

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 555**

51 Int. Cl.:

C12N 9/30	(2006.01) A23L 33/18	(2006.01)
C12N 9/34	(2006.01) A23L 29/30	(2006.01)
C12N 15/82	(2006.01)	
C12P 7/06	(2006.01)	
C12P 19/14	(2006.01)	
C12N 5/14	(2006.01)	
C12P 7/10	(2006.01)	
C12N 9/28	(2006.01)	
C12P 7/14	(2006.01)	
A23L 29/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2010 PCT/US2010/058337**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2012 WO12064350**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2010 E 10784429 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2637515**

54 Título: **Polipéptidos con actividad glucoamilasa y polinucleótidos que los codifican**

30 Prioridad:

08.11.2010 US 411045 P

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

12.01.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 649 555 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 glucoamilasa y polinucleótidos que los codifican

Referencia a un listado de secuencias

- 5 [0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en formato legible por ordenador, que se incorpora aquí por referencia.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

- 10 [0002] La presente invención se refiere a polipéptidos con actividad glucoamilasa y polinucleótidos que codifican los polipéptidos. La invención también se refiere a los constructos de ácidos nucleicos, los vectores y las células huésped que comprenden los polinucleótidos, así como a los métodos para producir y usar los polipéptidos, y al empleo de las glucoamilasas de la invención con el fin de transformar el almidón para obtener productos de fermentación, tales como etanol, y jarabes, como la glucosa. Asimismo, la invención se refiere a una composición que comprende una glucoamilasa de la invención.
- 15

Descripción de la técnica relacionada

- 20 [0003] La glucoamilasa (1,4-alfa-D-glucano glucohidrolasa, EC 3.2.1.3) es una enzima que cataliza la liberación de D-glucosa desde los extremos no reductores del almidón o desde las moléculas oligoscáridas y polisacáridas relacionadas. Las glucoamilasas son producidas por varios hongos filamentosos y levaduras, de las cuales las del género *Aspergillus* son las más importantes comercialmente.

- 25 [0004] Desde el punto de vista comercial, las glucoamilasas se utilizan para convertir productos amiláceos, parcialmente hidrolizados previamente mediante una alfa-amilasa, en glucosa. A continuación, la glucosa puede convertirse directa o indirectamente en un producto de fermentación usando un organismo de fermentación. Algunos ejemplos de productos de fermentación comerciales incluyen alcoholes (p. ej., etanol, metanol, butanol, 1,3-propanodiol), ácidos orgánicos (p. ej., ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, gluconato, ácido succínico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico), cetonas (p. ej., acetona), aminoácidos (p. ej., ácido glutámico), gases (p. ej., H₂ y CO₂) y compuestos más complejos, incluidos, por ejemplo, antibióticos (p. ej., penicilina y tetraciclina), enzimas, vitaminas (p. ej., riboflavina, B₁₂, betacaroteno), hormonas y otros compuestos difíciles de producir de manera sintética. Los procesos de fermentación también se usan habitualmente en la industria del alcohol para consumo (p. ej., cerveza y vino) y de productos lácteos (p. ej., en la producción de yogur y queso).
- 30

- 35 [0005] El producto final también puede ser un jarabe. A modo de ejemplo, el producto final puede ser glucosa, pero también puede convertirse mediante, por ejemplo, una glucosa isomerasa, en fructosa o en una mezcla compuesta prácticamente por igual de glucosa y fructosa. Esta mezcla, o una mezcla enriquecida posteriormente con fructosa, compone el jarabe de maíz alto en fructosa (JMAF) más utilizado y comercializado en todo el mundo.
- 40

- 45 [0006] Uno de los objetivos de la presente invención es presentar polipéptidos que tengan actividad glucoamilasa y polinucleótidos que codifiquen estos polipéptidos, y que además proporcionen un alto rendimiento en los procesos de obtención de productos de fermentación, como pueden ser los procesos de producción de etanol, incluyendo los procesos de fermentación de etanol en un único paso a partir de almidón no gelatinizado crudo (o sin cocinar).

[0007] UniProt: BOCVJ1 presenta un polipéptido de *Laccaria bicolor* y WO 2006/069289 describe una glucoamilasa de *Trametes cingulata*.

Resumen de la invención

- [0008] Se han identificado y caracterizado los polipéptidos producidos por el hongo *Byssocorticium* que tienen actividad glucoamilasa.

- 55 [0009] Por consiguiente, la presente invención se refiere, en un primer aspecto, a un polipéptido aislado que tiene actividad glucoamilasa, seleccionado del grupo consistente en: a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 81 %, más preferentemente al menos un 82 %, más preferentemente al menos un 83 %, más preferentemente al menos un 84 %, más preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 86 %, más preferentemente al menos un 87 %, más preferentemente al menos un 88 %, más preferentemente a al
- 60

menos un 89 %, más preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 91 %, más preferentemente al menos un 92 %, incluso más preferentemente al menos un 93 %, más preferentemente al menos un 94 % y aún más preferentemente al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o incluso un 100 % de identidad con los aminoácidos 20 a 573 de la SEQ ID N.º 2; b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 81 %, más preferentemente al menos un 82 %, más preferentemente al menos un 83 %, más preferentemente al menos un 84 %, más preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 86 %, más preferentemente al menos un 87 %, más preferentemente al menos un 88 %, más preferentemente al menos un 89 %, más preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 91 %, más preferentemente al menos un 92 %, incluso más preferentemente al menos un 93 %, más preferentemente al menos un 94 % y aún más preferentemente al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o incluso un 100 % de identidad con el dominio catalítico mostrado como los aminoácidos 21 a 472 de la SEQ ID N.º 2.

[0010] La presente invención se refiere, en un segundo aspecto, a un polinucleótido aislado que incluye una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido del primer aspecto.

[0011] En aspectos adicionales, la invención se refiere a un constructo de ácidos nucleicos, un vector de expresión recombinante y una célula huésped recombinante que comprenden el polinucleótido del segundo aspecto.

[0012] En otros aspectos adicionales, la invención se refiere a los métodos para producir el polipéptido, a los usos del polipéptido, y presenta una composición que comprende el polipéptido y una alfa-amilasa.

Definiciones

[0013] **Glucoamilasa:** El término "glucoamilasa" (1,4-alfa-D-glucano glucanohidrolasa, EC 3.2.1.3) se define como una enzima que cataliza la liberación de D-glucosa a partir de los extremos no reductores del almidón o de las moléculas oligosacáridas y polisacáridas. A efectos de la presente invención, la actividad glucoamilasa se determina según el procedimiento descrito en la sección "Materiales y Métodos", incluida más adelante.

[0014] Los polipéptidos de la presente invención poseen al menos un 20 %, preferentemente al menos un 30 %, más preferentemente al menos un 40 %, más preferentemente al menos un 45 %, más preferentemente al menos un 50 %, más preferentemente al menos un 55 %, más preferentemente al menos un 60 %, más preferentemente al menos un 65 %, más preferentemente al menos un 70 %, más preferentemente al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 85 %, incluso más preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, y aún más preferentemente al menos un 100 % de la actividad glucoamilasa del polipéptido maduro presente en la SEQ ID N.º 2, o bien de los polipéptidos homólogos que comprenden una secuencia de aminoácidos que presenta un grado de identidad con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º 2 de preferentemente al menos un 82 %, más preferentemente al menos un 83 %, más preferentemente al menos un 84 %, más preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 86 %, más preferentemente al menos un 87 %, más preferentemente al menos un 88 %, más preferentemente al menos un 89 %, más preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 91 %, más preferentemente al menos un 92 %, aún más preferentemente al menos un 93 %, lo más preferentemente sería al menos un 94 %, e incluso más preferentemente al menos un 95 %, al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o incluso un 100 %.

[0015] **Polipéptido aislado:** El término "polipéptido aislado" hace referencia a un polipéptido que se aísla de una fuente. Preferentemente, el polipéptido es al menos 1 % puro, preferentemente al menos 5 % puro, más preferentemente al menos 10 % puro, más preferentemente al menos 20 % puro, más preferentemente al menos 40 % puro, más preferentemente al menos 60 % puro, incluso más preferentemente al menos 80 % puro, y más preferentemente al menos 90 % puro, según lo determinado por SDS-PAGE.

[0016] **Polipéptido sustancialmente puro:** El término "polipéptido sustancialmente puro" denota, en esta solicitud de patente, una preparación del polipéptido que contiene como máximo un 10 %, preferentemente como máximo un 8 %, más preferentemente como máximo un 6 %, más preferentemente como máximo un 5 %, más preferentemente como máximo un 4 %, más preferentemente como máximo un 3 %, incluso más preferentemente como máximo un 2 %, más preferentemente como máximo un 1 %, e incluso más preferentemente como máximo un 0,5 % en peso de otro material polipeptídico con el que está asociado de forma nativa o recombinante. Por lo tanto, es preferible que el polipéptido sustancialmente puro sea al menos 92 % puro, preferentemente al menos 94 % puro, más preferentemente al menos 95 % puro, más preferentemente al menos 96 % puro, más preferentemente al menos 96 % puro, más preferentemente al menos 97 % puro, más preferentemente al menos 98 % puro, incluso más preferentemente al menos 99 %, más preferentemente al menos 99,5 % puro, e incluso más preferentemente 100 % puro en peso del material polipeptídico total presente en la preparación. Los polipéptidos de la presente invención están

preferentemente en una forma sustancialmente pura, es decir, la preparación del polipéptido está esencialmente libre de otro material polipeptídico con el que esté asociado de forma nativa o recombinante. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la preparación del polipéptido empleando métodos recombinantes conocidos o métodos de purificación tradicionales.

[0017] **Polipéptido maduro:** El término "polipéptido maduro" hace referencia a un polipéptido en su forma final, tras la traducción y después de cualquier modificación postraducciona, como el procesamiento del N-terminal, el truncamiento del C-terminal, la glicosilación, la fosforilación, etc. En un aspecto, el polipéptido maduro equivale a los aminoácidos 20 a 573 de la SEQ ID n.º 2 según el programa SignalP (Nielsen *et al.*, 1997, Protein Engineering 10: 1-6), que predice que los aminoácidos 1 a 19 de SEQ ID n.º 2 son un péptido señal. La secuencia definida por los aminoácidos 21 a 472 de la SEQ ID n.º 2 es el dominio catalítico, mientras que la secuencia definida por los aminoácidos 480 a 573 de la SEQ ID n.º 2 es un dominio de unión al almidón.

[0018] **Secuencia codificante del polipéptido maduro:** El término "secuencia codificante del polipéptido maduro" se define en la presente solicitud como una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido maduro con actividad glucoamilasa. Preferentemente, la secuencia codificante del polipéptido maduro son las posiciones de nucleótidos 58 a 156, 215 a 491, 549 a 696, 753 a 912, 971 a 1709, 1763 a 1858 y 1918 a 2063 de la SEQ ID n.º 1.

[0019] **Identidad:** La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad".

[0020] Para los fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453) según lo implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, Trends in Genetics 16:276-277), preferentemente la versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales utilizados son la penalización de apertura de gap de 10, la penalización de extensión de gap de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle denominado "identidad más larga" (obtenido mediante la opción *-nbrief*) se utiliza como identidad porcentual y se calcula de la siguiente manera:

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

[0021] A efectos de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias desoxirribonucleótidas se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, *supra*), según lo implementado en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice *et al.*, 2000, *supra*), preferentemente la versión 3.0.0 o posterior. Los parámetros opcionales utilizados son la penalización de apertura de gap de 10, la penalización de extensión de gap de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle denominado "identidad más larga" (obtenida mediante la opción *-nbrief*) se utiliza como identidad porcentual y se calcula de la siguiente manera:

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

[0022] **Fragmento polipeptídico:** El término "fragmento polipeptídico" se define en la presente solicitud como un polipéptido que tiene uno o más (varios) aminoácidos eliminados del extremo amino y/o carboxilo del polipéptido maduro de la SEQ ID n.º 2, donde el fragmento presenta actividad glucoamilasa. Preferentemente, un fragmento contiene al menos 500 residuos de aminoácidos, más preferentemente al menos 450 residuos de aminoácidos, y más preferentemente al menos 400 residuos de aminoácidos del polipéptido maduro de la SEQ ID n.º 2. Un fragmento determinado es la secuencia definida por los aminoácidos 21 a 472 de SEQ ID n.º 2, que comprende el dominio catalítico del polipéptido de la invención.

