátil), un proceso para producir una bebida, un proceso para producir compuestos orgánicos deseados, tal como ácido cítrico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, gluconato de sodio, gluconato de calcio, gluconato de potasio, glucono delta lactona o eritorbato de sodio; cetonas; aminoácidos, tal como ácido glutámico (monoglutaminato de sodio), pero también compuestos más complejos tales como antibióticos, tal como penicilina, tetraciclina; enzimas; vitaminas, tal como riboflavina, B12, beta-caroteno; hormonas, que son difíciles de producir sintéticamente.

[0132] Además, debido a la actividad de hidrólisis superior del polipéptido de la presente invención, la cantidad de glucoamilasa durante la etapa de sacarificación puede ser reducida.

La glucoamilasa puede preferiblemente derivarse a partir de una cepa dentro de *Aspergillus sp.*, *Talaromyces sp.*, *Pachykytospora sp.* o *Trametes sp.*, más preferiblemente de *Aspergillus niger*, *Talaromyces emersonii*, *Trametes cingulata* o *Pachykytospora papyracea*.

[0133] En una forma de realización preferida, el polipéptido de la presente invención se usa en un proceso que comprende fermentación para producir un producto de fermentación, por ejemplo, etanol, a partir de un almidón gelatinizado.

Tal proceso para producir etanol de almidón gelatinizado por fermentación comprende:

- (i) licuefacción del almidón gelatinizado con un polipéptido con actividad de alfa-amilasa de la presente invención; (ii) sacarificación del triturado licuado obtenido; (iii) fermentación del material obtenido en la etapa (ii) en presencia de un organismo fermentador.

Opcionalmente, el proceso comprende además la recuperación del etanol.

La sacarificación y fermentación se puede realizar como una sacarificación simultánea y proceso de fermentación (SSF proceso).

[0134] En otra forma de realización preferida, el polipéptido de la presente invención se usa en un proceso que comprende la fermentación para producir un producto de fermentación, por ejemplo, etanol, a partir de un almidón no gelatinizado ("crudo").

Tal proceso para producir etanol de material que contiene almidón no gelatinizado por fermentación comprende: (i) contacto del almidón no gelatinizado con un polipéptido con actividad de alfa-amilasa de la presente invención para degradar el almidón no gelatinizado; (ii) sacarificación del triturado obtenido; (iii) fermentación del material obtenido en la etapa (ii) en presencia de un organismo fermentador.

Opcionalmente, el proceso comprende además la recuperación del etanol.

La sacarificación y fermentación se puede realizar como una sacarificación simultánea y proceso de fermentación (SSF proceso).

[0135] En otras formas de realización, el polipéptido de la presente invención también puede ser útil en textil, tejido o desengolado de prenda o lavado, en la cocción, detergente y pulpa, y producción de papel.

[0136] En otro aspecto, la presente descripción proporciona un método de uso de la alfa-amilasa de la presente invención para producir glucosa o maltosa, o similar de almidón.

[0137] Las alfa-amilasas de la invención también se pueden usar en procesos de elaboración de cerveza.

Además, la alfa-amilasa de la invención se puede utilizar para producción de maltosa.

El jarabe rico en maltosa se produce típicamente de la siguiente manera.

Para producir "jarabe rico en maltosa" (con un contenido de 50-55 % en maltosa), el almidón se licua para DE 10-20.

El pH y temperatura del almidón licuado se ajusta a 65 °C y a un pH alrededor de 5.0, respectivamente, y está sujeto a actividad de alfa-amilasa maltogénica (por ejemplo, amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, tal como Maltogenase™ 4000 L, 0.4 l/t DS (Novozymes)), actividad de pululanasa (por ejemplo, pululanasa de *Bacillus*, tal como Promozyme™ 600 L, 0.3 l/t DS (Novozymes)) y actividad de alfa-amilasa (por ejemplo, BAN 240 L o Termamyl™ 120 L, tipo LS, 0.4 kg/t DS (Novozymes)) durante 24-41 horas.

El tiempo de proceso específico depende del espectro de sacárido deseado que se va a conseguir.

Mediante el aumento de la dosificación de la alfa-amilasa maltogénica y pululanasa, el contenido de maltosa puede ser aumentado.

[0138] Alternativamente, "jarabe rico en maltosa" se puede producir por el primer almidón de licuefacción para DE 10-20 y luego ajustar el pH y temperatura a 55 °C o más alta y un pH alrededor de 5,5 o menos, y luego se somete el almidón licuado a una actividad de alfa-amilasa fúngica (por ejemplo, amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, tal como Fungamyl™ 800L (Novozymes)) durante 22-44 horas.

La dosificación de Fungamyl™ fúngica 800L depende del tiempo de sacarificación previsto, por ejemplo, 200 g/t DS durante 44 horas y 400 g/t DS durante 22 horas.

Las alfa-amilasas de la invención pueden sustituir el Fungamyl™ 800L en el proceso anterior, y luego la temperatura puede ser incluso más alta, y el pH aún inferior, dando como resultado un índice de conversión más rápida, y así una mejor economía en general.

[0139] Para producir almidón "jarabe rico en maltosa" con contenido en maltosa de 55-65 % el almidón se licua para DE 10-20.

La temperatura y el pH del almidón licuado se ajusta a 60 °C o más alto, y a un pH alrededor de 6 o inferior, y está sujeto a una actividad de alfa-amilasa maltogénica (por ejemplo, Maltogenase™ 4000 L, 0.25-1.0 l/t DS (Novozymes)), y actividad de alfa-amilasa fúngica (por ejemplo, amilasa de *Aspergillus*, tal como Fungamyl™ 800 L, 0.4-1.0 kg/t DS (Novo Nordisk) durante 24-48 horas; o la alfa-amilasa de la presente invención para un tiempo más corto.

[0140] La presente invención posteriormente se describe por los ejemplos siguientes.

Ejemplos

Materiales

[0141] Productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos una calidad reactiva.

Cepas

[0142] La cepa fúngica NN051380 fue aislada a partir de una muestra de tierra recogida de China con medio PDA a 25 °C utilizando el método de placa de dilución.

Luego se purificó por transferencia un conidio único sobre una placa de agar YG.

La cepa NN051380 se identificó como *Penicillium oxalicum* basada tanto en características morfológicas como en su secuencia ADN.

Medios

[0143] El medio PDA fue compuesto por 39 gramos de agar de dextrosa de patata y agua desionizada a 1 litro.

[0144] Las placas de agar YG estaban compuestas por 5,0 g de extracto de levadura, 10, 0 g de glucosa, 20, 0 g de agar y agua desionizada a 1 litro.

[0145] El medio YPG contenía 0,4 % de extracto de levadura, 0,1 % de KH₂PO₄, 0,05 % de MgSO₄·7H₂O, 1,5 % de glucosa en la agua desionizada.

[0146] El medio YPM contenía 1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona y 2 % de maltosa en el agua desionizada.

[0147] El medio MD estba compuesto por 1, 34 % YNB, 4X10⁻⁵ % biotina y 2 % dextrosa.

Para placas, se añadió 7,5 g de agar a 200ml de agua autoclave, se enfrió a 60 °C y luego se añadieron 25 ml de 10X YNB, 25ml de 10 X D-glucosa y 400 µl de 500X biotina.

[0148] BMSY se compuso por 1 % extracto de levadura, 2 % peptona (bacto), 100mM tampón de fosfato potásico, pH 6.0, 1.34 % YNB, 4X10⁻⁵ % biotina y 1,82 % Sorbitol.

10 G de extracto de levadura, 20 g peptona (bacto) y 18.2g Sorbitol se disolvieron en 800 ml agua y fueron sometidas a autoclave durante 20 minutos en el ciclo líquido.

Cuando el medio sometido a autoclave se enfrió para la cámara de temperatura, se añadieron 100 ml de 1 M tampón de fosfato potásico (pH 6.0) y 100 ml de 10X YNB y 2 ml de 500X biotina.

Determinación de actividad de alfa-amilasa

[0149] La actividad de cualquier 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 almidón de sustancia seca por hora bajo las condiciones estándar mencionadas debajo.

[0150] Alfa-amilasa ácida, es decir, alfa-amilasa estable en ácido, una endo-alfa-amilasa (1,4-alfa-D-glucan-glucano-hidrolasa, E.C. 3,2,1,1) hidroliza enlaces alfa-1,4-glucosídicos en las regiones internas de la molécula de almidón para formar dextrinas y oligosacáridos con longitudes de cadena diferentes.

La intensidad de color formada con yodo es directamente proporcional a la concentración de almidón.

La actividad amilasa se determina utilizando colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón bajo las condiciones analíticas específicas.

[0151] Condición de reacción: se mezclan 10 microlitros estándar o muestra enzimática, 70 microlitros H₂O y 80 microlitros solución de trabajo de almidón (la concentración final fue almidón 0,35 g/L, tampón acetato 50 mM pH 5,0, NaCl 0,1 M, CaCl₂ 3 mM) y reaccionan durante 2 minutos con la agitación a 37 °C.

Se añaden 40 microlitros de solución de trabajo de yodo (la concentración de yodo final fue 0,04 g/L) y reacciona a 37 °C durante 1 minuto.

Lectura OD590 (antes de lectura, agitar 10 segundos).

[0152] FUNGAMYL™ (disponible de Novozymes A/S) se usa como estándar.

Ejemplo 1: extracción de ADN genómico *Penicillium oxalicum*

[0153] Cepa *Penicillium oxalicum* NN051380 fue inoculada sobre una placa PDA e incubada durante 3 días a 25 °C en la oscuridad.

Los diferentes tapones de micelios-PDA fueron inoculados en frascos de agitación de 500 ml que contenían 100 ml de medio YPG.

Los matraces fueron incubados durante 3 días a 25 °C con la agitación a 160 r.p.m..

Los micelios fueron recogidos por filtración a través de MIRACLOTH® (Calbiochem, La Jolla, CA, EE.UU.) y congelados en el nitrógeno líquido.

Los micelios congelados fueron molidos, por un mortero y una mano de mortero, a un polvo fino, y ADN genómico fue aislado utilizando la columna a gran escala fúngica DNA (BAOMAN biotecnología, Shanghai, China) seguida de la instrucción del fabricante.

Ejemplo 2: secuenciación de genoma, ensamblaje y anotación

[0154] Las muestras de ADN genómico extraídas fueron entregadas al Beijing Genome Institute (BGI, Shenzhen, China) para secuenciación de genoma usando el sistema ILLUMINA® GA2 (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Las lecturas de crudo se ensamblaron a BGI usando el programa SOAPdenovo (Li et al. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing. *Genoma Res* (2010) vol. 20 (2) págs. 265-72).