[0023] **Subsecuencia:** El término "subsecuencia" se define en la presente solicitud como una secuencia de nucleótidos que tiene uno o más (varios) nucleótidos eliminados del extremo 5' y/o 3' de la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º 1, donde la subsecuencia codifica un fragmento polipeptídico con actividad glucoamilasa. Preferentemente, una subsecuencia contiene al menos 1500 nucleótidos, más preferentemente al menos 1400 nucleótidos, y más preferentemente al menos 1200 nucleótidos de la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n.º 1.

[0024] **Variante alélica:** El término "variante alélica" indica en la presente solicitud cualquiera de entre dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica se produce de manera natural a través de la mutación, y puede dar lugar a un polimorfismo en las poblaciones. Las mutaciones génicas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tengan secuencias de aminoácidos alteradas. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0025] **Polinucleótido aislado:** El término "polinucleótido aislado", de la forma en que se utiliza en el presente documento, se refiere a un polinucleótido que se aísla de una fuente. Preferentemente, el polinucleótido es al menos 1 % puro, preferentemente al menos 5 % puro, más preferentemente al menos 10 % puro, más preferentemente al menos 20 % puro, más preferentemente al menos 40 % puro, más preferentemente al menos 60 % puro, incluso más preferentemente al menos 80 % puro, y más preferentemente al menos 90 % puro, según se determina por electroforesis de agarosa.

[0026] **Polinucleótido sustancialmente puro:** El término "polinucleótido sustancialmente puro", de la forma en que se utiliza en el presente documento, se refiere a una preparación del polinucleótido en la que no están presentes otros nucleótidos externos o no deseados, y en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteínas modificadas genéticamente. Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como máximo un 10 %, preferentemente como máximo un 8 %, más preferentemente como máximo un 6 %, más preferentemente como máximo un 5 %, más preferentemente como máximo un 4 %, más preferentemente como máximo un 3 %, incluso más preferentemente como máximo un 2 %, más preferentemente como máximo un 1 %, e incluso más preferentemente como máximo un 0,5 % en peso de otro material polinucleótido con el que esté asociado de forma nativa o recombinante. No obstante, un polinucleótido sustancialmente puro puede incluir las regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural, tales como promotores y terminadores. Es preferible que el polinucleótido sustancialmente puro sea al menos 90 % puro, preferentemente al menos 92 % puro, y se prefieren porcentajes más altos, como al menos 94 % puro, al menos 95 % puro, al menos 96 % puro, al menos 97 % puro, al menos 98 % puro, al menos 99 % puro, y lo más preferible al menos 99,5 % puro en peso. Los polinucleótidos de la presente invención se presentan preferentemente en una forma sustancialmente pura, es decir, la preparación del polinucleótido está esencialmente libre de otro material polinucleótido con el que esté asociada de forma nativa o recombinante. El origen de los polinucleótidos puede ser de carácter genómico, de ADNc, de ARN, semisintético, sintético o cualquier combinación de los mismos.

[0027] **Secuencia codificante:** De la forma en que se utiliza en la presente solicitud, el término "secuencia codificante" hace referencia a una secuencia de nucleótidos, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteico. Los límites de la secuencia codificante están generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que normalmente comienza con el codón de inicio ATG o con codones de inicio alternativos, tales como GTG y TTG, y termina con un codón de parada, como TAA, TAG o TGA. La secuencia codificante puede ser una secuencia de nucleótidos de ADN, de ADNc, sintética o recombinante.

[0028] **ADNc:** El término "ADNc" se define en la presente solicitud como una molécula de ADN que puede prepararse por transcripción inversa a partir de una molécula de ARNm madura y empalmada, obtenida a partir de una célula eucariota. El ADNc carece de las secuencias de intrones que normalmente están presentes en el ADN genómico correspondiente. El ARN primario e inicial transcrito es un precursor del ARNm, que se procesa a través de una serie de etapas antes de aparecer como ARNm empalmado maduro. Estas fases incluyen la delección de secuencias de intrones mediante un proceso llamado empalme. Por lo tanto, el ADNc derivado de ARNm carece de secuencias de intrones.

[0029] **Constructo de ácidos nucleicos:** El término "constructo de ácidos nucleicos" utilizado en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico, mono o bicatenaria, que se aísla de un gen de origen natural o que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos que de otra manera no existirían en la naturaleza, o que es de origen sintético. El término "constructo de ácidos nucleicos" es un sinónimo del término "casete de expresión" si el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0030] **Secuencias de control:** La definición del término "secuencias de control" en el presente documento incluye todos los componentes que son necesarios para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. Cada secuencia de control puede ser nativa o foránea a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, o pueden ser foráneas entre sí. Dichas secuencias de control incluyen, entre otras, una secuencia líder de poliadenilación, una secuencia de propéptido, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de la transcripción. Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de detención transcripcionales y traslacionales. Las secuencias de control pueden estar provistas de enlazadores con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la ligadura de las secuencias de control con la región de codificación de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido.

[0031] **Enlazado operativamente:** El término "enlazado operativamente" se define en el presente documento como una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada con respecto a la secuencia codificante de la secuencia de polinucleótidos, de manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

[0032] **Expresión:** El término "expresión" incluye cualquier etapa implicada en la producción del polipéptido, incluidas, entre otras, la transcripción, la modificación postranscripcional, la traducción, la modificación postraduccional y la secreción.

5 [0033] **Vector de expresión:** El término "vector de expresión" se define en este documento como una molécula de ADN lineal o circular que incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención y está enlazado operativamente a otros nucleótidos que permiten su expresión.

10 [0034] **Célula huésped:** El término "célula huésped", en el contexto del presente documento, incluye cualquier tipo de célula que pueda someterse a transformación, transfección, transducción y a otros procesos similares con un constructo de ácidos nucleicos o con un vector de expresión que comprenda un polinucleótido de la presente invención.

15 [0035] **Modificación:** El término "modificación" implica, en este documento, cualquier modificación química del polipéptido conformado por el polipéptido maduro de la SEQ ID N°: 2, así como la manipulación genética del ADN que codifica dicho polipéptido. Esta modificación puede ser una sustitución, una delección y/o una inserción de uno o más (varios) aminoácidos, así como sustituciones de una o más (varias) cadenas laterales de aminoácidos.

20 [0036] **Variante:** El término "variante" hace referencia a un polipéptido que tiene actividad glucoamilasa y que incluye una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o delección de uno o más (varios) residuos de aminoácidos en una o más (varias) posiciones. Una sustitución se define como el reemplazo de un aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente, una delección se refiere a la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición, y una inserción quiere decir añadir 1-3 aminoácidos adyacentes a un
25 aminoácido que ocupa una posición.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos con actividad glucoamilasa

30 [0037] En un primer aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que incluyen una secuencia de aminoácidos con un grado de identidad a los aminoácidos 20 a 573 de la SEQ ID n.º 2 de al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 81 %, y de forma más preferible al menos un 82 %, más preferentemente al menos un 83 %, más preferentemente al menos un 84 %, más preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 86 %, más preferentemente al menos un 87 %, más preferentemente al menos un 88 %, más preferentemente al menos un 89 %, más preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 91 %, más preferentemente al menos un 92 %, incluso más preferentemente al menos un 93 %, más preferentemente al menos un 94 %, e incluso más preferentemente al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, preferentemente al menos un 99 % o incluso, más preferentemente, un 100 % de identidad, con actividad glucoamilasa. En una forma de realización en concreto, los polipéptidos poseen una secuencia de aminoácidos que difiere en diez
40 aminoácidos, preferentemente en cinco aminoácidos, más preferentemente en cuatro aminoácidos, incluso más preferentemente en tres aminoácidos, más preferentemente en dos aminoácidos, e incluso más preferentemente en un aminoácido de los aminoácidos 20 a 573 de la SEQ ID n.º 2.

45 [0038] Un polipéptido de la presente invención comprende preferentemente los aminoácidos 20 a 573 de la SEQ ID n.º 2 con actividad glucoamilasa. En otro aspecto preferido de la presente invención, el polipéptido consiste en los aminoácidos 20 a 573 de la SEQ ID n.º 2.

[0039] La presente descripción se refiere además a polipéptidos aislados con actividad glucoamilasa que están codificados por polinucleótidos que se hibridan en condiciones de muy baja astringencia, más preferentemente en condiciones de baja astringencia, más preferentemente en condiciones de astringencia media, más preferentemente en condiciones de astringencia media-alta, incluso más preferentemente en condiciones de alta astringencia, y más preferentemente en condiciones de astringencia muy alta con a) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n.º 1, b) la secuencia de ADNc contenida en la SEQ ID n.º 1, c) una subsecuencia de a) o b), o d) una cadena complementaria completa de a), b) o c) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York). Una subsecuencia de la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n.º 1 contiene al menos 100 nucleótidos contiguos o, preferentemente, al menos 200 nucleótidos contiguos. Además, la subsecuencia puede codificar un fragmento polipeptídico con actividad glucoamilasa. Preferentemente, la cadena complementaria es la cadena complementaria completa de la secuencia
60 codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID n.º 1.

[0040] La secuencia de nucleótidos de la SEQ ID n.º 1, o una subsecuencia de la misma, así como la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID n.º 2, o un fragmento de la misma, se pueden utilizar para diseñar

sondas de ácido nucleico con el fin de identificar y clonar ADN que codifica polipéptidos con actividad glucoamilasa a partir de cepas de diferentes géneros o especies, según dicten los métodos conocidos en la técnica. En concreto, estas sondas se pueden usar para la hibridación con el ADNc o el ADN genómico del género o especie de interés, de acuerdo con el método estándar de transferencia de Southern, con el fin de

5 identificar y aislar el gen correspondiente. Las sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deberían tener al menos 14, preferentemente al menos 25, más preferentemente al menos 35, y más preferentemente al menos 70 nucleótidos de longitud. Sin embargo, se prefiere que la sonda de ácido nucleico tenga al menos 100 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, la sonda de ácido nucleico puede tener al menos 200 nucleótidos, preferentemente al menos 300 nucleótidos, más preferentemente al

10 menos 400 nucleótidos, o más preferentemente al menos 500 nucleótidos de longitud. Se pueden usar sondas incluso más largas, por ejemplo, sondas de ácido nucleico que tengan preferentemente al menos 600 nucleótidos, más preferentemente al menos 700 nucleótidos, aún más preferentemente al menos 800 nucleótidos, o más preferentemente al menos 900 nucleótidos de longitud. Se pueden usar tanto sondas de ADN como de ARN. Las sondas suelen estar etiquetadas para detectar el gen correspondiente (por ejemplo,

15 con ^{33}P , ^{32}P , ^3H , ^{35}S , biotina o avidina). La presente invención abarca estas sondas.

[0041] Por consiguiente, una genoteca de ADN genómico o de ADNc preparada a partir de otras cepas puede ser cribada para ADN que se hibride con las sondas descritas anteriormente y codifique un polipéptido con actividad glucoamilasa. Se puede separar el ADN genómico o de otro tipo del resto de cepas mediante

20 electroforesis en gel de agarosa o de poliacrilamida, o mediante otras técnicas de separación. El ADN de las genotecas o el ADN separado se puede transferir e inmovilizar sobre nitrocelulosa o sobre otro material portador adecuado. Para identificar ADN, o un clon, homólogo de la SEQ ID N.º 1, o de una subsecuencia del mismo, el material portador se usa preferentemente en una transferencia de Southern.

[0042] Para los fines de la presente publicación, la hibridación indica que la secuencia de nucleótidos se hibrida con una sonda de ácido nucleico etiquetada correspondiente a la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º 1, a la secuencia de ADNc contenida en la SEQ ID N.º 1, a su cadena complementaria completa, o a una subsecuencia de la misma, con unas condiciones de astringencia de muy

25 baja a muy alta. Las moléculas con las que se hibrida la sonda de ácido nucleico en estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, una película de rayos X.

[0043] Preferentemente, la sonda de ácidos nucleicos es la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º 1. En otro aspecto preferido, la sonda de ácidos nucleicos es una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido de la SEQ ID N.º 2, o una subsecuencia de ésta. En otro aspecto preferido, la

30 sonda de ácidos nucleicos es la SEQ ID N.º 1.

[0044] Para sondas largas que tengan al menos 100 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia de muy baja a muy alta se definen como prehibridación e hibridación a 42° C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado y, o 25 % de formamida para

40 astringencia muy baja y baja, o 35 % de formamida para astringencia media y media-alta, o bien 50 % de formamida para astringencia alta y muy alta, siguiendo el método estándar de transferencia de Southern, de 12 a 24 horas óptimamente.

[0045] Para sondas largas que tengan al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador se lava finalmente tres veces, durante 15 minutos cada una, usando 2X SSC y 0,2 % de SDS, preferentemente a 45 °C (muy baja astringencia), más preferentemente a 50 °C (astringencia baja), más preferentemente a 55 °C (astringencia media), más preferentemente a 60 °C (astringencia media-alta), incluso más preferentemente a 65 °C (astringencia alta), y más preferentemente a 70 °C (astringencia muy alta).

[0046] Para sondas cortas que tengan aproximadamente de 15 a 70 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia se definen como prehibridación, hibridación y lavado posterior a la hibridación, a aproximadamente de 5 °C a 10 °C por debajo de la T_m calculada según el método de Bolton y McCarthy (1962, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 48:1390) en 0,9 M de NaCl, 0,09 M de Tris-HCl con pH 7,6, 6 mM de EDTA, 0,5 % NP-40, 1X solución de Denhardt, 1 mM de pirofosfato de sodio, 1 mM

50 de fosfato monobásico de sodio, 0,1 mM de ATP y 0,2 mg de ARN de levadura por ml, de acuerdo con el método estándar de transferencia de Southern, de 12 a 24 horas óptimamente.

[0047] Para sondas cortas que tengan aproximadamente de 15 a 70 nucleótidos de longitud, el material portador se lava una vez en 6X SSC más 0,1 % de SDS durante 15 minutos, y dos veces durante 15 minutos

60 cada una usando 6X SSC a 5 °C a 10 °C por debajo de la T_m calculada.

[0048] En otro aspecto, la presente descripción se refiere a polipéptidos aislados con actividad glucoamilasa codificados por polinucleótidos que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que presentan un

65 grado de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 de al menos un 72 %, más preferentemente de al menos un 73 %, más preferentemente de al menos un 74 %, más preferentemente de al menos un 75 %, más preferentemente de al menos un 76 %, más preferentemente de

al menos un 77 %, más preferentemente de al menos un 78 %, más preferentemente de al menos un 79 %, más preferentemente de al menos un 80 %, más preferentemente de al menos un 81 %, más preferentemente de al menos un 82 %, más preferentemente de al menos un 83 %, más preferentemente de al menos un 84 %, más preferentemente de al menos un 85 %, más preferentemente de al menos un 86 %, más preferentemente de al menos un 87 %, más preferentemente de al menos un 88 %, más preferentemente de al menos un 89 %, más preferentemente de al menos un 90 %, más preferentemente de al menos un 91 %, más preferentemente de al menos un 92 %, incluso más preferentemente de al menos un 93 %, más preferentemente de al menos un 94 %, e incluso más preferentemente de al menos un 95 %, más preferentemente de al menos un 96 %, de al menos un 97 %, de al menos un 98 %, de al menos un 99 % o incluso más preferentemente de al menos un 100 %, que codifica un polipéptido activo. Véase la sección polinucleótidos en el presente documento.

[0049] La presente descripción también hace referencia a variantes artificiales, que incluyen la sustitución, delección y/o inserción de uno o más (o varios) aminoácidos del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º 2. Preferentemente, los cambios de aminoácidos son de carácter menor, es decir, sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al doblamiento y/o a la actividad de la proteína, delecciones pequeñas (normalmente, de uno a aproximadamente 30 aminoácidos), pequeñas extensiones aminoterminales o carboxiloterminales (tales como un residuo de metionina amino terminal), un pequeño péptido de enlace aproximadamente de hasta 20 a 25 residuos, o una pequeña extensión que facilita la purificación al cambiar la carga neta u otra función, como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

[0050] Algunos ejemplos de sustituciones conservadoras se encuentran dentro del grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). En la técnica, se conocen sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran su actividad específica, y son descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Los intercambios que se dan con más frecuencia 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.

[0051] Además de los 20 aminoácidos estándar, los aminoácidos no estándar (como 4-hidroxi prolina, 6-N-metil-lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina y alfa-metil serina) pueden sustituirse por residuos de aminoácidos de un polipéptido de tipo salvaje. Un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no están codificados por el código genético y aminoácidos no naturales pueden ser sustituidos por residuos de aminoácidos. Los "aminoácidos no naturales" se han modificado después de la síntesis de proteínas, y/o tienen una estructura química en su(s) cadena(s) lateral(es) diferente(s) de la presente en los aminoácidos estándar. Los aminoácidos no naturales se pueden sintetizar químicamente, preferentemente están disponibles en el mercado, e incluyen ácido pipecólico, ácido carboxílico de tiazolidina, deshidroprolina, 3- y 4-metilprolina y 3,3-dimetilprolina.

[0052] De forma alternativa, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos se ven alteradas. Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la estabilidad térmica del polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo, y producir otros efectos similares.

[0053] Los aminoácidos esenciales en el polipéptido progenitor se pueden identificar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, como la mutagénesis de sitio dirigido o la mutagénesis de barrido de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En esta última técnica, se introduce una única mutación de alanina en cada residuo de la molécula, y las moléculas mutadas resultantes se analizan para determinar la actividad glucoamilasa con el fin de identificar los residuos de aminoácidos que son cruciales para la actividad de la molécula. Véase también Hilton *et al.*, 1996, *J. Biol. Chem.* 271:4699-4708. Asimismo, puede determinarse el sitio activo de la enzima u otra interacción biológica mediante un análisis físico de la estructura, determinada por técnicas tales como la resonancia magnética nuclear, la cristalografía, la difracción de electrones o el marcaje de fotoafinidad, junto con la mutación de los aminoácidos de sitio de contacto putativo. Véase, por ejemplo, de Vos *et al.*, 1992, *Science* 255: 306-312; Smith *et al.*, 1992, *J. Mol. Biol.* 224:899-904; o Wlodaver *et al.*, 1992, *FEBS Lett.* 309:59-64. Las identidades de los aminoácidos esenciales también se pueden deducir a partir del análisis de identidades con polipéptidos que están relacionados con un polipéptido según la invención.

[0054] Se pueden realizar y evaluar sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos simples o múltiples mediante el empleo de métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o redistribución, seguidos de un procedimiento de selección pertinente, tales como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625. Otros de los métodos que se pueden emplear incluyen la PCR propensa a error, la presentación en fagos (por ejemplo, Lowman *et al.*, 1991, *Biochem.* 30:10832-10837; Patente N.º 5,223,409

de los EE. UU.; WO 92/06204), y la mutagénesis dirigida a la región (Derbyshire y otros, 1986, Gene 46: 145; Ner *et al.*, 1988, DNA 7: 127).

[0055] Los métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con métodos de selección automatizados de alto rendimiento para detectar actividad de polipéptidos clonados y mutagenizados expresados por células huésped (Ness *et al.*, 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos pueden recuperarse de las células huésped y secuenciarse rápidamente usando métodos habituales en la técnica. Estos métodos permiten determinar rápidamente la importancia de los residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y pueden aplicarse a polipéptidos de estructura desconocida.

[0056] El número total de sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos del polipéptido maduro, como los aminoácidos 20 a 573 de la SEQ ID N.º 2, o del dominio catalítico, como los aminoácidos 21 a 472 de la SEQ ID N.º 2, es 10, preferentemente 9, más preferentemente 8, más preferentemente 7, más preferentemente como máximo 6, más preferentemente 5, más preferentemente 4, incluso más preferentemente 3, más preferentemente 2, e incluso más preferentemente 1.

Fuentes de polipéptidos con actividad glucoamilasa

[0057] Un polipéptido con actividad glucoamilasa de la presente invención es, en una forma de realización, un polipéptido de *Byssocorticium* sp. con actividad glucoamilasa.

[0058] Como se comprenderá, con respecto a la especie mencionada anteriormente, la invención abarca tanto el estado perfecto como el imperfecto, y también otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, los anamorfos, independientemente del nombre de la especie por el que se les conozca. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes apropiados.

[0059] Las cepas de estas especies son fácilmente accesibles para el público a través de una serie de colecciones de cultivos, como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS), Agricultural Research Service Patent Culture Collection o Northern Regional Research Center (NRRL).

[0060] Los polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos de fusión escindibles en los que otro polipéptido se fusiona en el N-terminal o el C-terminal del polipéptido o de un fragmento del mismo. Un polipéptido fusionado se produce mediante la fusión de una secuencia de nucleótidos (o una parte de ésta) que codifica otro polipéptido a una secuencia de nucleótidos (o a una parte de la misma) de la presente invención. Los métodos para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos, de modo que estén dentro del marco, y conseguir que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo el control del mismo promotor, o promotores, y terminador.

[0061] Un polipéptido de fusión puede comprender, además, un sitio de escisión. Tras la secreción de la proteína de fusión, el sitio se escinde y libera el polipéptido con actividad glucoamilasa a partir de la proteína de fusión. Algunos ejemplos de sitios de escisión incluyen, entre otros, un sitio Kex2 que codifica el dipéptido Lys-Arg (Martin *et al.*, 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3:568-76; Svetina *et al.*, 2000, J. Biotechnol. 76:245-251; Rasmussen-Wilson *et al.*, 1997, Appl. Reinar. Microbiol. 63:3488-3493; Ward *et al.*, 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras *et al.*, 1991, Biotechnology 9: 378-381), un sitio Ile-(Glu o Asp)-Gly-Arg, que es escindido por una proteasa de factor Xa tras el residuo de arginina (Eaton *et al.*, 1986, Biochem. 25:505-512); un sitio Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, que es escindido por una enteroquinasa tras la lisina (Collins-Racie *et al.*, 1995, Biotechnology 13: 982-987); un sitio His-Tyr-Glu o un sitio His-Tyr-Asp, escindido por Genenase I (Carter *et al.*, 1989, Proteins: Structure, Function and Genetics 6: 240-248); un sitio Leu-Val-Pro-Arg-Gly-Ser, escindido por la trombina después de la Arg (Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48); un sitio Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Gly, que es escindido por la proteasa TEV después de la Gln (Stevens, 2003, *supra*); y un sitio Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln-Gly-Pro, escindido por una forma genéticamente modificada de la proteasa 3C del rinovirus humano después de la Gln (Stevens, 2003, *supra*).

Polinucleótidos

[0062] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos con actividad glucoamilasa de la presente invención.

[0063] Preferentemente, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la SEQ ID N.º 1. En otro aspecto preferido, la secuencia de nucleótidos comprende o consiste en la secuencia que codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º 1.