Las secuencias ensambladas se analizaron utilizando métodos de bioinformática estándar para el hallazgo del gen y predicción funcional.

Brevemente, genID (Parra et al., 2000, *Genome Research* 10(4):511-515) se usó para predicción de gen.

Blastall versión 2.2.10 (Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (October 1990). "herramienta de búsqueda de alineamiento local básico".

J Mol Biol 215 (3): 403-410, <http://blast.NCBI.NLM.nih.gov/Blast.cgi>) y HMMER versión 2.1.1 (<http://hmmer.janelia.org/>) se usaron para predecir la función basada en homología estructural.

La familia GH13 de polipéptidos enzimáticos fueron identificados directamente por análisis de los resultados de Blast.

Agene programa (Munch K, Krogh A.

Automatic generation of gene finders for eukaryotic species. *BMC Bioinformatics*. BMC. 2006, 7: 263) y programa SignalP (Nielsen et al., 1997, *Protein Engineering* 10: 1-6) se usaron para identificar codones de inicio.

Programa SignalP además se usó para estimar la longitud del péptido señal.

El programa Pepstats (Rice P, Longden I, Bleasby A: EMBOSS: THE European Molecular Biology Open Software Suite.

Trends Genet. 2000,16(6):276-277) se usó para estimar el punto isoeléctrico de proteínas y peso molecular.

Ejemplo 3: preparación de ARN total de la cepa *Penicillium oxalicum* y ADNc

[0155] ARN total se obtuvo a partir de los micelios en polvo usando equipo mini planta RNeasy, (QIAGEN, CAT. No.74904). El ADNc fue sintetizado siguiendo la instrucción de 3' amplificación rápida de sistema de extremo de ADNc (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA).

Ejemplo 4: clonación de los genes de alfa-amilasa *Penicillium oxalicum* de ADNc

[0156] Dos genes, S1 (P243SV, correspondientes a SEC ID N.º: 1) y S2 (P23WU1, correspondientes a SEC ID N.º: 3), identificados como GH13 alfa-amilasa se seleccionaron para la expresión de clonación.

[0157] Basados en la información de ADN obtenida de secuenciación de genoma, los cebadores oligonucleótidos, mostrados a continuación en la tabla 1, se diseñaron para amplificar todos los ADNc de *Penicillium oxalicum*.

Cebadores fabricados por Invitrogen (Invitrogen, Pékin, China).

Tabla 1: cebadores

Cebadores	Secuencia (5'-3')
S1 avance (SEC ID N.º: 5)	ATTATTCGAAGGATCCACC atgttcttcacatcctcggtctgct
S1 retroceso (SEC ID N.º: 6)	GGTGCTGATGGAATTC ggaataaccacacaatccgctgc
S2 avance (SEC ID N.º: 7)	ATTATTCGAAGGATCCACC atgaaattccttgactagctgcttgg
S2 retroceso (SEC ID N.º: 8)	GGTGCTGATGGAATTC cctccacgtagcagtgacagtgg

[0158] Los caracteres minúsculos representan las regiones de codificación de los genes, mientras las partes capitalizadas fueron homólogas a los sitios de inserción del vector pLIZG8HQ.

El vector de expresión pLIZG8HQ contenía el factor a la señal de secreción derivada de *S. cerevisiae*, el 5'AOX1 promotor derivado de *Pichia pastoris* y los elementos terminadores 3'AOX1 alcohólico oxidase1.

Además pLIZG8HQ tenía pBR322 secuencias derivadas para la selección y propagación en el *E. coli* y un gen His4, que codificó una deshidrogenasa de histidinol derivada de *Pichia pastoris* para la selección de un transformante de una cepa His *Pichia* mutante.

[0159] Para cada gen, los 20 picomoles de par de cebador (cada hacia delante e inversa) fueron usados en una reacción PCR compuesta por 2µl de ADNc oxalicum de *Penicillium*, tampón 5X GC de 10 µl, 1,5µl de DMSO, 2,5 mM cada uno de dATP, dTTP dGTP, y dCTP, y 0,6 unidades de polimerasa de DNA de alta fidelidad de Phusion™ (Finnzymes Oy, Espoo, Finlandia) en un volumen final de 50 µl.

La amplificación se realizó utilizando un ciclador térmico de Peltier (M J Research Inc., South San Francisco, CA, EE.UU) programado para la desnaturalización a 98 °C durante 1 minuto; 8 ciclos de la desnaturalización de 98 °C durante 15 segundos, recocimiento a 65 °C durante 30 segundos, con una reducción de 1 °C por ciclo y alargamiento a 72°C durante 75 segundos; y otros 24 ciclos cada uno a 98 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 75 segundos; extensión final a 72 °C durante 10 minutos.

El bloque de calor luego fue a un ciclo de absorción de 4 °C.

[0160] Los productos PCR se aislaron por electroforesis en gel de agarosa 1,0 % utilizando 90mM Tris-borate y 1 mM tampón (TBE) de EDTA donde una banda de producto único a 2.0kb de cada reacción fue visualizada bajo luz UV.

Los productos PCR fueron luego purificados de la solución usando un PCR GFX ADN ilustra y equipo de purificación de banda de Gel (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) según las instrucciones del fabricante.

[0161] Plásmido pLIZG8HQ se digirió con Bam I y EcoR I, aislado por 1,0 % de electroforesis en gel de agarosa usando un tampón TBE (Tris/Borate/EDTA tampón), y purificó utilizando un PCR GFX ADN ilustra y equipo de purificación de banda de Gel según las instrucciones del fabricante.

[0162] Un equipo de clonación in fusión CF Dry-down (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, EE.UU) se usó para clonar el fragmento directamente en el vector de expresión pLIZG8HQ, sin la necesidad de digestión de restricción y ligamiento.

[0163] Los productos PCR respectivos S1 y S2 se ligaron al vector digerido pLIZG8HQ utilizando un equipo de clonación in fusión CF Dry-down PCR (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, EE.UU) dando como resultado plásmidos pS1 y pS2 respectivamente.

La operación de clonación se realizó según la instrucción del fabricante.

En resumen, para cada reacción de ligamiento 30 ng de pLIZG8HQ digerida con Bam I y EcoR I, y 60 ng del producto PCR purificado de alfa-amilasa *Penicillium oxalicum* se añadieron al frasco de reacción y se resuspendieron el polvo en un volumen final de 10µl con adición de agua desionizada.

La reacción se incubó a 37 °C durante 15 minutos y luego a 50 °C durante 15 minutos.

Tres microlitros de los productos reactivos se usaron para transformar células competentes *E. Coli* TOP10 (TIANGEN Biotech (Beijing) Co.

Ltd., Beijing, China). Transformantes de *E. Coli* que contienen constructos de expresión fueron detectados por colonia PCR y ADN plásmido se preparó utilizando un equipo de minipreparación Qiaprep Spin (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA).

Los genes de alfa-amilasa *Penicillium oxalicum* insertados en pS1 y pS2 se confirmaron por la secuenciación del ADN utilizando 3730XL analizadores de ADN (Applied Biosystems Inc, Foster city, CA, USA).

Ejemplo 5: expresión de genes de alfa-amilasa *Penicillium oxalicum* en *Pichia pastoris*

Preparación celular competente de *Pichia pastoris*

[0164] La densidad óptica (OD) del cultivo durante toda la noche de *Pichia pastoris* en YPM en el matraz de agitación fue 1,0. Las células fueron granuladas por centrifugación a 2000rpm, 5 min, 4 °C. El granulado celular fue luego suspendido en el YPD más ácido 4-(2-hidroxietilo)-1-piperazineethanesulfónico (HEPES) y (DTT) ditiotreitól y en posición a 30 °C durante 15 minutos. Las células fueron granuladas y lavadas con agua fría y 1 M de sorbitol subsecuencialmente. Finalmente, las células fueron suspendidas en una pequeña cantidad de 1 M sorbitol y almacenadas en 40µl partes alícuotas a -70 °C.

Transformación de pS1 y pS2 a *Pichia pastoris*

[0165] Cinco miligramos de ADN plásmido pS1 o pS2 se linealizaron con PmeI conduciendo a la inserción del plásmido en el locus cromosómico 5'AOX1. ADN plásmido linealizado (500ng) se mezcló con 40µl de células competentes y almacenadas en el hielo durante 5 min. Las células fueron transferidas a un hielo de 0,2 cm de cubeta de electroporación. La transformación se realizó utilizando un GenePulser II (BioRad, 2000 Alfred Nobel Drive, Hercules, CA 94547). Los parámetros usados fueron 1500 V, 50µF y 200Ω. Inmediatamente después de la pulsación, las células fueron suspendidas en 1 ml de 1 M sorbitol helado. Las mezclas fueron colocadas en placas MD. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 3-4 días.

La selección de clones para la expresión a pequeña escala

[0166] Cuatro clones candidatos de cada transformación se cultivaron en una escala de 3 ml utilizando placas de 24-de profundidad (Whatman, UK). Las células crecieron en medios BMSY durante 2.5 días a 28 °C con agitación vigorosa. 0,5 % de metanol se añadió al cultivo para inducir la expresión génica heteróloga. El cultivo creció continuamente durante 4 días con una adición diaria de 0,5 % de metanol bajo la misma condición de crecimiento. Se tomaron a diario muestras de cultivo durante la inducción y se almacenaron a -20 °C para análisis SDS-PAGE y ensayo de actividad de amilasa.

[0167] El cultivo de pS1 y pS2 mostró una banda proteínica a 55KD y 65KD visualizada respectivamente en SDS-PAGE y la actividad de amilasa por la prueba contra la AZCL amilosa.

Ejemplo 6: la purificación de las alfa-amilasas de la presente invención

[0168] El pH del cultivo de sobrenadante se ajustó a 7.0 con NaOH, luego se filtró a través de un filtro 0,45 µm. La solución se aplicó a una columna de alto rendimiento 30ml Ni-sepharose (GE Healthcare) equilibrada con 20mM de suero salino tamponado con fosfato (PBS) que contiene 0,3 M NaCl a pH 7,0. La proteína se eluyó con un gradiente de imidazol lineal (0-500mM). Las fracciones de la columna se analizaron para actividad de amilasa.