[0064] La presente descripción también se refiere a polinucleótidos mutados que comprenden o consisten en al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º 1, en la que la secuencia de nucleótidos mutada codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º 2.

5 [0065] Los métodos empleados para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido se conocen en la técnica, e incluyen el aislamiento del ADN genómico, la preparación a partir de ADNc, o una combinación de ambas técnicas. La clonación de los polinucleótidos de la presente invención a partir de
10 dicho ADN genómico puede realizarse, por ejemplo, mediante el uso de la conocida reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o el cribado de anticuerpos de las genotecas de expresión con el fin de detectar fragmentos de ADN clonados que presenten características estructurales compartidas. Véase, por ejemplo, Innis *et al.*, 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Se pueden usar otras técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la transcripción activada ligada (LAT) y la amplificación basada en la secuencia de nucleótidos (NASBA). Los polinucleótidos pueden clonarse a partir de una cepa de *Penicillium*, de otra cepa u otro organismo
15 relacionado y, por lo tanto, puede ser, por ejemplo, una variante alélica o de especie de la región que codifica el polipéptido de la secuencia de nucleótidos.

[0066] Asimismo, la presente descripción también hace referencia a polinucleótidos aislados que comprenden o consisten en secuencias de nucleótidos que presentan un grado de identidad con la secuencia codificante
20 del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º 1 de preferentemente al menos un 72 %, más preferentemente al menos un 73 %, más preferentemente al menos un 74 %, más preferentemente al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 76 %, más preferentemente al menos un 77 %, más preferentemente al menos un 78 %, más preferentemente al menos un 79 %, más preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 81 %, más preferentemente al menos un 82 %, más preferentemente al menos un 83 %, más preferentemente al menos un 84 %, más preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 86 %, más preferentemente al menos un 87 %, más preferentemente al menos un 88 %, más preferentemente al menos un 89 %, más preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 91 %, más preferentemente al menos un 92 %, aún más preferentemente al menos un 93 %, más preferentemente al menos un 94 %, e incluso más preferentemente al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % de identidad, y que codifiquen un polipéptido activo.

[0067] Puede ser necesaria la modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención para la síntesis de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido. El término
35 "sustancialmente similar" al polipéptido se refiere a aquellas formas no naturales del polipéptido. Estos polipéptidos pueden diferir, de alguna forma modificada genéticamente, del polipéptido que ha sido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, con respecto a las variantes artificiales que difieren en actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo o similares. La secuencia variante se puede construir con base en la secuencia de nucleótidos presentada como la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º 1, p. ej., una subsecuencia de la misma, y/o mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos que no produzcan otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos, pero que correspondan al uso de codones del organismo huésped destinado a la producción de la enzima, o bien mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos que puedan producir una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de las sustituciones de nucleótidos, véase, por ejemplo, Ford *et al.*,
40 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

[0068] Resultará evidente para los expertos en la técnica que tales sustituciones pueden llevarse a cabo fuera de las regiones fundamentales para la función de la molécula y, aun así, dar como resultado un polipéptido activo. Los residuos de aminoácidos que son esenciales para la actividad del polipéptido
50 codificado por un polinucleótido aislado de la invención y, por lo tanto, preferentemente, que no estén sujetos a sustitución, se pueden identificar mediante procedimientos conocidos en la técnica, como la mutagénesis de sitio dirigido o la mutagénesis de barrido de alanina (véase, por ejemplo, Cunningham y Wells, 1989, *supra*). En esta última técnica, las mutaciones se introducen en cada residuo con carga positiva en la molécula, y las moléculas mutadas resultantes se analizan para determinar la actividad glucoamilasa con el fin de identificar los residuos de aminoácidos que sean cruciales para la actividad de la molécula. Los sitios de interacción sustrato-enzima también se pueden determinar con el análisis de la estructura tridimensional, tal y como determinan técnicas como el análisis de resonancia magnética nuclear, la cristalografía o el etiquetado de fotoafinidad (véase, p. ej., de Vos *et al.*, 1992, *supra*; Herrero *et al.*, 1992, *supra*; Wlodaver *et al.*, 1992, *supra*).

[0069] También se describen en la presente publicación polinucleótidos aislados que codifican polipéptidos de la presente invención, que se hibridan en condiciones de astringencia baja, preferentemente en condiciones de baja astringencia, más preferentemente en condiciones de astringencia media, más preferentemente en condiciones de astringencia media-alta, incluso más preferentemente en condiciones de astringencia alta, y más preferentemente en condiciones de astringencia muy alta con a) la secuencia que codifica el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º 1, b) la secuencia de ADNc contenida en la SEQ ID N.º 1, c)

una cadena complementaria completa de a) o b), o variantes alélicas y subsecuencias de las mismas (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*), tal y como se define en el presente documento. Preferentemente, la cadena complementaria es la cadena complementaria completa de la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º 1.

[0070] La presente descripción también se refiere a polinucleótidos aislados obtenidos mediante 1) la hibridación de una población de moléculas de ADN bajo condiciones de astringencia muy baja, baja, media, media alta, alta o muy alta con a) la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º 1, b) la secuencia de ADNc contenida en la SEQ ID N.º 1, o c) una cadena complementaria completa de a) o b); y 2) el aislamiento del polinucleótido hibridado, que codifica un polipéptido con actividad glucoamilasa. Preferentemente, la cadena complementaria es la cadena complementaria completa de la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º 1.

Enzimas híbridas

[0071] La presente descripción se refiere también a enzimas híbridas que comprenden un dominio catalítico con actividad enzimática (p. ej., actividad enzimática degradadora de almidón, como alfa-amilasa, amilopululanasa, beta-amilasa, CGTasa, glucoamilasa, isoamilasa, amilasa maltogénica y actividad pululanasa), y un módulo de unión a carbohidratos (CBM). La enzima híbrida puede incluir, además, un enlazador.

[0072] El híbrido puede producirse fusionando una primera secuencia de ADN que codifica un dominio catalítico con una segunda secuencia de ADN que codifica un módulo de unión a carbohidratos, o también puede producirse el híbrido en forma de un gen completamente sintético basándose en el conocimiento de las secuencias de aminoácidos de CBM adecuados, enlazadores y dominios catalíticos.

[0073] El término "enzima híbrida" (también denominada "proteína de fusión", "híbrido", "polipéptido híbrido" o "proteína híbrida") se emplea en el presente documento para caracterizar los polipéptidos híbridos de la invención que comprenden un módulo catalítico con actividad enzimática (p. ej., actividad enzimática degradadora de almidón, como alfa-amilasa, amilopululanasa, beta-amilasa, CGTasa, glucoamilasa, isoamilasa, amilasa maltogénica y actividad pululanasa) y un módulo de unión a carbohidratos en el que el dominio catalítico y el módulo de unión a carbohidratos se derivan de fuentes distintas. El término "fuente" incluye, entre otros, una enzima parental o una variante de la misma, p. ej., amilasa, glucoamilasa u otra actividad catalítica que comprenda un módulo catalítico adecuado y/o un CBM adecuado y/o un enlazador adecuado. No obstante, el CBM también puede derivar de un polipéptido sin actividad catalítica. El dominio catalítico y el módulo de unión a carbohidratos pueden derivar de la misma cepa microbiana, de cepas dentro de la misma especie, de especies estrechamente relacionadas o de organismos menos relacionados. Preferentemente, el dominio catalítico y el módulo de unión a carbohidratos de los híbridos derivan de fuentes diferentes, por ejemplo, de diferentes enzimas de la misma cepa y/o especie, o de cepas de diferentes especies.

[0074] En un aspecto, la enzima híbrida comprende el CBM (también conocido como dominio de unión a carbohidratos o CBD) según la invención y un dominio catalítico. El dominio catalítico es, en una forma de realización concreta, un dominio catalítico de glucoamilasa.

Constructos de ácidos nucleicos

[0075] La presente invención también describe constructos de ácidos nucleicos que incluyen un polinucleótido aislado de la presente invención unido operativamente a una o más (varias) secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada y en condiciones compatibles con las secuencias de control.

[0076] Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la presente invención puede manipularse de diversas maneras para posibilitar la expresión del polipéptido. La manipulación de la secuencia del polinucleótido antes de su inserción en un vector puede ser conveniente o necesaria, dependiendo del vector de expresión. Los métodos para modificar secuencias de polinucleótidos empleando métodos de ADN recombinante se conocen en la técnica.

[0077] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, como una secuencia de nucleótidos que es reconocida por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcionales que median en la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestre actividad transcripcional en la célula huésped elegida, incluyendo promotores mutados, truncados e híbridos, y se puede obtener a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares tanto homólogos como heterólogos a la célula huésped.

[0078] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de las construcciones de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son los promotores obtenidos a partir de los genes que codifican la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, la alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, la glucoamilasa (glaA) de *Aspergillus niger* o de *Aspergillus awamori*, la lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, la acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, la amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), la enzima Daria de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), la enzima Quinn de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), la proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), la beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, la celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, la celobiohidrolasa II de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, la endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, la xilanasa I de *Trichoderma reesei*, la xinalasa II de *Trichoderma reesei* o la beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, así como el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes que codifican la alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*), además de los promotores mutados, truncados e híbridos de los mismos.

[0079] En una célula huésped de levadura, los promotores útiles se obtienen a partir de los genes que codifican la enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, la galactoquinasa (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, la alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH1, ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*, la triosa fosfato isomerasa (TPI) de *Saccharomyces cerevisiae*, la metalotioneína (CUP1) de *Saccharomyces cerevisiae* y la 3-fosfoglicerato cinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para las células huésped de levadura se describen en Romanos *et al.*, 1992, Yeast 8: 423-488.

[0080] La secuencia de control también puede ser una secuencia de terminación de la transcripción adecuada, como una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción. La secuencia de terminación está enlazada operativamente al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. Cualquier terminador de carácter funcional en la célula huésped elegida puede utilizarse en la presente invención.

[0081] Los terminadores preferidos para las células huésped de hongos filamentosos se obtienen a partir de los genes que codifican la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la antralinato sintasa de *Aspergillus nidulans*, la alfa-glucosidasa de *Aspergillus*, y la proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

[0082] Los terminadores preferidos para las células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes que codifican la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae*, y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros terminadores útiles para las células huésped de levadura se describen en Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0083] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, como una región no traducida de un ARNm que es importante para la traducción por la célula huésped. La secuencia líder está enlazada operativamente al extremo 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. En la presente invención, puede utilizarse cualquier secuencia líder de carácter funcional en la célula huésped elegida.

[0084] Las secuencias líder preferidas para las células huésped de hongos filamentosos se obtienen a partir de los genes que codifican la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

[0085] Las secuencias líder adecuadas para las células huésped de levadura se obtienen a partir de los genes que codifican la enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, la 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, y la alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0086] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia enlazada operativamente al extremo 3' de la secuencia de nucleótidos que, al transcribirse, se reconoce por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. En la presente invención, puede utilizarse cualquier secuencia de poliadenilación de carácter funcional en la célula huésped elegida.

[0087] Las secuencias de poliadenilación preferidas para las células de hongos filamentosos se obtienen a partir de los genes que codifican la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la antralinato sintasa de *Aspergillus nidulans*, la proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*, y la alfa-

glucosidasa de *Aspergillus niger*.

[0088] Las secuencias de poliadenilación útiles para las células huésped de levadura se describen en Guo y Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.

[0089] La secuencia de control también puede ser una secuencia codificante del péptido señal que codifica una secuencia de aminoácidos enlazada al extremo amino de un polipéptido, y dirige el polipéptido codificado a la vía secretora de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos puede contener intrínsecamente una secuencia codificante del péptido señal enlazada naturalmente en el marco de lectura de la traducción con el segmento de la secuencia codificante que codifica el polipéptido secretado. De forma alternativa, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una secuencia codificante del péptido señal foránea a la secuencia codificante. Puede necesitarse la secuencia codificante del péptido señal foránea cuando la secuencia codificante no contenga una secuencia codificante del péptido señal de manera natural. Como alternativa, la secuencia codificante del péptido señal foránea puede simplemente reemplazar a la secuencia codificante del péptido señal natural para potenciar la secreción del polipéptido. Sin embargo, en la presente invención puede utilizarse cualquier secuencia codificante de péptido señal que dirija el polipéptido expresado a la vía secretora de una célula huésped de elección, es decir, secretada a un medio de cultivo.

[0090] Las secuencias codificantes de péptidos señal eficaces para células huésped de hongos filamentosos son las secuencias codificantes del péptido señal obtenidas a partir de los genes que codifican la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la amilasa neutra de *Aspergillus niger*, la glucoamilasa de *Aspergillus niger*, la proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, la celulasa de *Humicola insolens*, la endoglucanasa V de *Humicola insolens* y la lipasa de *Humicola lanuginosa*.

[0091] También podría ser conveniente añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido en relación con el crecimiento de la célula huésped. Ejemplos de sistemas reguladores son aquellos que provocan que la expresión del gen se active o se desactive como respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador. Los sistemas reguladores en células procariotas incluyen los sistemas de operadores *lac*, *tac*, *xyl* y *trp*. En levaduras, se puede usar el sistema ADH2 o el sistema GAL1. En hongos filamentosos, se pueden utilizar como secuencias reguladoras el promotor de la TAKA alfa-amilasa y el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* y el promotor de la glucoamilasa de *Aspergillus oryzae*. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son aquellas que permiten la amplificación génica. En los sistemas eucariotas, estas secuencias reguladoras incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados. En estos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido estaría enlazada operativamente a la secuencia reguladora.

Vectores de expresión

[0092] La presente invención también hace referencia a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor y señales de detención transcripcional y traduccional. Los diversos ácidos nucleicos y secuencias de control descritos en la presente solicitud pueden unirse para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más (varios) sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de nucleótidos codificante del polipéptido en dichos sitios. De manera alternativa, se puede expresar una secuencia de polinucleótidos de la presente invención mediante la inserción de la secuencia de nucleótidos o de un constructo de ácidos nucleicos que incluya la secuencia en un vector apropiado para su expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se ubica en el vector, de modo que la secuencia codificante está enlazada operativamente a las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0093] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o un virus) que puede someterse de manera conveniente a procedimientos de ADN recombinante y que puede producir la expresión de la secuencia de nucleótidos. La elección del vector dependerá normalmente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que se va a introducir dicho vector. Los vectores pueden ser plásmidos circulares lineales o cerrados.

[0094] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio que asegure la replicación autónoma. Como alternativa, puede ser un vector que, al introducirse en la célula huésped, se integra en el genoma y se replica junto con el/los cromosoma(s) en el/los que se ha integrado. Además, se puede usar un solo vector o plásmido, o dos o más vectores o plásmidos, que contienen en conjunto el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula huésped, o bien un transposón.

[0095] Los vectores de la presente invención preferentemente contienen uno o más (varios) marcadores seleccionables que permitan la fácil selección de células transformadas, transfectadas, transducidas o sometidas a un proceso similar. Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia a biocidas, a virus o a metales pesados, o bien prototrofia a auxótrofos, y similares.

[0096] Los marcadores seleccionables para su uso en una célula huésped de hongos filamentosos incluyen, entre otros, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina carbamoiltransferasa), *bar* (fosfotricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), *sC* (sulfato de adeniltransferasa), y *trpC* (antranilato sintasa), así como sus equivalentes. Los genes preferidos para su uso en una célula de *Aspergillus* son el *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o de *Aspergillus oryzae*, además del gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

[0097] Los vectores de la presente invención contienen preferentemente uno o varios elementos que permiten la integración del vector en el genoma de la célula huésped, o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0098] Para su integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede basarse en la secuencia del polinucleótido que codifica el polipéptido o en cualquier otro elemento del vector que pueda producir su integración en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga. De forma alternativa, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en una ubicación o ubicaciones precisas en el/los cromosoma(s). Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación precisa, los elementos de integración han de contener preferentemente un número suficiente de ácidos nucleicos; por ejemplo, de 100 a 10.000 pares de bases, preferentemente de 400 a 10.000 pares de bases, y más preferentemente de 800 a 10.000 pares de bases, que presenten un alto grado de identidad con respecto a la secuencia diana correspondiente, con el fin de aumentar la probabilidad de recombinación homóloga. Los elementos de integración pueden ser cualquier secuencia homóloga a la secuencia diana en el genoma de la célula huésped. Además, los elementos de integración pueden ser secuencias de nucleótidos codificantes o no codificantes. Por otro lado, el vector puede integrarse en el genoma de la célula huésped mediante recombinación no homóloga.

[0099] Para la replicación autónoma, el vector puede comprender, además, un origen de replicación que permita que el vector se replique de forma autónoma en la célula huésped en cuestión. El origen de replicación puede ser cualquier replicador de plásmido que medie en la replicación autónoma que se produzca en una célula. El término "origen de replicación" o "replicador de plásmido" se define en el presente documento como una secuencia de nucleótidos que permite la replicación de un plásmido o un vector *in vivo*.

[0100] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula de hongos filamentosos pueden ser AMA1 y ANS1 (Gems *et al.*, 1991, Gene 98: 61-67; Cullen *et al.*, 1987, Nucleic Acids Research 15: 9163-9175; WO 00/24883). Se puede lograr el aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que comprendan el gen siguiendo los métodos descritos en WO 00/24883.

[0101] Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en una célula huésped para aumentar la producción del producto génico. Puede obtenerse un aumento en el número de copias del polinucleótido mediante la integración de, al menos, una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped, o bien incluyendo un gen marcador de selección amplificable con el polinucleótido en el que las células contienen copias amplificadas de dicho gen marcador de selección, y de ese modo, pueden seleccionarse copias adicionales del polinucleótido mediante el cultivo de las células en presencia del agente de selección apropiado.

[0102] Los procedimientos usados para unir los elementos descritos anteriormente con el fin de construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, p. ej., Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

Células huésped

[0103] Asimismo, la presente invención se refiere a células huésped recombinantes que incluyen un polinucleótido aislado de la presente invención, y que se usan de manera provechosa en la producción recombinante de los polipéptidos. Un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico de replicación autónoma, como se ha descrito anteriormente. El término "célula huésped" abarca cualquier descendencia de una célula progenitora que no es idéntica a ésta debido a mutaciones que se producen durante la replicación. La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifica el polipéptido y de su fuente.

[0104] La célula huésped puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de

la presente invención, p. ej., una célula procariota o una eucariota.

[0105] La célula huésped procariota puede ser cualquier bacteria gram-positiva o gram-negativa. Las bacterias gram-positivas incluyen, entre otras, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Streptococcus*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*. Las bacterias gram-negativas incluyen, entre otras, *E. coli*, *Campylobacter*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Ureaplasma*.

[0106] La célula huésped también puede ser eucariota, como por ejemplo, una célula de mamífero, insecto, planta u hongo.

[0107] Preferentemente, la célula huésped es una célula de un hongo. El término "hongo", con respecto a su uso en este documento, incluye los filos *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Chytridiomycota* y *Zygomycota* (según lo definido en Hawksworth *et al.*, In, Ainsworth y Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido), así como el filo *Oomycota* (como se cita en Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*, pág. 171) y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*).

[0108] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. El uso del término "levadura" en el presente documento incluye levaduras ascospóricas (*Endomycetales*), levaduras basidiospóricas y levaduras que pertenecen a los hongos imperfectos (*Blastomycetes*). Dado que la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, a los efectos de esta invención, las levaduras se definirán según lo descrito en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M., y Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series No. 9, 1980).

[0109] En un aspecto aún más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

[0110] En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, o *Saccharomyces oviformis*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una *Kluyveromyces lactis* celda. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

[0111] En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula de hongos filamentosos. El término "hongos filamentosos" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycota* y *Oomycota* (según la definición de Hawksworth *et al.*, 1995, *supra*). Por lo general, los hongos filamentosos se caracterizan por presentar una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo se da por alargamiento de la hifa, y el catabolismo del carbono es obligatoriamente aeróbico. Por el contrario, el crecimiento vegetativo de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* se da por gemación de un talo unicelular, y el catabolismo del carbono puede ser por fermentación.

[0112] En un aspecto aún más preferido, la célula huésped de hongos filamentosos es una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Neocallimastix*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes*, o *Trichoderma*.

[0113] En un aspecto más preferido, la célula huésped de hongos filamentosos es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de hongos filamentosos es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*. En otro aspecto más preferido, la célula huésped de hongos filamentosos es una célula de *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvoscens*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

[0114] Las células fúngicas se pueden transformar mediante un proceso que implica la formación y la

transformación de protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Los procedimientos adecuados para la transformación de las células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en EP 0238023 y Yelton *et al.*, 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 81: 1470-1474. Los métodos adecuados para la transformación de la especie *Fusarium* se describen en
 5 Malardier *et al.*, 1989, Gene 78: 147-156 y en WO 96/00787. La levadura se puede transformar usando los procedimientos descritos en Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, 194: 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito *et al.*, 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978, Proceedings of the National Academy
 10 of Sciences 75: 1920.

Métodos de producción

[0115] La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que incluye: a) cultivar una célula huésped recombinante, según lo descrito en este documento, en condiciones propicias para la producción del polipéptido, y b) recuperar el polipéptido.

[0116] La presente descripción también hace referencia a los métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que incluye: a) cultivar una célula huésped recombinante en condiciones propicias para la producción del polipéptido, donde la célula huésped comprende una secuencia de nucleótidos mutada, que presenta al menos una mutación en la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º 1, en la
 20 que la secuencia de nucleótidos mutada codifica un polipéptido que comprende o consiste en el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º 2, y b) recuperar el polipéptido.

[0117] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la
 25 célula se puede cultivar mediante cultivo en un matraz agitado y por fermentación a pequeña o a gran escala (incluidas la fermentación continua, discontinua, alimentada o en estado sólido), en fermentadores de laboratorio o industriales, en un medio adecuado y en condiciones que permitan que el polipéptido se exprese y/o se aisle. El cultivo se lleva a cabo en un medio nutritivo adecuado, que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, mediante el empleo de procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles a través de proveedores comerciales, o también pueden prepararse de acuerdo con las composiciones publicadas (p. ej., en catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se secreta en el medio nutritivo, éste puede recuperarse directamente del medio. Si el polipéptido no se secreta en el medio, puede recuperarse a partir de lisados celulares.

[0118] Los polipéptidos pueden detectarse empleando métodos conocidos en la técnica y específicos para los polipéptidos. Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un preparado enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede usar un ensayo enzimático con el fin de determinar la actividad del polipéptido, según lo descrito en este documento.

[0119] El polipéptido resultante puede recuperarse usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido puede recuperarse del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales que incluyen, entre otros, la centrifugación, la filtración, la extracción, el secado por pulverización, la evaporación o la precipitación.

[0120] Con el fin de obtener polipéptidos sustancialmente puros, los polipéptidos de la presente invención pueden purificarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen, entre otros, la cromatografía (p. ej., de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, de exclusión por tamaño y por cromatofocalización), procedimientos de electroforesis (p. ej., isoelectroenfoque preparativo), la solubilidad diferencial (p. ej., precipitación con sulfato de amonio), la SDS-PAGE o la extracción (véase, p. ej., Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

Composiciones

[0121] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención. Preferentemente, las composiciones están enriquecidas en dicho polipéptido. El término
 55 "enriquecido" indica que la actividad glucoamilasa de la composición se ha incrementado, por ejemplo, con un factor de enriquecimiento de al menos 1.1.