[0169] Las fracciones con actividad de amilasa se controlaron por SDS-PAGE y las fracciones puras fueron agrupadas. El SDS-PAGE mostró que el peso molecular de P243SV fue aproximadamente 55 kDa y el peso molecular de P23WU1 fue aproximadamente 65 kDa.

Ejemplo 7: caracterización de la alfa-amilasa de la presente invención

[0170] Estas dos alfa-amilasas como se han purificado en el ejemplo 6 fueron analizadas. Los resultados fueron mostrados en la tabla 2 y tabla 3, respectivamente.

Tabla 2 el resultado analítico de P243SV

Análisis	Proteína entera
Longitud	505 aa
Peso molecular	56742,60 Dalton
1 Microgramo =	17, 623 pMoles
Coeficiente de extinción Molar	92660
A[280] de 1 mg/ml	1.63 AU
Punto isoeléctrico	5,12
carga a pH 7	-13,51

Tabla 3 el resultado analítico de P23WU1

Análisis	Proteína entera
Longitud	619 aa
Peso molecular	66895,60
1 Microgramo =	14, 949 pMoles
Coeficiente de extinción Molar	128010
A[280] de 1 mg/ml	1,91 AU
Punto isoeléctrico	5,62
Carga a pH 7	-6,67

[0171] Estas dos alfa-amilasas como se han purificado en el ejemplo 6 fueron además caracterizadas según los métodos siguientes.

Ensayo de AZCL-HE-amilosa

[0172] Tres microlitros de muestras de alfa-amilasa y 100µl 0,2 % AZCL-HE-amilosa (Megazyme internacional Ireland Ltd.) a pH 4,3 se mezclaron separadamente en una placa de microtitulación y se colocaron en el hielo antes de la reacción.

El ensayo se inició por transferencia de la placa de microtitulación a un termomezclador Eppendorf, que fue establecido a la temperatura de ensayo 40 °C.

Luego el 60µl sobrenadante fue transferido a una placa de microtitulación nueva.

Densidad óptica a 595 nm (OD₅₉₅) se leyó como una medida de actividad de amilasa.

Toda la reacción se hizo con duplicado y un tampón ciego fue incluido en el ensayo (en vez de enzima).

[0173] Las adsorbancias para P243SV y P23WU1 a OD₅₉₅ son 0,33 y 0,67, respectivamente, que muestran que P243SV y P23WU1 tienen actividad de amilasa.

Perfil de pH

[0174] Tres microlitros de muestras de enzima y 40 µl 1% AZCL-HE-amilosa en 100 µl B&R tampón (tampón Britton-Robinson: 0,1 M ácido bórico, 0,1 M ácido acético y 0,1 M ácido fosfórico) ajustado a valores de pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0,10.0, 11.0 con HCl o NaOH se mezclaron en una placa de microtitulación y se colocaron en el hielo antes de la reacción.

El ensayo fue iniciado por transferencia de la placa de microtitulación a un termomezclador de Eppendorf, que fue establecido en la temperatura de ensayo a 50 °C.

Luego el sobrenadante 60µl fue transferido a una placa de microtitulación nueva.

OD₅₉₅ se leyó como una medida de actividad de amilasa.

Se hizo toda la reacción con duplicado y se incluyó un tampón ciego en el ensayo (en vez de enzima).

[0175] Ambas alfa-amilasas son ácido amilasas y su pH óptimo es pH4,0 como se muestra en la tabla 4.

Tabla 4 perfil de pH de alfa-amilasas

pH	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
P243SV	0.14	0.15	0.50	0.19	0.14	0.14	0.15	0.14	0.16	0.16
P23WU1	0.11	0.20	0.77	0.73	0.66	0.68	0.64	0.36	0.14	0.11

Estabilidad de pH

[0176] Veinte microlitros de enzima fueron adicionados a un tampón 100µl (100mM Na-acetato) a pH4.0, incubados a 37 °C durante 0, 10, 30, 60 y 120 min.

La enzima se añadió en 40 µl 1 % AZCL-HE-amilosa en el agua a 37 °C durante 20 min, 60 µl se tomaron para OD₅₉₅.

[0177] Ambas alfa-amilasas son estables a pH4,0 como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5 estabilidad de pH de las alfa-amilasas

Tiempo (min)	0	10	30	60	120
P243SV	0.56	0,85	0,67	0,63	0,60
P23WU1	1,34	1,54	1,34	1,46	1,47

Perfil de temperatura

[0178] Tres microlitros de enzima se añadieron en un 100µl tampón (50mM NaAc) a pH 4,3 que contenía 0,2 % de AZCL-HE-amilosa, incubando durante 20 min y 60µl de sobrenadante se tomó para OD₅₉₅.

[0179] P23WU1 muestra una temperatura óptima más alta (60 °C) que P243SV (40 °C) como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6 perfil de temperatura de las alfa-amilasas

Temperatura (°C)	30	40	50	60	70	80	90
P243SV	0,30	0,33	0,14	0,10	0,10	0,08	0,09
P23WU1	0,57	0,67	0,81	0,86	0,21	0,15	0,14

Estabilidad de temperatura

[0180] Tres microlitros de muestras de enzima fueron adicionados en 100µl 50 mM NaAc a pH4,3 e incubados a 50 °C (P243SV) y 65 °C (P23WU1) durante 0,10,30,60 y 120 minutos, y luego se les puso hielo en cada momento establecido.

Cuarenta microlitros de 1 % AZCL-HE-amilosa en el agua fueron añadidos a 37 °C durante 20 minutos, 60µl se tomaron para OD₅₉₅.

[0181] P243SV es más estable a 50 °C y P23WU1 es estable relativamente a alta temperatura (65 °C), como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7 estabilidad de temperatura de las alfa-amilasas

Tiempo (min)	0	10	30	60	120
P243SV (50 °C)	0,86	0,82	0,78	0,75	0,45
P23WU1 (65 °C)	0,74	0,58	0,42	0,27	0,13

Ejemplo 8: sacarificación simultánea y rendimiento de fermentación (SSF) de alfa-amilasa *Penicillium oxalicum* recombinante

[0182] El rendimiento de SSF de alfa-amilasa *Penicillium oxalicum* purificado (P243SV o P23WU1) fue evaluado a dosis de enzima diferentes en combinación con una dosis constante (equivalente a 0,56 AGU/gDS) de glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* purificada (descrita en la publicación internacional WO 99/28448 como SEC ID N.º: 7) o en combinación con una mezcla de glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* y glucoamilasa de *Trametes cingulata* (descrita en la publicación internacional WO 2006/069289 como SEC ID NO:2).

Glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* y glucoamilasa de *Trametes cingulata* fueron ambos expresados en el *Aspergillus niger*.

[0183] La fermentación se realizó bajo las condiciones siguientes:

Sustrato: triturado de maíz licuado industrialmente 33,9 % DS (% en peso)

Temperatura: 32 °C

PH inicial: 5,0

Dosis de alfa-amilasa: alfa-amilasa *Penicillium oxalicum* (obtenida por ejemplo 6) a 3 y 10 µg de proteína/g enzimática sólida en seco (µg EP/g DS).

[0184] Experimento A, alfa-amilasas de *Penicillium oxalicum* se compararon con una muestra purificada de la glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* dosificada en las mismas dosificaciones.

La dosis de *Talaromyces emersonii* glucoamilasa es equivalente a una industria pertinente 0,56 AGU/gDS.

[0185] Experimento B, alfa-amilasas *Penicillium oxalicum* se compararon con una mezcla de glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* comercial y glucoamilasa de *Trametes cingulata*.

La dosis de glucoamilasa total es equivalente a una industria pertinente 0,56 AGU/gDS.

Fermentación

[0186] El sustrato para SSF fue probado después del paso de licuefacción en una instalación de etanol.

El maíz molido se mezcló con contratiempo y otro agua reciclada, y se ajustó su sustancia seca a aproximadamente 33, 9 % (p/p), y luego se envió en la licuefacción a 85 °C y pH 5,8. Antes de las fermentaciones lab, 1000 urea de ppm como fuente de nitrógeno y se añadieron 3 ppm de penicilina para control bacteriano; el pH luego se ajustó a 5,0 con H₂SO₄.

Las partes alícuotas de sustrato correspondientes a aproximadamente 5g de triturado fueron transferidas a 15 ml de tubos centrifugadores, con un agujero perforado en la parte superior para liberación de CO₂.

Se añadieron enzimas y levadura (30 millones de células/ml) y los tubos se colocaron en un baño maría sin agitación a 32 °C.

Se analizaron las muestras en la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para la determinación de las concentraciones de carbohidrato y etanol.

[0187] El etanol producido durante la fermentación se da en las tablas 8 y 9.

5

Tabla 8 el etanol de la (g/l) producido durante SSF con alfa-amilasa *Penicillium oxalicum* añadida (P243SV o P23WU1) se evaluó a una dosis enzimática diferente en combinación con glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* a 0,56 AGU/gDS en comparación solo con glucoamilasa de *Talaromyces emersonii*, experimento A

		Dosis enzimática (µgEP/gDS)	
		3	10
Ninguna alfa-amilasa	126,3		
<i>Penicillium oxalicum</i> - P243SV		125,6	126,0
<i>Penicillium oxalicum</i> - P23WU1		129,0	129,8

10

Tabla 9 etanol (g/l) producido durante SSF con alfa-amilasa *Penicillium oxalicum* añadido (P23WU1) se evaluó a una dosis enzimática diferente en combinación con una mezcla de glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* y glucoamilasa de *Trametes cingulata* a 0,56 AGU/gDS en comparación solo con la mezcla de glucoamilasa experimento B

		Dosis enzimática (µgEP/gDS)	
		3	10
Ninguna alfa-amilasa	120,8		
<i>Penicillium oxalicum</i> - P23WU1		122,6	123,6

15

Ejemplo 9: el efecto de la alfa-amilasa *Penicillium oxalicum* en el volumen del pan

[0188] Los mini rollos se hicieron de 12 g de harina de Kolibri® (Meneba, Rotterdam, Países Bajos) según un procedimiento de masa recta con la adición de 56 % de agua, 4,5 % levadura, 1,5 % sacarosa, 1,5 % sal y 40 ácido ascórbico ppm basado en la harina.

20

La masa fue suplementada con dosificaciones diferentes de enzimas según la tabla 10 de abajo.

Todos los ingredientes se mezclaron en un mezclador mini (NS1-33R, National MFG Co., Lincoln, Nebraska, Estados Unidos) durante 3.5 min a velocidad 3.

Después de la mezcla, la masa se formó y se colocó en una forma de aluminio redondo (diámetro 90 mm y altura lateral 15 mm).

25

Después de la prueba de 55 min. a 32 °C y una humedad relativa del 86 % (RH), la masa se horneó a 230 °C durante 17 min.

Tabla 10 dosificaciones de enzimas

	1	2	3	4	5	6	7
P23WU1 (mg proteína enzimática/kg harina)		0,33	1	3			
P243SV (mg proteína enzimática/kg harina)					0,33	1	3

30

[0189] El efecto de la enzima en el volumen de los panes se evaluó por un método de desplazamiento de agua, es decir, medición de la cantidad de agua desplazada por el pan a temperatura ambiente.

Un vaso de precipitados que contiene agua se puso en una balanza, que fue luego ajustada a 0,000 g. El pan se impregnó con parafina a 80 °C durante 3 segundos, se pudo enfriar durante 10 segundos y luego se sumergió en agua en el vaso de precipitados por presión.

35

La masa del (gramo) de agua desplazada o la presión aplicada se leyó de la balanza (gramos).

La masa del agua desplazada correspondía al volumen del pan (ml).

[0190] El pan se ponderó en un equilibrio y el volumen específico se calculó por la división del volumen de pan (de método de desplazamiento de agua) por el peso de pan (determinado por el peso del pan).

40

Un índice de volumen específico se calculó por el ajuste del volumen específico del pan de control a 100 % y se calculó el volumen específico del pan tratado enzimático relativamente al control (ninguna enzima).

[0191] El efecto de amilasa P23WU1 y amilasa P243SV en el volumen de rollos mini puede verse en la tabla 2 debajo.

45

Tabla 2 volumen de rollos con amilasas diferentes

Enzima	Volumen específico (ml/g)	Índice de volumen específico (%)
Control (ninguna enzima)	2,993	100
P23WU1 (0,33 mg/kg)	3,138	105
P23WU1 (1 mg/kg)	3,055	102
P23WU1 (3 mg/kg)	3,107	104
P243SV (0,33 mg/kg)	3,036	101
P243SV (1 mg/kg)	3,035	101
P243SV (3 mg/kg)	2,924	98

[0192] La amilasa P23WU1 fue capaz de mejorar el volumen del pan a 0,33 mg proteína enzimática/kg harina, 1 mg proteína enzimática/kg harina y 3 mg de proteína enzimática/kg harina, respectivamente.

La amilasa P243SV pudo mejorar el volumen del pan a 0,33 mg de proteína enzimática/kg harina y 1 mg de proteína enzimática/kg harina, respectivamente.

[0193] La presente invención está posteriormente descrita por los siguientes párrafos numerados:

[1] Polipéptido aislado con actividad de alfa-amilasa, seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido con al menos 80 %, por ejemplo, al menos 85 %, 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 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID N.º: 4; o un polipéptido con al menos 65 %, por ejemplo, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, 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 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia al polipéptido maduro de SEC ID NO:2;

(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de astringencia bajas, condiciones de astringencia medias, condiciones de astringencia medio altas, condiciones de astringencia altas o condiciones de astringencia muy altas con (i) la secuencia de codificación del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 3, o la secuencia de codificación del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 1, (ii) las secuencias de ADNc de los mismos, o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii);

(c) un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 80 %, por ejemplo, al menos 85 %, 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 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia a la secuencia de codificación del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 3 o la secuencia de ADNc del mismo; o un polipéptido codificado por un polinucleótido con al menos 65 %, por ejemplo, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, 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 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia a la secuencia de codificación del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 1 o la secuencia de ADNc del mismo;

(d) una variante del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 4 o el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 2 que comprende una sustitución, delección y/o inserción a una o más posiciones; y

(e) un fragmento del polipéptido de (a); (b), (c), o (d) que tiene actividad de alfa-amilasa.

[2] Polipéptido del párrafo 1, con al menos 80 %, al menos 85 %, 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 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia al polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 4; o al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, 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 %, al menos 99 % o 100 % de la secuencia de identidad con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 2.

[3] Polipéptido del párrafo 1 o 2, que se codifica por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de astringencia bajas, condiciones de astringencia medio-bajas, condiciones de astringencia medias, condiciones de astringencia medio altas, condiciones de astringencia altas o condiciones de astringencia muy altas con (i) la secuencia de codificación del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 3 o la secuencia de codificación del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc del mismo o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii).

[4] Polipéptido de cualquiera de párrafos 1-3, que se codifica por un polinucleótido con al menos 80 %, al menos 85 %, 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 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia a la secuencia de codificación del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 3 o la secuencia de ADNc del mismo; o que se codifica por un polinucleótido con al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, 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 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de codificación del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 1 o la secuencia de ADNc del mismo.

[5] Polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-4, que comprende o consistente en la SEC ID N.º: 4 o SEC ID N.º: 2, el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 4 o el polipéptido maduro de SEC ID N.º: 2.

[6] Polipéptido del párrafo 5, donde el polipéptido maduro es aminoácidos 21 a 619 de la SEC ID N.º: 4 o aminoácidos 26 a 505 de la SEC ID N.º: 2.

[7] Polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-4, que es una variante del polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 4 o el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 2, que comprende una sustitución, delección y/o inserción a una o más posiciones; o que es un fragmento de la SEC ID N.º: 2 o la SEC ID N.º: 4, donde el fragmento tiene actividad de alfa-amilasa.

[8] Polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-7, que es estable a 10 °C-100 °C, preferiblemente, 20 °C- 80 °C, más preferiblemente, 30 °C- 70 °C.

[9] Polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-8, que es un fragmento del polipéptido de la SEC ID N.º: 4 o la SEC ID N.º: 2, con actividad de alfa-amilasa.

[10] Polipéptido aislado que comprende un dominio catalítico seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un dominio catalítico con al menos un 80 % de identidad de secuencia con amino ácidos 21 a 493 de la SEC ID N.º: 4 o al menos 65 % de identidad de secuencia con amino ácidos 26 a 503 de la SEC ID N.º: 2;

(b) un dominio catalítico codificado por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de astringencia bajas, medias, medio altas, altas o muy altas con nucleótidos 61 a 1973 de la SEC ID N.º: 3 o nucleótidos 76 a 1578 de la SEC ID N.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc del mismo o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii);

(c) un dominio catalítico codificado por un polinucleótido con al menos 80 % de identidad de secuencia a nucleótidos 61 a 1973 de la SEC ID N.º: 3 o al menos 65 % de identidad de secuencia con nucleótidos 76 a 1578 de la SEC ID N.º: 1;

(d) una variante de aminoácidos 21 a 493 de la SEC ID N.º: 4 o aminoácidos 26 a 503 de la SEC ID N.º: 2, que comprende una sustitución, delección y/o inserción a una o más posiciones; y

(e) un fragmento del dominio catalítico de (a); (b), (c) o (d) que tiene actividad de alfa-amilasa.

[11] Polipéptido del párrafo 10, que comprende además un dominio de unión de carbohidrato.

[12] Polipéptido aislado que comprende un dominio de unión de carbohidrato, donde el dominio de unión se selecciona del grupo que consiste en:

(a) un dominio de unión de carbohidrato con al menos 80 % de identidad de secuencia a amino ácidos 511 a 619 de la SEC ID N.º: 4;

(b) un dominio de unión de carbohidrato codificado por un polinucleótido que hibridiza bajo condiciones de astringencia bajas, medias, medio altas, altas o muy altas con nucleótidos (i) 2025 a 2351 de la SEC ID N.º: 3, (ii) la secuencia de ADNc del mismo o (iii) el complemento en toda su longitud de (i) o (ii);

(c) un dominio de unión de carbohidrato codificado por un polinucleótido con al menos 80 % de identidad de secuencia para nucleótidos 2025 a 2351 de la SEC ID N.º: 3 o la secuencia de ADNc de los mismos;

(d) una variante de aminoácidos 511 a 619 de la SEC ID N.º: 4 que comprende una sustitución, delección y/o inserción en una o más posiciones; y

(e) un fragmento de (a); (b), (c); (d) o (e) que tiene una actividad de unión de carbohidrato.

[13] Polipéptido del párrafo 12, donde el dominio de unión de carbohidrato está operativamente enlazado a un dominio catalítico.

[14] Polipéptido del párrafo 13, donde el dominio catalítico se obtiene de amilasa.

[15] Polipéptido del párrafo 14, donde el dominio catalítico se obtiene de alfa-amilasa.

[16] Polipéptido del párrafo 15, donde el dominio catalítico se obtiene de alfa-amilasa ácida.

[17] Formulación de caldo completo o composición de cultivo celular que comprende el polipéptido de cualquiera de párrafos 1-16.

[18] Composición que comprende el polipéptido de cualquiera de párrafos 1-16 y una enzima seleccionada del grupo que consiste en: una alfa-amilasa fúngica (EC 3.2.1.1), una beta-amilasa (E.C. 3.2.1.2), una glucoamilasa (E.C.3.2.1.3), unas pululanazas (E.C. 3.2.1.41), una fitasa (E.C.3.1.2.28) y una proteasa (E.C. 3.4.).

[19] Polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-16.

[20] Constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende el polinucleótido del párrafo 19 operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.

[21] Célula huésped recombinante que comprende el polinucleótido del párrafo 19 operativamente enlazado a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido.

[22] Método para producir el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-16, que comprende:

Cultivo de una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones de conducción para la producción del polipéptido.

[23] Método del párrafo 22, que comprende además la recuperación del polipéptido.

[24] Método para producir un polipéptido con actividad de alfa-amilasa, que comprende:

Cultivo de la célula huésped del párrafo 21 bajo condiciones conductivas para la producción del polipéptido.

[25] Método del párrafo 24, que comprende además la recuperación del polipéptido.

[26] Planta transgénica, parte de planta o célula vegetal transformada con un polinucleótido que codifica el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-16.

[27] Método para producir un polipéptido con actividad de alfa-amilasa, que comprende:

Cultivo de la planta transgénica o célula vegetal del párrafo 26 bajo condiciones conductivas para la producción del polipéptido.