[0122] La composición puede incluir un polipéptido de la presente invención como principal componente de las enzimas, p. ej., una composición monocomponente. De manera alternativa, la composición puede comprender múltiples actividades enzimáticas, tales como actividad aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasas, ciclodextrina glucosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasas, invertasa, lacasas, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzimas pectinolíticas,

péptido-glutaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanas. La(s) enzima(s) adicional(es) puede(n) ser producida(s), por ejemplo, por un microorganismo perteneciente al género *Aspergillus*, preferentemente *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*; al género *Fusarium*, preferentemente *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium toruloseum*, *Fusarium trichothecioides*, o *Fusarium venenatum*; al género *Humicola*, preferentemente *Humicola insolens* o *Humicola lanuginosa*; o al género *Trichoderma*, preferentemente *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

[0123] Las composiciones polipeptídicas se pueden preparar según los métodos conocidos en la técnica, y pueden tener forma de composición líquida o seca. Por ejemplo, la composición polipeptídica puede tener forma de granulado o microgranulado. El polipéptido que se incluya en la composición puede estabilizarse siguiendo los métodos conocidos en la técnica.

[0124] A continuación, se dan ejemplos de usos preferidos de las composiciones polipeptídicas de la invención. La dosificación de la composición polipeptídica de la invención y otras condiciones en las que se usa la composición se pueden determinar basándose en métodos conocidos en la técnica.

Combinación de glucoamilasa y alfa-amilasa ácida

[0125] De acuerdo con este aspecto de la invención, una glucoamilasa de la invención se puede combinar con una alfa-amilasa, preferentemente una alfa-amilasa ácida, en una proporción de entre 0,3 y 5,0 AFAU/AGU. Más preferentemente, la proporción entre la actividad alfa-amilasa ácida y la actividad glucoamilasa es de al menos 0,35, de al menos 0,40, de al menos 0,50, de al menos 0,60, de al menos 0,7, de al menos 0,8, de al menos 0,9, de al menos 1,0, de al menos 1,1, de al menos 1,2, de al menos 1,3, de al menos 1,4, de al menos 1,5, de al menos 1,6, de al menos 1,7, de al menos 1,8, de al menos 1,85, o incluso de al menos 1,9 AFAU/AGU. No obstante, la proporción entre la actividad alfa-amilasa ácida y la actividad glucoamilasa debería ser preferentemente menor de 4,5, menor de 4,0, menor de 3,5, menor de 3,0, menor de 2,5, o incluso menor de 2,25 AFAU/AGU. En AUU/AGI, las actividades de alfa-amilasa ácida y glucoamilasa se presentan preferentemente en una proporción de entre 0,4 y 6,5 AUU/AGI. Más preferentemente, la proporción entre la actividad alfa-amilasa ácida y la actividad glucoamilasa es de al menos 0,45, de al menos 0,50, de al menos 0,60, de al menos 0,7, de al menos 0,8, de al menos 0,9, de al menos 1,0, de al menos 1,1, de al menos 1,2, de al menos 1,3, de al menos 1,4, de al menos 1,5, de al menos 1,6, de al menos 1,7, de al menos 1,8, de al menos 1,9, de al menos 2,0, de al menos 2,1, de al menos 2,2, de al menos 2,3, de al menos 2,4, o incluso de al menos 2,5 AUU/AGI. Sin embargo, la proporción entre la actividad alfa-amilasa ácida y la actividad glucoamilasa es preferentemente menor de 6,0, menor de 5,5, menor de 4,5, menor de 4,0, menor de 3,5 o incluso menor de 3,0 AUU/AGI.

[0126] La composición anterior es adecuada para su uso en un proceso de conversión de almidón que se describe más adelante, para producir jarabe y productos de fermentación, tales como etanol.

[0127] A continuación, se dan ejemplos de usos preferidos para las composiciones polipeptídicas de la invención. Basándose en métodos conocidos en la técnica, se puede determinar la dosificación de la composición polipeptídica de la invención y otras condiciones en las que ésta se puede usar.

Usos

[0128] La presente invención también está orientada a procesos o métodos para usar los polipéptidos con actividad glucoamilasa de la invención.

[0129] Según la invención, los usos incluyen la conversión de almidón en, por ejemplo, jarabe y productos de fermentación, que incluyen etanol y bebidas. Algunos ejemplos de procesos en los que puede usarse una glucoamilasa de la invención incluyen los descritos en WO 92/20777, WO 03/066816, WO 03/066826, WO 2004/081193 y WO 2004/080923.

Producción de productos de fermentación

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

[0130] En este aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación, especialmente etanol, a partir de material que contiene almidón. Este proceso incluye una etapa de licuefacción, además de etapas de sacarificación y fermentación realizadas de forma secuencial o

simultánea.

[0131] La invención hace referencia a un proceso para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón, y comprende las siguientes etapas:

- a) licuefacción del material que contiene almidón, preferentemente mediante el empleo de una alfa-amilasa
- b) sacarificación del material licuado obtenido en la etapa a), usando una glucoamilasa de la invención
- c) fermentación del material sacarificado, utilizando un organismo de fermentación.

[0132] De manera opcional, el producto de fermentación, especialmente el etanol, se puede recuperar tras la fermentación. p. ej., por destilación. Los materiales de partida adecuados que contienen almidón se enumeran en la sección "Materiales que contienen almidón", descrita más adelante. Las enzimas contempladas se enumeran en la sección "Enzimas", incluida más adelante. La licuefacción se lleva a cabo preferentemente en presencia de una alfa-amilasa. La fermentación se lleva a cabo preferentemente en presencia de levadura, preferentemente una cepa de *Saccharomyces*. Los organismos de fermentación adecuados se enumeran más adelante, en la sección "Organismos de fermentación". En formas de realización preferidas, las etapas b) y c) se llevan a cabo de forma secuencial o simultánea (es decir, al igual que en un proceso de SSF).

[0133] En una forma de realización concreta, previamente a la etapa a), el proceso de la invención comprende, además, las etapas de:

- x) reducción del tamaño de la partícula del material que contiene almidón, preferentemente mediante molienda;
- y) formación de una suspensión constituida por el material que contiene almidón y agua.

[0134] La suspensión acuosa puede contener de un 10 % a un 40 % en peso, preferentemente de un 25 % a un 35 % en peso, de material que contiene almidón. La suspensión se calienta por encima de la temperatura de gelatinización y se puede añadir alfa-amilasa, preferentemente alfa-amilasa fúngica bacteriana y/o ácida, para iniciar la licuefacción (dilución). En una forma de realización, la suspensión puede cocerse por inyección de vapor para ser gelatinizada adicionalmente antes de ser sometida a una alfa-amilasa en la etapa a) de la invención.

[0135] Más específicamente, la licuefacción puede llevarse a cabo como un proceso de suspensión en caliente compuesto por tres etapas. La suspensión se calienta a entre 60 y 95 °C, preferentemente entre 80 °C y 85 °C, y se agrega alfa-amilasa para iniciar la licuefacción (dilución). A continuación, la suspensión se puede cocer por inyección de vapor a una temperatura de entre 95 °C y 140 °C, preferentemente entre 105 °C y 125 °C, durante 1-15 minutos, preferentemente durante 3-10 minutos, especialmente alrededor de 5 minutos. La suspensión se enfría a entre 60 °C y 95 °C y se agrega más alfa-amilasa para finalizar la hidrólisis (licuefacción secundaria). Normalmente, el proceso de licuefacción se lleva a cabo a un pH de entre 4,5 y 6,5, en particular a un pH de entre 5 y 6. Los granos enteros molidos y licuados se conocen como puré.

[0136] La sacarificación en la etapa b) puede llevarse a cabo usando condiciones conocidas en la técnica. Por ejemplo, un proceso de sacarificación completo puede durar de aproximadamente 24 hasta aproximadamente 72 horas; sin embargo, es común hacer una sacarificación previa, normalmente durante 40-90 minutos a una temperatura de entre 30 °C y 65 °C, normalmente alrededor de 60 °C, para posteriormente llevar a cabo la sacarificación completa durante la fermentación, lo que da lugar a un proceso simultáneo de sacarificación y fermentación (proceso de SSF). La sacarificación normalmente se lleva a cabo a una temperatura de entre 30 °C y 65 °C, típicamente alrededor de 60 °C, y a un pH de entre 4 y 5, generalmente a un pH aproximado de 4,5.

[0137] El proceso más utilizado en la fabricación de productos de fermentación, especialmente etanol, es el proceso simultáneo de sacarificación y fermentación (SSF), en el que no hay una etapa de espera para la sacarificación, lo que significa que el organismo fermentador, como la levadura, y la(s) enzima(s) pueden añadirse a la vez. Por lo general, el proceso de SSF puede llevarse a cabo a una temperatura de entre 25 °C y 40 °C, como entre 29 °C y 35 °C, entre 30 °C y 34 °C o como alrededor de 32 °C. De acuerdo con la invención, la temperatura puede ajustarse, aumentando o disminuyendo, durante la fermentación.

[0138] Conforme a la presente invención, la etapa c), de fermentación, incluye, entre otros, procesos de fermentación empleados para la producción de alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol o butanol), ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico o ácido glucónico), cetonas (por ejemplo, acetona), aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico), gases (por ejemplo, H₂ y CO₂), antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina), enzimas, vitaminas (p. ej., riboflavina, B12, betacaroteno) y hormonas. Los procesos de fermentación preferidos incluyen procesos de fermentación alcohólica, como es bien conocido en la técnica. Los procesos de fermentación preferidos son procesos de fermentación anaeróbica, como es bien conocido en la técnica.

Procesos para la fabricación de productos de fermentación a partir de almidón no gelatinizado

[0139] En este aspecto, la invención se refiere a procedimientos para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón, pero sin gelatinización del material que contiene almidón (es decir, material que contiene almidón crudo). En una forma de realización, únicamente se utiliza una glucoamilasa de la invención durante la sacarificación y la fermentación. De acuerdo con la invención, el producto de fermentación deseado, como el etanol, puede producirse sin necesidad de licuar la suspensión acuosa donde se encuentra el material que contiene almidón. En una forma de realización, un proceso de la invención incluye material sacarificante (molido) que contiene almidón, p. ej., almidón granular, por debajo de la temperatura de gelatinización y en presencia de una glucoamilasa de la invención con el fin de producir azúcares que pueden fermentarse en el producto de fermentación deseado mediante el empleo de un organismo de fermentación adecuado.

[0140] Por consiguiente, en este aspecto, la invención se refiere a un proceso de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón, el cual se compone de las siguientes etapas:

a) sacarificación del material que contiene almidón con una glucoamilasa madura de acuerdo con la invención, la cual presenta preferentemente la secuencia mostrada como los aminoácidos 20 a 573 en la SEQ ID N°: 2, a una temperatura inferior a la temperatura de gelatinización inicial de dicho material que contiene almidón,

b) fermentación mediante el uso de un organismo de fermentación.

[0141] Los pasos a) y b) del proceso de la invención se pueden llevar a cabo de forma secuencial o simultánea. En una forma de realización, se prepara una suspensión compuesta por agua y material que contiene almidón antes del comienzo de la etapa a).

[0142] El proceso de fermentación se puede llevar a cabo durante un período de 1 a 250 horas, preferentemente de 25 a 190 horas, más preferentemente de 30 a 180 horas, más preferentemente de 40 a 170 horas, incluso más preferentemente de 50 a 160 horas, aún más preferentemente de 60 a 150 horas, incluso aún más preferentemente de 70 a 140 horas, y más preferentemente de 80 a 130 horas.

[0143] El término "temperatura de gelatinización inicial" indica la temperatura más baja a la cual comienza la gelatinización del almidón. El almidón calentado en agua comienza a gelatinizarse a 50-75 °C, aunque la temperatura exacta de gelatinización depende del tipo de almidón específico, la cual puede ser determinada fácilmente por un experto en la materia. Así, la temperatura de gelatinización inicial puede variar dependiendo de la especie de la planta, de la variedad particular de la especie de la planta, así como de las condiciones de crecimiento. En el contexto de la presente invención, la temperatura de gelatinización inicial de un material determinado que contiene almidón es la temperatura a la que se pierde la birrefringencia en el 5 % de los gránulos de almidón, según el método descrito por Gorinstein y Lii, 1992, *Starch/Stärke* 44(12): 461-466.

[0144] Antes de llevar a cabo la etapa a), se puede preparar una suspensión de material que contiene almidón, como almidón granular, que tenga de 10 a 55 % en peso de sólidos secos, preferentemente de 25 a 40 % en peso de sólidos secos, más preferentemente de 30 a 35 % en peso de sólidos secos de material que contiene almidón. La suspensión puede incluir agua y/o aguas de proceso, tales como vinaza (*backset*, fermentada tras el proceso de destilación), agua de depuración, agua condensada o destilada del evaporador, agua de separación lateral de destilación u otro tipo de agua de proceso de la planta de productos de fermentación. Debido a que el proceso de la invención se lleva a cabo por debajo de la temperatura de gelatinización y, por lo tanto, no tiene lugar un aumento significativo de la viscosidad, se pueden utilizar niveles altos de vinaza si se desea. En una forma de realización, la suspensión acuosa contiene de aproximadamente 1 % a aproximadamente 70 % de volumen de vinaza, preferentemente de 15 % a 60 % de volumen de vinaza, especialmente de aproximadamente 30 % a 50 % de volumen de vinaza.

[0145] El material que contiene almidón puede prepararse mediante la reducción del tamaño de las partículas, preferentemente mediante molienda en seco o en húmedo, de 0,05 mm a 3,0 mm, preferentemente de 0,1 mm a 0,5 mm. Después de someterse a un proceso de la invención, al menos el 85 %, al menos el 86 %, al menos el 87 %, al menos el 88 %, al menos el 89 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o preferentemente al menos el 99 % de los sólidos secos del material que contiene almidón se convierten en un hidrolizado de almidón soluble.

[0146] El proceso de la invención se realiza a una temperatura inferior a la temperatura de gelatinización inicial. Preferentemente, la temperatura a la que se lleva a cabo la etapa a) es de entre 30 °C y 75 °C, preferentemente entre 45 °C y 60 °C.

[0147] En una forma de realización preferida, la etapa a) y la etapa b) se llevan a cabo como un proceso de sacarificación y fermentación secuencial o simultáneo. En dicha forma de realización preferida, el proceso se realiza generalmente a una temperatura de entre 25 °C y 40 °C, tal como entre 29 °C y 35 °C, entre 30 °C y

34 °C, o como alrededor de 32 °C. Según la invención, la temperatura puede ajustarse, aumentando o disminuyendo, durante la fermentación.

[0148] En una forma de realización, la sacarificación y la fermentación simultáneas se llevan a cabo de tal manera que el nivel de azúcar, por ejemplo, el nivel de glucosa, se mantenga a un nivel bajo, como por debajo del 6 % en peso, preferentemente por debajo de aproximadamente el 3 % en peso, preferentemente por debajo de aproximadamente el 2 % en peso, más preferentemente por debajo de aproximadamente el 1 % en peso, incluso más preferentemente por debajo de aproximadamente el 0,5 % en peso, incluso más preferentemente por debajo de aproximadamente el 0,25 % en peso, como por debajo de aproximadamente 0,1 % en peso. Estos niveles de azúcar tan bajos se pueden lograr simplemente empleando cantidades ajustadas de enzima y organismo de fermentación. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente qué cantidades de enzima y de organismo fermentador se han de usar. Las cantidades empleadas de enzima y organismo de fermentación también se pueden seleccionar con el fin de mantener bajas concentraciones de maltosa en el caldo de fermentación. Por ejemplo, puede mantenerse el nivel de maltosa por debajo de aproximadamente el 0,5 % en peso o por debajo de aproximadamente el 0,2 % en peso.

[0149] El procedimiento de la invención se puede llevar a cabo en un rango de pH entre 3 y 7, preferentemente entre 3,5 y 6, o más preferentemente entre pH 4 y 5.

Materiales que contienen almidón

[0150] De acuerdo con la presente invención, se puede usar cualquier material de partida adecuado que contenga almidón, incluido almidón granular. El material de partida generalmente se selecciona dependiendo del producto de fermentación deseado. Ejemplos de materiales de partida que contienen almidón, adecuados para su uso en un proceso de la presente invención, incluyen tubérculos, raíces, tallos, granos enteros, granos, mazorcas, trigo, cebada, centeno, milo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, guisantes, arroz, judías, batatas, o mezclas de los mismos; o bien cereales, materias primas que contengan azúcar, como melaza, materiales de fruta, caña de azúcar o remolacha azucarera; patatas y materiales que contengan celulosa, como madera o residuos vegetales, o mezclas de los mismos. Se contemplan los tipos cerosos y no cerosos de maíz y cebada.

[0151] El término "almidón granular" hace referencia al almidón crudo y sin procesar, es decir, almidón en su forma natural, que se encuentra en cereales, tubérculos o granos. El almidón se forma dentro de las células vegetales en forma de pequeños gránulos insolubles en agua. Cuando se colocan en agua fría, los gránulos de almidón pueden absorber una pequeña cantidad del líquido e hincharse. A una temperatura de 50 °C hasta 75 °C, el proceso de hinchamiento puede ser reversible. Sin embargo, a temperaturas más altas comienza la "gelatinización", un proceso de hinchamiento irreversible. El almidón granular que se procesará puede presentar calidad de almidón altamente refinado, preferentemente al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 97 % o al menos 99,5 % puro, o puede ser un material que contenga almidón más crudo y que comprenda grano entero molido, incluyendo fragmentos que no sean de almidón, tales como residuos de germen y fibras. La materia prima, como el grano integral, se muele para abrir la estructura y permitir un procesamiento posterior. Según la invención, se prefieren dos procesos de molienda: molienda en húmedo y en seco. En la molienda en seco, los granos enteros se muelen y se utilizan. La molienda en húmedo proporciona una buena separación de germen y harina (gránulos de almidón y proteína), y a menudo se aplica en lugares donde el hidrolizado de almidón se emplea en la producción de jarabes. Tanto la molienda en seco como la molienda en húmedo son procesos conocidos en la técnica del procesamiento de almidón, y se consideran de igual manera para el proceso de la invención.

[0152] El material que contiene almidón se reduce hasta el tamaño de partícula, preferentemente mediante molienda en seco o en húmedo, con el fin de exponer una mayor área superficial. En una forma de realización, el tamaño de partícula es de entre 0,05 y 3,0 mm, preferentemente entre 0,1 y 0,5 mm, o de forma que al menos el 30 %, preferentemente al menos el 50 %, más preferentemente al menos el 70 %, incluso más preferentemente al menos el 90 % del material que contiene almidón puede pasar a través de un tamiz con una pantalla de 0,05 a 3,0 mm, preferentemente de 0,1 a 0,5 mm.

Productos de fermentación

[0153] El término "producto de fermentación" equivale a un producto producido mediante un proceso que incluye una etapa de fermentación utilizando un organismo de fermentación. Los productos de fermentación contemplados según la invención incluyen alcoholes (p. ej., etanol, metanol, butanol), ácidos orgánicos (p. ej., ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico), cetonas (p. ej., acetona), aminoácidos (p. ej., ácido glutámico), gases (p. ej., H₂ y CO₂), antibióticos (p. ej., penicilina y tetraciclina), enzimas, vitaminas (p. ej., riboflavina, B₁₂, betacaroteno) y hormonas. En una forma de realización preferida, el producto de fermentación es etanol (p. ej., etanol combustible), etanol para consumo humano (es decir, alcohol neutro potable), o bien etanol industrial o productos utilizados en la industria del alcohol para

consumo (p. ej., cerveza y vino), la industria láctea (p. ej., productos lácteos fermentados), la industria del cuero y la industria del tabaco. Los tipos de cerveza preferidos incluyen *ale*, *stout*, *porter*, *lager*, *bitter*, *happoshu*, licores de malta, cerveza de alta graduación alcohólica, cerveza de baja graduación alcohólica, cerveza baja en calorías o cerveza *light*. Los procesos de fermentación preferidos empleados incluyen procesos de fermentación alcohólica conocidos en la técnica. Los procesos de fermentación preferidos son procesos de fermentación anaeróbica, conocidos en la técnica.

Organismos de fermentación

[0154] El término "organismo de fermentación" se refiere a cualquier organismo, incluidos organismos bacterianos y fúngicos, adecuado para su uso en un proceso de fermentación y capaces de producir un producto de fermentación deseado. Los organismos de fermentación especialmente adecuados son capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares, tales como glucosa o maltosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado. Ejemplos de organismos de fermentación incluyen organismos fúngicos, como las levaduras. Las levaduras preferidas incluyen cepas de *Saccharomyces* spp., en concreto, *Saccharomyces cerevisiae*. Las levaduras disponibles en el mercado incluyen, por ejemplo, Red Star™/Lesaffre Ethanol Red (disponible en Red Star/Lesaffre, EE. UU.), FALI (disponible en Fleischmann's Yeast, una división de Burns Philp Food Inc., EE. UU.), SUPERSTART (disponible en Alltech), GERT STRAND (disponible en Gert Strand AB, Suecia) y FERMIOL (disponible DSM Specialties).

ENZIMAS

Glucoamilasa

[0155] La glucoamilasa es preferentemente una glucoamilasa de la invención. Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, una glucoamilasa de la invención también puede combinarse con otras glucoamilasas. El término "glucoamilasa" (1,4-alfa-D-glucano glucohidrolasa, EC 3.2.1.3) define a una enzima que cataliza la liberación de D-glucosa desde los extremos no reductores del almidón o desde las moléculas oligosacáridas y polisacáridas relacionadas.

[0156] La glucoamilasa puede agregarse en una cantidad de 0,001 a 10 AGU/g DS, preferentemente de 0,01 a 5 AGU/g DS, como por ejemplo alrededor de 0,1, 0,3, 0,5, 1 o 2 AGU/g DS, especialmente de 0,1 a 0,5 AGU/g DS o de 0,02 a 20 AGU/g DS, preferentemente de 0,1 a 10 AGU/g DS.

Alfa-Amilasa

[0157] De acuerdo con la invención, la alfa-amilasa puede ser de cualquier origen, preferentemente alfa-amilasas de origen fúngico o bacteriano.

[0158] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, p. ej., alfa-amilasa ácida fúngica o alfa-amilasa ácida bacteriana. El término "alfa-amilasa ácida" hace referencia a una alfa-amilasa (EC 3.2.1.1) que, añadida en una cantidad efectiva, presenta una actividad óptima a un pH en el rango de 3 a 7, preferentemente de 3,5 a 6, o más preferentemente de 4 a 5.

Alfa-amilasas bacterianas

[0159] De acuerdo con la invención, preferentemente, una alfa-amilasa bacteriana puede derivarse del género *Bacillus*.

[0160] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa de *Bacillus* se deriva de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* o *B. stearothermophilus*, pero también puede derivarse de otra especie de *Bacillus*. Ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (BLA), que se muestra en la SEQ ID N.º 4 de WO 99/19467; la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* (BAN), que se muestra en la SEQ ID N.º 5 de WO 99/19467; y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (BSG), que se muestra en la SEQ ID N.º 3 de WO 99/19467. En una forma de realización de la invención, la alfa-amilasa es una enzima que presenta un grado de identidad de al menos un 60 %, preferentemente de al menos un 70 %, más preferentemente de al menos un 80 %, incluso más preferentemente de al menos un 90 %, como de al menos un 95 %, de al menos un 96 %, al menos un 97 %, de al menos un 98 %, o de al menos un 99 % de identidad con cualquiera de las secuencias mostradas, respectivamente, en la SEQ ID N.º 1, 2, 3, 4 o 5 de WO 99/19467.