- [28] Método del párrafo 27, que comprende además la recuperación del polipéptido.
- [29] Método para producir un mutante de una célula madre, que comprende inactivar un polinucleótido que codifica el polipéptido de cualquiera de los párrafos 1-16, que resulta en el mutante que produce menos del polipéptido que la célula madre.
- 5 [30] Célula mutante producida por el método del párrafo 29.
- [31] Célula mutante del párrafo 30, que comprende además un gen que codifica una proteína nativa o heteróloga.
- [32] Método para producir una proteína, que comprende:
Cultivo de la célula mutante del párrafo 30 o 3 bajo condiciones conductivas para la producción de la proteína.
- 10 [33] Método del párrafo 32, que comprende además la recuperación del polipéptido.
- [34] Molécula de ARN inhibitorio bicatenario (ARNbc) que comprende una subsecuencia del polinucleótido del párrafo 19, donde opcionalmente el ARNbc es un ARNsi o una molécula ARNmi.
- [35] Molécula de ARN inhibitoria bicatenaria de (ARNbc) del párrafo 34, que es aproximadamente 15,16,17,18,19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos dúplex de longitud.
- 15 [36] Método de la inhibición de la expresión de un polipéptido con actividad de alfa-amilasa en una célula, que comprende la administración a la célula o expresión en la célula de la molécula de ARN inhibitorio bicatenario (ARNbc) del párrafo 34 o 35.
- [37] Célula producida por el método del párrafo 36.
- [38] Célula del párrafo 37, que comprende además un gen que codifica una proteína nativa o heteróloga.
- 20 [39] Método para producir una proteína, que comprende:
Cultivo de la célula del párrafo 37 o 38 bajo condiciones conductivas para la producción de la proteína.
- [40] Método del párrafo 39, que comprende además la recuperación del polipéptido.
- [41] Polinucleótido aislado que codifica un péptido señal que comprende o consiste en aminoácidos 1 a 20 de la SEC ID N.º: 4 o aminoácidos 1 a 25 de la SEC ID N.º: 2.
- 25 [44] Constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un gen que codifica una proteína operativamente enlazada al polinucleótido del párrafo 41, donde el gen es foráneo al polinucleótido que codifica el péptido señal.
- [45] Célula huésped recombinante que comprende un gen que codifica una proteína operativamente vinculada al polinucleótido del párrafo 41, donde el gen es foráneo al polinucleótido que codifica el péptido señal.
- 30 [46] Método para producir una proteína, que comprende:
Cultivo de una célula huésped recombinante que comprende un gen que codifica una proteína operativamente vinculada al polinucleótido del párrafo 41, donde el gen es foráneo para el polinucleótido que codifica el péptido señal, bajo condiciones conductivas para la producción de la proteína.
- [47] Método del párrafo 46, que comprende además la recuperación de la proteína.
- 35 [48] Uso del polipéptido según cualquier de los párrafos 1-16, la formulación de caldo completo o composición de cultivo celular según el párrafo 17 o la composición según el párrafo 18 para la conversión de almidón.
- [49] Uso del polipéptido, según cualquiera de los párrafos 1-16, la formulación de caldo completo o composición de cultivo celular según el párrafo 17 o la composición según el párrafo 18 para la modificación de almidón en el papel e industria de pulpa.
- 40 [50] Uso del polipéptido, según cualquiera de párrafos 1-16, la formulación de caldo completo o composición de cultivo celular según el párrafo 17 o la composición según el párrafo 18 para licuefacción de almidón y/o sacarificación.
- [51] Uso del polipéptido, según cualquiera de los párrafos 1-16, la formulación del caldo completo o composición de cultivo celular según el párrafo 17 o la composición según el párrafo 18 para lavado textil.
- 45 [52] Uso del polipéptido, según cualquiera de los párrafos 1-16, la formulación de caldo completo o composición de cultivo celular según el párrafo 17 o la composición según el párrafo 18 para desencolado textil.
- [53] Uso del polipéptido, según cualquier de párrafos 1-16, la formulación de caldo completo o composición de cultivo celular según el párrafo 17 o la composición según el párrafo 18 para la destilación.
- [54] Uso del polipéptido, según cualquiera de los párrafos 1-16, la formulación de caldo completo o composición de cultivo celular según el párrafo 17 o la composición según el párrafo 18 para producción de etanol.
- 50 [55] Uso según párrafo 54 para la producción de etanol en un proceso que comprende hidrolización de almidón.
- [56] Uso del polipéptido, según cualquiera de los párrafos 1-16, la formulación de caldo completo o composición de cultivo celular según el párrafo 17 o la composición según el párrafo 18 para la cocción.
- [57] Uso según párrafo 56 para la mejora del volumen de un pan.
- 55 [58] Método para la conversión de almidón, almidón preferiblemente gelatinizado, donde se añade un polipéptido según cualquiera de los párrafos 1-16, la formulación de caldo completo o composición de cultivo celular según párrafo 17 o la composición según el párrafo 18.
- [59] Método para la modificación de almidón en el papel e industria de pulpa, donde se añade un polipéptido según cualquiera de los párrafos 1-16, la formulación de caldo completo o la composición de cultivo celular según el párrafo 17 o la composición según el párrafo 18.
- 60 [60] Método para la licuefacción y/o almidón de sacarificación, donde se añade un polipéptido según cualquier de párrafos 1-16, la formulación de caldo completo o composición de cultivo celular según el párrafo 17 o la composición según el párrafo 18.

[61] Método para el lavado textil, donde se añade un polipéptido según cualquier de los párrafos 1-16, la formulación del caldo completo o la composición de cultivo celular según el párrafo 17 o la composición según el párrafo 18.

[62] Método para el descolado textil, donde se añade un polipéptido, según cualquiera de los párrafos 1-16, la formulación de caldo completo o composición de cultivo celular según el párrafo 17 o la composición según el párrafo 18.

[63] Método para la elaboración de cerveza, donde se añade un polipéptido según cualquiera de los párrafos 1-16, la formulación de caldo completo o composición de cultivo celular según el párrafo 17 o la composición según el párrafo 18.

[64] Método para la producción de etanol, donde se añade un polipéptido, según cualquiera de los párrafos 1-16, la formulación de caldo completo o composición de cultivo celular según el párrafo 17 o la composición según el párrafo 18.

[65] Método según el párrafo 64, donde el etanol se produce en un proceso que comprende almidón de hidrolización.

[66] Método para la cocción, donde se añade un polipéptido según cualquiera de los párrafos 1-16, la formulación de caldo completo o composición de cultivo celular según el párrafo 17 o la composición según el párrafo 18.

[67] Método según el párrafo 66, donde se añade a la masa un polipéptido según cualquiera de los párrafos 1-16, la formulación de caldo completo o composición de cultivo celular según el párrafo 17 o la composición según el párrafo 18.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S
Novozymes North America, Inc.
Li, Ming
Duan, Junxin
Tsutsumi, Noriko
Coward-Kelly, Guillermo
Lundkvist, Henrik

<120> POLIPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD DE ALFA-AMILASA Y POLYNUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN LOS MISMOS

<130> 12277-WO-PCT[2]

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 1587
<212> ADN
<213> Penicillium oxalicum

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(75)

<220>
<221> exón
<222> (1)..(1011)

<220>
<221> exón
<222> (1081)..(1584)

<400> 1

ES 2 632 011 T3

atg ttc ttc aca tcc tcg gtc tgc tgg gcg gca ggc ctc acc acc ctg
 48
 Met Phe Phe Thr Ser Ser Val Cys Trp Ala Ala Gly Leu Thr Thr Leu
 1 5 10 15
 5
 tca tgc ctg ctg aac ccg gtt ctc gcc gcg gac atg gct gca tgg aag
 96
 Ser Cys Leu Leu Asn Pro Val Leu Ala Ala Asp Met Ala Ala Trp Lys
 20 25 30
 10
 act cga tcc gtg tac caa acc atg acc gat cgg ttc gct cgc ccg gac
 144
 Thr Arg Ser Val Tyr Gln Thr Met Thr Asp Arg Phe Ala Arg Pro Asp
 35 40 45
 15
 ggg tcg atg acg gct ccg tgc aac gcc tcc gcg ggc ctt tac tgc gga
 192
 Gly Ser Met Thr Ala Pro Cys Asn Ala Ser Ala Gly Leu Tyr Cys Gly
 50 55 60
 20
 gga acg tgg aag ggg aca atg aat aag ttg gat tat att cag gac atg
 240
 Gly Thr Trp Lys Gly Thr Met Asn Lys Leu Asp Tyr Ile Gln Asp Met
 65 70 75 80
 25
 gga ttc gac gcg atc atg atc tcc ccg atc gta aag aac atc gag ggt
 288
 Gly Phe Asp Ala Ile Met Ile Ser Pro Ile Val Lys Asn Ile Glu Gly
 85 90 95
 30
 cgg gtc tgg tat ggt gaa gcc tat cac ggg tac tgg cca cag gat atg
 336
 Arg Val Trp Tyr Gly Glu Ala Tyr His Gly Tyr Trp Pro Gln Asp Met
 100 105 110
 35
 tac caa ctc aac cct cac ttt ggc acc gag caa gag ttg cat gat ctc
 384
 Tyr Gln Leu Asn Pro His Phe Gly Thr Glu Gln Glu Leu His Asp Leu
 115 120 125
 40
 gtc gat gcc att cat gcg cgc ggc atg tat atc ctc ttg gac agc gtc
 432
 Val Asp Ala Ile His Ala Arg Gly Met Tyr Ile Leu Leu Asp Ser Val
 130 135 140
 45
 att aac aac atg gcc tgg atg acc cgc ggc cag aac ccg gcc acg cac
 480
 Ile Asn Asn Met Ala Trp Met Thr Arg Gly Gln Asn Pro Ala Thr His
 145 150 155 160
 50
 atc gac tat tcc gcc ttg acc ccg ttc aac aac cag cag tac tat cac
 528
 Ile Asp Tyr Ser Ala Leu Thr Pro Phe Asn Asn Gln Gln Tyr Tyr His
 165 170 175
 55
 cca tac tgc aag atc aag aat tgg aac aac tac acg gat gcc caa ctg
 576

ES 2 632 011 T3

Pro Tyr Cys Lys Ile Lys Asn Trp Asn Asn Tyr Thr Asp Ala Gln Leu
 180 185 190
 5 tgc caa aca gga gac gac cag gtc gcc ttg ccc gat ctg ttt acc gaa
 624
 Cys Gln Thr Gly Asp Asp Gln Val Ala Leu Pro Asp Leu Phe Thr Glu
 195 200 205
 10 cat gag gac gtt cag aag aca ttg gag gac tgg gca acc gac gtg atc
 672
 His Glu Asp Val Gln Lys Thr Leu Glu Asp Trp Ala Thr Asp Val Ile
 210 215 220
 15 aag aaa tat aac atc gac ggc ctt cga ctc gat gcg gtc aag agt ttg
 720
 Lys Lys Tyr Asn Ile Asp Gly Leu Arg Leu Asp Ala Val Lys Ser Leu
 225 230 235 240
 20 aca ccg agc ttc ctg gcc aag ttt gtc aag aac gtc gga ggc ttc atg
 768
 Thr Pro Ser Phe Leu Ala Lys Phe Val Lys Asn Val Gly Gly Phe Met
 245 250 255
 25 acc gga gaa cag ttc gaa aga gac tcc aag atc atc tgc gac tgg caa
 816
 Thr Gly Glu Gln Phe Glu Arg Asp Ser Lys Ile Ile Cys Asp Trp Gln
 260 265 270
 30 aag aac tat atc tcc agc atg ccc aac tac ccc atg tac tat tcc atg
 864
 Lys Asn Tyr Ile Ser Ser Met Pro Asn Tyr Pro Met Tyr Tyr Ser Met
 275 280 285
 35 gtc gag gcc ttt acc cag gga aac atg tca gat ctc gct gtc caa att
 912
 Val Glu Ala Phe Thr Gln Gly Asn Met Ser Asp Leu Ala Val Gln Ile
 290 295 300
 40 gag acg atg aag tcg ctt tgt gcg gac gtg aca gag atg gtc tcc ttc
 960
 Glu Thr Met Lys Ser Leu Cys Ala Asp Val Thr Glu Met Val Ser Phe
 305 310 315 320
 45 tca gaa aat cac gat att gct cgc gtt cgt gcg ctg agg gac gat ctc
 1008
 Ser Glu Asn His Asp Ile Ala Arg Val Arg Ala Leu Arg Asp Asp Leu
 325 330 335
 50 tcg gtatgtataa tcctatggtc cccagcagtg aatgatcact gaccgagtct
 1061
 Ser
 55 ctctcttccc ccgacgcag att gcc aaa acc ttc ctc acg ttc acg tta ctg
 1113
 Ile Ala Lys Thr Phe Leu Thr Phe Thr Leu Leu
 340 345

ES 2 632 011 T3

```

    ttc gac gga atc ccc atg ctc tat cag ggc caa gaa cag ttc ttg gac
    1161
5   Phe Asp Gly Ile Pro Met Leu Tyr Gln Gly Gln Glu Gln Phe Leu Asp
    350                      355                      360

    ggg ttg tct agt ccc gag aat cgt caa gcg atc tgg ctc acg ggc tac
    1209
10  Gly Leu Ser Ser Pro Glu Asn Arg Gln Ala Ile Trp Leu Thr Gly Tyr
    365                      370                      375

    aac tcc aac gcg ccc ctc tac cag ctc acc aag gcc ctc aac agc ctt
    1257
15  Asn Ser Asn Ala Pro Leu Tyr Gln Leu Thr Lys Ala Leu Asn Ser Leu
    385                      390                      395

    cgg cgc cat gcc ctt gag ctg gat ccc aac tac gtc aac atc cca acc
    1305
20  Arg Arg His Ala Leu Glu Leu Asp Pro Asn Tyr Val Asn Ile Pro Thr
    400                      405                      410

    tac ccc atc tat cgg ggt gcc agt gag att gcg gtc agt aag ggt gtg
    1353
25  Tyr Pro Ile Tyr Arg Gly Ala Ser Glu Ile Ala Val Ser Lys Gly Val
    415                      420                      425

    cag ggt cga cag gtc gtc acc gtc gtc acc aat caa ggc gtc aag ggt
    1401
30  Gln Gly Arg Gln Val Val Thr Val Val Thr Asn Gln Gly Val Lys Gly
    430                      435                      440

    ggc tcc tac acg ctc acc ttg ccc gcg tcc ttc aac gcg atg acg ccc
    1449
35  Gly Ser Tyr Thr Leu Thr Leu Pro Ala Ser Phe Asn Ala Met Thr Pro
    445                      450                      455                      460

    gtg acg gag atc atc acc tgt tcg aat tac acg gtc gat gcc cgg gga
    1497
40  Val Thr Glu Ile Ile Thr Cys Ser Asn Tyr Thr Val Asp Ala Arg Gly
    465                      470                      475

    tcg ctg gtc gtg cag atg gac aaa gga gag cct cgg gtc ttc ttc ccg
    1545
45  Ser Leu Val Val Gln Met Asp Lys Gly Glu Pro Arg Val Phe Phe Pro
    480                      485                      490

    aca cag ttg atg gaa ggc agc gga ttg tgt ggt tat tcc taa
    1587
50  Thr Gln Leu Met Glu Gly Ser Gly Leu Cys Gly Tyr Ser
    495                      500                      505

<210>  2
<211>  505
55  <212>  PRT
    <213>  Penicillium oxalicum

```

ES 2 632 011 T3

<400> 2

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

ES 2 632 011 T3

5	Lys 225	Lys	Tyr	Asn	Ile	Asp 230	Gly	Leu	Arg	Leu	Asp 235	Ala	Val	Lys	Ser	Leu 240
10	Thr	Pro	Ser	Phe	Leu 245	Ala	Lys	Phe	Val	Lys 250	Asn	Val	Gly	Gly	Phe	Met 255
15	Thr	Gly	Glu	Gln 260	Phe	Glu	Arg	Asp	Ser 265	Lys	Ile	Ile	Cys	Asp 270	Trp	Gln
20	Lys	Asn	Tyr 275	Ile	Ser	Ser	Met	Pro 280	Asn	Tyr	Pro	Met	Tyr 285	Tyr	Ser	Met
25	Val	Glu 290	Ala	Phe	Thr	Gln	Gly 295	Asn	Met	Ser	Asp	Leu 300	Ala	Val	Gln	Ile
30	Glu 305	Thr	Met	Lys	Ser	Leu	Cys 310	Ala	Asp	Val	Thr 315	Glu	Met	Val	Ser	Phe 320
35	Ser	Glu	Asn	His	Asp 325	Ile	Ala	Arg	Val	Arg 330	Ala	Leu	Arg	Asp	Asp 335	Leu
40	Ser	Ile	Ala	Lys 340	Thr	Phe	Leu	Thr	Phe 345	Thr	Leu	Leu	Phe	Asp 350	Gly	Ile
45	Pro	Met	Leu 355	Tyr	Gln	Gly	Gln	Glu 360	Gln	Phe	Leu	Asp	Gly 365	Leu	Ser	Ser
50	Pro	Glu 370	Asn	Arg	Gln	Ala	Ile 375	Trp	Leu	Thr	Gly	Tyr 380	Asn	Ser	Asn	Ala
55	Pro	Leu 385	Tyr	Gln	Leu	Thr 390	Lys	Ala	Leu	Asn	Ser 395	Leu	Arg	Arg	His	Ala 400
60	Leu	Glu	Leu	Asp	Pro 405	Asn	Tyr	Val	Asn	Ile 410	Pro	Thr	Tyr	Pro	Ile 415	Tyr
65	Arg	Gly	Ala	Ser 420	Glu	Ile	Ala	Val	Ser 425	Lys	Gly	Val	Gln	Gly 430	Arg	Gln
70	Val	Val	Thr 435	Val	Val	Thr	Asn	Gln 440	Gly	Val	Lys	Gly	Gly 445	Ser	Tyr	Thr

ES 2 632 011 T3

	Leu Thr Leu Pro Ala Ser Phe Asn Ala Met Thr Pro Val Thr Glu Ile
	450 455 460
5	Ile Thr Cys Ser Asn Tyr Thr Val Asp Ala Arg Gly Ser Leu Val Val
	465 470 475 480
10	Gln Met Asp Lys Gly Glu Pro Arg Val Phe Phe Pro Thr Gln Leu Met
	485 490 495
15	Glu Gly Ser Gly Leu Cys Gly Tyr Ser
	500 505
20	<210> 3
	<211> 2354
	<212> ADN
	<213> Penicillium oxalicum
25	<220>
	<221> sig_peptide
	<222> (1)..(60)
30	<220>
	<221> exón
	<222> (1)..(156)
35	<220>
	<221> exón
	<222> (235)..(273)
40	<220>
	<221> exón
	<222> (503)..(611)
45	<220>
	<221> exón
	<222> (671)..(899)
50	<220>
	<221> exón
	<222> (962)..(1124)
55	<220>
	<221> exón
	<222> (1173)..(1319)
	<220>
	<221> exón

ES 2 632 011 T3

```

<222> (1375)..(1615)

<220>
<221> exón
5 <222> (1695)..(2354)

<400> 3
atg aaa ttc ctt gga cta gct gct ttg ttt ctt gcc cag acc gtg gcg
48
10 Met Lys Phe Leu Gly Leu Ala Ala Leu Phe Leu Ala Gln Thr Val Ala
1 5 10 15

ggt ctg acg gct gcc caa tgg cgc agc caa tcg atc tac ttc ctc atg
96
15 Gly Leu Thr Ala Ala Gln Trp Arg Ser Gln Ser Ile Tyr Phe Leu Met
20 25 30

act gat cgg ttt ggt cga acc gac aag tcc gtg act gcc cca tgc aac
144
20 Thr Asp Arg Phe Gly Arg Thr Asp Lys Ser Val Thr Ala Pro Cys Asn
35 40 45

aca aat gac cga gtaagttctc cccctttttt cgcgtcgggg ggtgggttcaa
196
25 Thr Asn Asp Arg
50

aacttttgtc gtctgtggta ctgattgaat tctccaag gta tac tgt ggt gga act
252
30 Val Tyr Cys Gly Gly Thr
55

tgg caa ggc att atc aat caa gtgagatgca tccgcagccc atggataagg
303
35 Trp Gln Gly Ile Ile Asn Gln
60 65

taaacaatct aggttctgac gtagcttcaa g ttg gat tac atc caa gga atg
355
40 Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met
70

gga ttt act gcg att tgg atc act cca gtc aca gag cag ctc cct caa
403
45 Gly Phe Thr Ala Ile Trp Ile Thr Pro Val Thr Glu Gln Leu Pro Gln
75 80 85

gat act ggg gac ggt gaa gca tac cac gga tat tgg caa cag gaa at
450
50 Asp Thr Gly Asp Gly Glu Ala Tyr His Gly Tyr Trp Gln Gln Glu Ile
90 95 100

gtatatgcat cttccaactt cgccccaaat cctctctgac aaggcgatac ag a tac
506
55 Tyr
105

```

ES 2 632 011 T3

aat gtc aac aac aac tac ggc act gct gcc gat ctc aag gct ctt tcg
 554
 Asn Val Asn Asn Asn Tyr Gly Thr Ala Ala Asp Leu Lys Ala Leu Ser
 110 115 120
 5
 caa gcc ctt cac agt cgt gga atg tac ctc atg gtt gat gtt gtc gcg
 602
 Gln Ala Leu His Ser Arg Gly Met Tyr Leu Met Val Asp Val Val Ala
 125 130 135
 10
 aac cac atg gtgacttggc tctctctacg ggtgaaaacg agcaggcttc
 651
 Asn His Met
 140
 15
 taactttttc ggtctccag ggc tac gcg ggg gcc gga aac acc gtc gac tac
 703
 Gly Tyr Ala Gly Ala Gly Asn Thr Val Asp Tyr
 145 150
 20
 agt gtg ttc aag cca ttc agc tcc tct tcg tac ttc cac ccg tat tgt
 751
 Ser Val Phe Lys Pro Phe Ser Ser Ser Ser Tyr Phe His Pro Tyr Cys
 155 160 165
 25
 ttg atc agc gat tac tca aat cag aca aat gtc gag gac tgt tgg ctt
 799
 Leu Ile Ser Asp Tyr Ser Asn Gln Thr Asn Val Glu Asp Cys Trp Leu
 170 175 180
 30
 ggg gac acc acc gtc tca ctc ccc gat ctt gat acc act ctt tct tcc
 847
 Gly Asp Thr Thr Val Ser Leu Pro Asp Leu Asp Thr Thr Leu Ser Ser
 185 190 195
 35
 gtg cag acg atc tgg tat aat tgg gtc agt gac cta gtt tca aac tat
 895
 Val Gln Thr Ile Trp Tyr Asn Trp Val Ser Asp Leu Val Ser Asn Tyr
 200 205 210 215
 40
 tcc a gtgagtatga cctgaaaaga ggccgtgaat tcattcagca aagcctgaca
 949
 Ser
 45
 ttctgtaact ag tc gac ggt ctt cgg atc gat act gtc aag cac gtt caa
 999
 Ile Asp Gly Leu Arg Ile Asp Thr Val Lys His Val Gln
 220 225
 50
 aag tca ttc tgg cct ggc tat cag agt gct gct ggt gtc tac tgt gtt
 1047
 Lys Ser Phe Trp Pro Gly Tyr Gln Ser Ala Ala Gly Val Tyr Cys Val
 230 235 240 245
 55
 gga gag gtc ttc agt ggt gat ccg gct tac act tgc cct tat caa aac
 1095

ES 2 632 011 T3

Gly Glu Val Phe Ser Gly Asp Pro Ala Tyr Thr Cys Pro Tyr Gln Asn
 250 255 260
 5 tac ctt gat ggg gtt ttg aat tat cca at gtaagccgca tctcatcaat
 1144
 Tyr Leu Asp Gly Val Leu Asn Tyr Pro Ile
 265 270
 10 tcgctggata caatctgacc agacgcag c tat tac caa tta ctc ggc gca ttt
 1197
 Tyr Tyr Gln Leu Leu Gly Ala Phe
 275
 15 aaa tca acc agt gga agc atc agc agc ctt tac aac atg atc aac tct
 1245
 Lys Ser Thr Ser Gly Ser Ile Ser Ser Leu Tyr Asn Met Ile Asn Ser
 280 285 290 295
 20 gtt gcg tcc gac tgt gct gac cca acc ctg ctg ggt aac ttt att gaa
 1293
 Val Ala Ser Asp Cys Ala Asp Pro Thr Leu Leu Gly Asn Phe Ile Glu
 300 305 310
 25 aac cat gat aac cca cgc ttt gct tc gtaagttggg atttttgcct
 1339
 Asn His Asp Asn Pro Arg Phe Ala Ser
 315
 30 tgcgtgtctg aactgagctc atccgcaaaa tgaag g tac aca agc gac tac tcg
 1393
 Tyr Thr Ser Asp Tyr Ser
 325
 35 caa gcg aaa aat gtc atc tcg ttc att ttc ttg tct gat ggc att ccg
 1441
 Gln Ala Lys Asn Val Ile Ser Phe Ile Phe Leu Ser Asp Gly Ile Pro
 330 335 340
 40 atc gtc tat gcc gga cag gaa cag cac tac agt ggc ggt aac gac cct
 1489
 Ile Val Tyr Ala Gly Gln Glu Gln His Tyr Ser Gly Gly Asn Asp Pro
 345 350 355
 45 gct aac cgt gaa gcg act tgg ctt tcc gga tac tca aag aac gct caa
 1537
 Ala Asn Arg Glu Ala Thr Trp Leu Ser Gly Tyr Ser Lys Asn Ala Gln
 360 365 370
 50 ctg tac caa cac att gct tcg acg aac aaa atc cgc agt ctt gcg att
 1585
 Leu Tyr Gln His Ile Ala Ser Thr Asn Lys Ile Arg Ser Leu Ala Ile
 375 380 385 390
 55 tca aag gat gcc aac tac atc act tcc aag gtgtgtgaat ggagtgcac
 1635
 Ser Lys Asp Ala Asn Tyr Ile Thr Ser Lys
 395 400

ES 2 632 011 T3

ttctcttttc ttgcaaagag aaaataaagg gctggaaaaa gctaatttga cggacatag
1694

5 aac aat gct ttc tac act gac agt aac acc atc gcc atg aag aaa gga
1742
Asn Asn Ala Phe Tyr Thr Asp Ser Asn Thr Ile Ala Met Lys Lys Gly
405 410 415

10 tcc tcc gga tcg cag gtc gtg aca gtt ctc tca aac cgt ggc tcg tca
1790
Ser Ser Gly Ser Gln Val Val Thr Val Leu Ser Asn Arg Gly Ser Ser
420 425 430

15 ggt agc tcg tac act ttg agt ctc agc ggc agc ggc tat gcg gct ggc
1838
Gly Ser Ser Tyr Thr Leu Ser Leu Ser Gly Ser Gly Tyr Ala Ala Gly
435 440 445

20 acc aag ctg gtg gaa atg tac acc tgc acc gct gtt acc gtt gat tcg
1886
Thr Lys Leu Val Glu Met Tyr Thr Cys Thr Ala Val Thr Val Asp Ser
450 455 460

25 aat ggc aac atc gca gtt tcc atg acc tct ggg ctg cct cga gtg ttt
1934
Asn Gly Asn Ile Ala Val Ser Met Thr Ser Gly Leu Pro Arg Val Phe
465 470 475 480

30 atg ctg gcc tcc tct gca tgc tct ctt tgc agt tcc gcg tgc tcc gca
1982
Met Leu Ala Ser Ser Ala Cys Ser Leu Cys Ser Ser Ala Cys Ser Ala
485 490 495

35 act gca acc acg ctc aag act acg acc gct acg gcg acc agc tgc acc
2030
Thr Ala Thr Thr Leu Lys Thr Thr Thr Ala Thr Ala Thr Ser Cys Thr
500 505 510

40 caa gcc acc gct ctg cct gtt ctg ttt aaa gat aca gtg acc act tct
2078
Gln Ala Thr Ala Leu Pro Val Leu Phe Lys Asp Thr Val Thr Thr Ser
515 520 525

45 tac ggt cag agc gtc tat ctc gcc ggc tcg atc agt cag ctc ggt aac
2126
Tyr Gly Gln Ser Val Tyr Leu Ala Gly Ser Ile Ser Gln Leu Gly Asn
530 535 540

50 tgg aac gcc gct aat gct gtt gcg ttg tcc gct gat aag tac aca tca
2174
Trp Asn Ala Ala Asn Ala Val Ala Leu Ser Ala Asp Lys Tyr Thr Ser
545 550 555 560

55 tcc aat ccc tta tgg tac gca act gtg acg ctg ccc gtg gga act tcg
2222
Ser Asn Pro Leu Trp Tyr Ala Thr Val Thr Leu Pro Val Gly Thr Ser

ES 2 632 011 T3

	565		570		575
	ttc cag tac aag ttc atc aaa aag acg agc ggc tct ggc tcg gtc act				
	2270				
5	Phe Gln Tyr Lys Phe Ile Lys Lys Thr Ser Gly Ser Gly Ser Val Thr				
	580		585		590
	tgg gag agc gac ccc aac cgg tcg tac aca gtc ccc acc gga tgc gtg				
	2318				
10	Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Ser Tyr Thr Val Pro Thr Gly Cys Val				
	595		600		605
	ggc tct acg gcc act gtc act gct acg tgg agg tag				
	2354				
15	Gly Ser Thr Ala Thr Val Thr Ala Thr Trp Arg				
	610		615		
	<210> 4				
20	<211> 619				
	<212> PRT				
	<213> Penicillium oxalicum				
	<400> 4				
25	Met Lys Phe Leu Gly Leu Ala Ala Leu Phe Leu Ala Gln Thr Val Ala				
	1	5	10		15
	Gly Leu Thr Ala Ala Gln Trp Arg Ser Gln Ser Ile Tyr Phe Leu Met				
30		20	25		30
	Thr Asp Arg Phe Gly Arg Thr Asp Lys Ser Val Thr Ala Pro Cys Asn				
35		35	40		45
	Thr Asn Asp Arg Val Tyr Cys Gly Gly Thr Trp Gln Gly Ile Ile Asn				
40		50	55		60
	Gln Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met Gly Phe Thr Ala Ile Trp Ile Thr				
	65		70		75
45	Pro Val Thr Glu Gln Leu Pro Gln Asp Thr Gly Asp Gly Glu Ala Tyr				
		85	90		95
50	His Gly Tyr Trp Gln Gln Glu Ile Tyr Asn Val Asn Asn Asn Tyr Gly				
		100	105		110
	Thr Ala Ala Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Ala Leu His Ser Arg Gly				
55		115	120		125

ES 2 632 011 T3

	Met	Tyr	Leu	Met	Val	Asp	Val	Val	Ala	Asn	His	Met	Gly	Tyr	Ala	Gly	
	130						135					140					
5	Ala	Gly	Asn	Thr	Val	Asp	Tyr	Ser	Val	Phe	Lys	Pro	Phe	Ser	Ser	Ser	
	145					150					155					160	
10	Ser	Tyr	Phe	His	Pro	Tyr	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Tyr	Ser	Asn	Gln	Thr	
					165					170					175		
15	Asn	Val	Glu	Asp	Cys	Trp	Leu	Gly	Asp	Thr	Thr	Val	Ser	Leu	Pro	Asp	
				180					185					190			
20	Leu	Asp	Thr	Thr	Leu	Ser	Ser	Val	Gln	Thr	Ile	Trp	Tyr	Asn	Trp	Val	
		195						200					205				
25	Ser	Asp	Leu	Val	Ser	Asn	Tyr	Ser	Ile	Asp	Gly	Leu	Arg	Ile	Asp	Thr	
	210					215					220						
30	Val	Lys	His	Val	Gln	Lys	Ser	Phe	Trp	Pro	Gly	Tyr	Gln	Ser	Ala	Ala	
	225					230					235					240	
35	Gly	Val	Tyr	Cys	Val	Gly	Glu	Val	Phe	Ser	Gly	Asp	Pro	Ala	Tyr	Thr	
				245						250					255		
40	Cys	Pro	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Leu	Asp	Gly	Val	Leu	Asn	Tyr	Pro	Ile	Tyr	
				260					265					270			
45	Tyr	Gln	Leu	Leu	Gly	Ala	Phe	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Ile	Ser	Ser	
		275						280					285				
50	Leu	Tyr	Asn	Met	Ile	Asn	Ser	Val	Ala	Ser	Asp	Cys	Ala	Asp	Pro	Thr	
	290					295						300					
55	Leu	Leu	Gly	Asn	Phe	Ile	Glu	Asn	His	Asp	Asn	Pro	Arg	Phe	Ala	Ser	
	305					310					315					320	
60	Tyr	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Gln	Ala	Lys	Asn	Val	Ile	Ser	Phe	Ile	Phe	
				325						330					335		
65	Leu	Ser	Asp	Gly	Ile	Pro	Ile	Val	Tyr	Ala	Gly	Gln	Glu	Gln	His	Tyr	
			340						345					350			

ES 2 632 011 T3

	Ser	Gly	Gly	Asn	Asp	Pro	Ala	Asn	Arg	Glu	Ala	Thr	Trp	Leu	Ser	Gly
			355					360					365			
5	Tyr	Ser	Lys	Asn	Ala	Gln	Leu	Tyr	Gln	His	Ile	Ala	Ser	Thr	Asn	Lys
		370					375					380				
10	Ile	Arg	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Lys	Asp	Ala	Asn	Tyr	Ile	Thr	Ser	Lys
	385					390					395					400
15	Asn	Asn	Ala	Phe	Tyr	Thr	Asp	Ser	Asn	Thr	Ile	Ala	Met	Lys	Lys	Gly
				405						410					415	
20	Ser	Ser	Gly	Ser	Gln	Val	Val	Thr	Val	Leu	Ser	Asn	Arg	Gly	Ser	Ser
				420					425					430		
25	Gly	Ser	Ser	Tyr	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ala	Ala	Gly
			435					440					445			
30	Thr	Lys	Leu	Val	Glu	Met	Tyr	Thr	Cys	Thr	Ala	Val	Thr	Val	Asp	Ser
		450					455					460				
35	Asn	Gly	Asn	Ile	Ala	Val	Ser	Met	Thr	Ser	Gly	Leu	Pro	Arg	Val	Phe
	465					470					475					480
40	Met	Leu	Ala	Ser	Ser	Ala	Cys	Ser	Leu	Cys	Ser	Ser	Ala	Cys	Ser	Ala
				485						490					495	
45	Thr	Ala	Thr	Thr	Leu	Lys	Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Ala	Thr	Ser	Cys	Thr
				500					505					510		
50	Gln	Ala	Thr	Ala	Leu	Pro	Val	Leu	Phe	Lys	Asp	Thr	Val	Thr	Thr	Ser
		515						520					525			
55	Tyr	Gly	Gln	Ser	Val	Tyr	Leu	Ala	Gly	Ser	Ile	Ser	Gln	Leu	Gly	Asn
		530					535					540				
60	Trp	Asn	Ala	Ala	Asn	Ala	Val	Ala	Leu	Ser	Ala	Asp	Lys	Tyr	Thr	Ser
	545					550					555					560
65	Ser	Asn	Pro	Leu	Trp	Tyr	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Pro	Val	Gly	Thr	Ser
				565					570						575	
70	Phe	Gln	Tyr	Lys	Phe	Ile	Lys	Lys	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Val	Thr

ES 2 632 011 T3

580

585

590

5 Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Ser Tyr Thr Val Pro Thr Gly Cys Val
595 600 605

10 Gly Ser Thr Ala Thr Val Thr Ala Thr Trp Arg
610 615

<210> 5
<211> 44
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

20 <400> 5
attattcgaa ggatccacca tgttcttcac atcctcggtc tgct
44

25 <210> 6
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Constructo sintético

<400> 6
ggtgctgatg gaattcggaa taaccacaca atccgctgc
35 39

<210> 7
<211> 48
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

45 <400> 7
attattcgaa ggatccacca tgaaattcct tggactagct gctttggt
48

50 <210> 8
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Constructo sintético

<400> 8
ggtgctgatg gaattccctc cacgtagcag tgacagtgg
39

5

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado con actividad de alfa-amilasa, seleccionado del grupo que consiste en:
un polipéptido con 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 %, al menos 99 % o 100 % de identidad de secuencia con amino ácidos 21-619 de la SEC ID N.º: 4; donde % identidad se determina utilizando el programa Needle del paquete EMBOSS con una penalización por apertura de espacio de 10, una penalización por extensión de espacio de 0,5, y el EBLOSUM62 por el cálculo: (residuos idénticos x 100)/(longitud de alineamiento - número total de espacios en el alineamiento).
2. Polipéptido, según la reivindicación 1, que comprende o consiste en la SEC ID N.º: 4 o aminoácidos 21-619 de la SEC ID N.º: 4.
3. Polipéptido aislado que comprende un dominio catalítico con al menos 95 % de identidad de secuencia con amino ácidos 21 a 493 de la SEC ID N.º: 4.
4. Polinucleótido aislado que codifica el polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
5. Método para producir el polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende:
(a) cultivo de una célula, que en su forma tipo salvaje produce el polipéptido, bajo condiciones convenientes para la producción del polipéptido; y
(b) recuperación del polipéptido.
6. Método para producir un polipéptido con actividad de alfa-amilasa, que comprende:
(a) cultivo de una célula huésped recombinante que comprende el polinucleótido, según la reivindicación 4, bajo condiciones convenientes para la producción del polipéptido; y opcionalmente
(b) recuperación del polipéptido.
7. Formulación de caldo completo o composición de cultivo celular que comprende el polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
8. Composición que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y una enzima seleccionada del grupo que consiste en: una alfa-amilasa fúngica EC 3.2.1.1, una beta-amilasa EC 3.2.1.2, una glucoamilasa EC 3.2.1.3, unas pululanases EC 3.2.1.41, una fitasa EC 3.1.2.28 y una proteasa EC 3.4..
9. Uso del polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, la formulación de caldo completo o composición de cultivo celular, según la reivindicación 7 o la composición según la reivindicación 8, para la conversión de almidón, modificación de almidón en el papel e industria de pulpa, licuefacción de almidón y/o sacarificación, lavado textil, desencolado textil, destilación, producción de etanol y/o cocción.
10. Método para la conversión de almidón, modificación de almidón en el papel e industria de pulpa, licuefacción y/o sacarificación de almidón, lavado textil, desencolado textil, destilación, producción de etanol y/o cocción, donde se añade un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
11. Célula huésped recombinante, que comprende el polinucleótido según la reivindicación 4.
12. Célula huésped recombinante, según la reivindicación 11, donde la célula huésped es una célula de levadura.
13. Célula huésped recombinante, según la reivindicación 12, donde la levadura es una *Saccharomyce cerevisiae*.

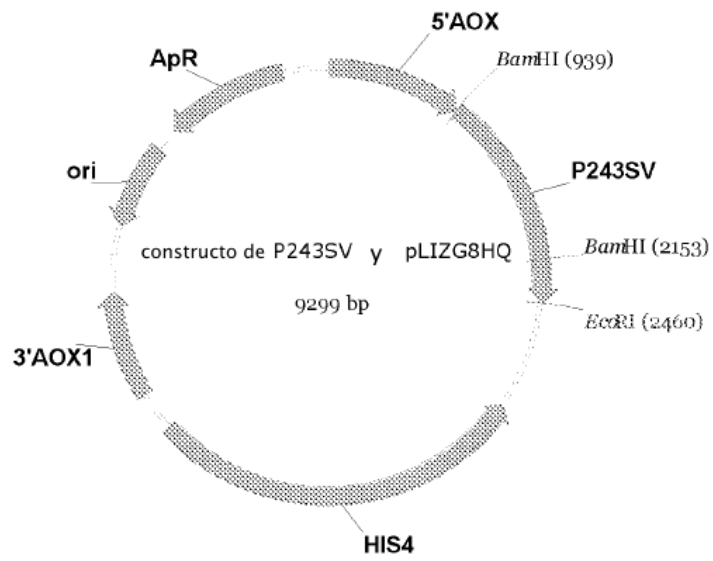


Fig 1

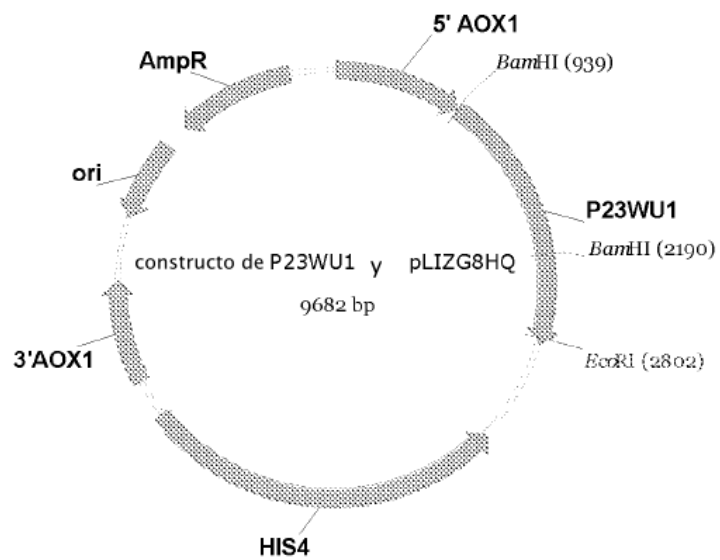


Fig 2