[0161] Las alfa-amilasas de *Bacillus* también pueden ser una variante y/o híbrido, especialmente alguna de las descritas en cualquiera de WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059 y WO 02/10355. Las variantes de alfa-amilasa concretas contempladas se describen en las Patentes n.º 6.093.562, 6.187.576 y 6.297.038 de EE. UU., e incluyen variantes de alfa-amilasa (alfa-amilasa BSG) de

Bacillus stearothermophilus que presentan una delección de uno o dos aminoácidos entre las posiciones 179 a 182, preferentemente una delección doble expuesta en WO 96/23873 (véase, por ejemplo, pág. 20, líneas 1 a 10, que se incorpora aquí por referencia), que preferentemente corresponde a delta (181 - 182), en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en la SEQ ID N.º 3 incluida en WO 99/19467, o bien una delección de los aminoácidos 179 y 180, usando para la numeración la SEQ ID N.º 3 de WO 99/19467 (que se incorpora aquí por referencia). Aún más preferentemente, se utilizan las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, que presenta una delección doble correspondiente a delta (181-182) y además incluye una sustitución de N193F (también denominada I181* + G182* + N193F), en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en la SEQ ID N.º 3 incluida en WO 99/19467.

[0162] La alfa-amilasa también puede ser una alfa-amilasa maltogénica. Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucan-1,4-alfa-maltohidrolasa, E.C. 3.2.1.133) es capaz de hidrolizar amilosa y amilopectina a maltosa en la configuración alfa. Una alfa-amilasa maltogénica de la cepa NCIB 11837 de *Bacillus stearothermophilus* se encuentra disponible en el mercado en Novozymes A/S (Dinamarca). La alfa-amilasa maltogénica se describe en las Patentes de EE. UU. n.º 4.598.048, 4.604.355 y 6.162.628.

Alfa-amilasas híbridas bacterianas

[0163] Una alfa-amilasa híbrida considerada específicamente comprende 445 residuos de aminoácidos del C-terminal de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (como se muestra en la SEQ ID N.º 3 de WO 99/19467) y los 37 residuos de aminoácidos del N-terminal de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (como se muestra en la SEQ ID N.º 5 de WO 99/19467), con la presencia de una o más de una, especialmente todas, de las siguientes sustituciones: G48A + T49I + G107A + H156Y + A181T + N190F + 1201F + A209V + Q264S (usando la numeración de *Bacillus licheniformis*). También se prefieren las variantes que presentan una o varias de las siguientes mutaciones (o las mutaciones correspondientes en otras cadenas principales de alfa-amilasa de *Bacillus*): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S, y/o la delección de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferentemente la delección de E178 y G179 (usando la numeración de la SEQ ID N.º 5 de WO 99/19467).

[0164] La alfa-amilasa bacteriana puede agregarse en cantidades bien conocidas en la técnica. Expresando las medidas en unidades KNU (descritas más adelante, en la sección "Materiales y métodos"), la actividad alfa-amilasa se encuentra presente, preferentemente, en una cantidad de 0,5 a 5.000 NU/g DS, de 1 a 500 NU/g DS o, más preferentemente, en una cantidad de 5 a 1.000 NU/g DS, como, por ejemplo, de 10 a 100 UN/g DS.

Alfa-amilasas fúngicas

[0165] Las alfa-amilasas ácidas fúngicas incluyen alfa-amilasas ácidas derivadas de una cepa del género *Aspergillus*, como alfa-amilasas de *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.

[0166] Una alfa-amilasa fúngica ácida preferida es una alfa-amilasa de tipo Fungamyl, que preferentemente se deriva de una cepa de *Aspergillus oryzae*. En la presente descripción, el término "alfa-amilasa de tipo Fungamyl" indica una alfa-amilasa que muestra una elevada identidad, es decir, más del 70 %, más del 75 %, más del 80 %, más del 85 %, más del 90 %, más del 95 %, más del 96 %, más del 97 %, más del 98 %, más del 99 %, o incluso el 100 % con la parte madura de la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID N.º 10 de WO 96/23874.

[0167] Otra alfa-amilasa ácida preferida se deriva de una cepa de *Aspergillus niger*. En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa ácida fúngica es la de *A. niger*, descrita como "AMYA_ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TrEMBL con el número de acceso primario P56271 y se define con más detalle en WO 89/01969 (ejemplo 3). La alfa-amilasa ácida de *Aspergillus niger* también se muestra en la SEQ ID N.º 1 de WO 2004/080923 (Novozymes), que se incorpora aquí por referencia. Asimismo, se contemplan variantes de dicha alfa-amilasa ácida fúngica que presentan al menos un 70 % de identidad, como al menos un 80 %, o incluso al menos un 90 % de identidad, como al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad con la SEQ ID N.º 1 de WO 2004/080923. Una alfa-amilasa fúngica ácida adecuada derivada de *Aspergillus niger* y disponible comercialmente es SP288 (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

[0168] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa se deriva de *Aspergillus kawachii*, según la publicación de Kaneko *et al.*, 1996, J. Ferment. Bioeng. 81:292-298, "Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachii*", y más adelante en EMBL:#AB008370.

[0169] La alfa-amilasa ácida fúngica también puede ser una enzima de tipo salvaje que comprende un

módulo de unión a carbohidrato (CBM) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir, un no híbrido), o una variante del mismo. En una forma de realización, la alfa-amilasa ácida de tipo salvaje se deriva de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

5 Alfa-amilasas híbridas fúngicas

[0170] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida. Ejemplos preferidos de alfa-amilasas híbridas fúngicas incluyen las descritas en WO 2005/003311 o en la publicación de la solicitud de EE. UU. n.º 2005/0054071 (Novozymes) o en la solicitud de EE. UU. n.º 60/638.614 (Novozymes). Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico (CD) de alfa-amilasa y un dominio/módulo de unión a carbohidrato (CBM), además de un enlazador de carácter opcional.

[0171] Ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen las descritas en la solicitud de EE. UU. n.º 60/638.614, incluyendo la variante Fungamyl con el dominio catalítico JA118 y SBD de *Athelia rolfsii* (SEQ ID N.º 100 en la solicitud de EE. UU. n.º 60/638.614), la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador AMG y SBD de *Athelia rolfsii* (SEQ ID N.º 101 en la solicitud de EE. UU. n.º 60/638.614) y la alfa-amilasa de *Meripilus giganteus* con enlazador de glucoamilasa y SBD de *Athelia rolfsii* (SEQ ID N.º 102 en la solicitud de EE. UU. n.º 60/638.614).

[0172] Otros ejemplos concretos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen las descritas en la solicitud de EE. UU. n.º 2005/0054071, incluidas las expuestas en la Tabla 3 de la página 15, como la alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con enlazador y dominio de unión al almidón de *Aspergillus kawachii*.

Productos comerciales de alfa-amilasa

[0173] Las composiciones comerciales preferidas que contienen alfa-amilasa incluyen MYCOLASE DSM (Gist Brocades), BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X y SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE™ L-40.000, DEX-LO™, SPEZYME™ FRED, SPEZYME™ AA, SPEZYME™ Ethyl, GC358, GC980, SPEZYME™ RSL y SPEZYME™ DELTA AA (Genencor Int.), además de la alfa-amilasa ácida fúngica vendida con el nombre comercial SP288 (disponible en Novozymes A/S, Dinamarca).

[0174] De acuerdo con la invención, puede añadirse una alfa-amilasa ácida en una cantidad de 0,1 a 10 AFAU/g DS, preferentemente de 0,10 a 5 AFAU/g DS, especialmente de 0,3 a 2 AFAU/g DS.

Producción de jarabe

[0175] La presente invención también presenta un proceso de utilización de una glucoamilasa de la invención para la producción de jarabe, por ejemplo, de glucosa y similares, a partir de material que contiene almidón. Los materiales de partida adecuados se ejemplifican en la sección "Materiales que contienen almidón" anteriormente descrita. Por lo general, el proceso comprende las etapas consistentes en hidrolizar parcialmente el material que contiene almidón (licuefacción) en presencia de alfa-amilasa, y posteriormente sacarificar la liberación de glucosa desde los extremos no reductores del almidón o desde las moléculas oligosacáridas y polisacáridas relacionadas en presencia de la glucoamilasa de la invención.

[0176] La licuefacción y la sacarificación pueden llevarse a cabo según lo descrito anteriormente para la producción de productos de fermentación.

[0177] La glucoamilasa de la invención también puede usarse en forma inmovilizada, lo cual es adecuado, y se utiliza con frecuencia, para producir jarabes especiales, como jarabes de maltosa, y también para la corriente de refinado de oligosacáridos en relación con la producción de jarabes de fructosa, por ejemplo, jarabe con alto contenido de fructosa (HFS).

[0178] Por consiguiente, este aspecto de la invención se refiere a un proceso de producción de jarabe a partir de material que contiene almidón, que comprende:

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

[0179] Se puede recuperar un jarabe a partir del material sacarificado obtenido en la etapa b).

[0180] Los detalles sobre las condiciones adecuadas se han indicado anteriormente.

Elaboración de cerveza

[0181] También puede usarse una glucoamilasa de la invención en un proceso de elaboración de cerveza. La

glucoamilasa de la invención se añade en cantidades efectivas, que pueden ser determinadas fácilmente por los expertos en la técnica.

[0182] La presente invención se describe, además, mediante los siguientes ejemplos.

5

Materiales y métodos

[0183] Levadura: RED STAR™ disponible en Red Star/Lesaffre, EE. UU.

Medios y reactivos:

10 [0184] Los productos químicos utilizados como sistemas tampón y sustratos eran productos comerciales de, al menos, grado reactivo.

[0185] PDA: 39 g/l de agar de dextrosa de patata, 20 g/l de agar, 50 ml/l de glicerol

15 Métodos

[0186] A menos que se indique lo contrario, las manipulaciones y transformaciones de ADN se realizaron utilizando métodos estándar de biología molecular, como se describe en Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab., Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. *et al.* (eds.) "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley e Hijos, 1995; Harwood, C. R., y Cutting, S. M. (eds.)

20 "Molecular Biological Methods for *Bacillus*". John Wiley e Hijos, 1990.

Actividad glucoamilasa

[0187] La actividad glucoamilasa puede medirse en unidades AGI o en unidades de glucoamilasa (AGU).

25 Actividad glucoamilasa (AGI)

[0188] La glucoamilasa (equivalente a amiloglucosidasa) convierte el almidón en glucosa. La cantidad de glucosa se determina en la presente solicitud mediante el método de la glucosa oxidasa para la determinación de la actividad. Este método se describe en la sección 76-11 "Starch-Glucoamylase Method with Subsequent Measurement of Glucose with Glucose Oxidase", en "Approved methods of the American Association of Cereal Chemists". Vol.1-2 AACC, de la American Association of Cereal Chemists, (2000), ISBN: 1-891127-12-8.

30

[0189] Una unidad de glucoamilasa (AGI) es la cantidad de enzima que formará 1 micromol de glucosa por minuto en condiciones normales del método.

35

Condiciones normales/condiciones de reacción:

[0190]

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

40 [0191] El almidón debe ser almidón de Lintner, que es un almidón de punto de ebullición fino utilizado en el laboratorio como indicador colorimétrico. El almidón de Lintner se obtiene por tratamiento con ácido clorhídrico diluido del almidón nativo, con el fin de que conserve la capacidad de teñirse de azul con yodo.

Actividad glucoamilasa (AGU)

45 [0192] La unidad Novo de glucoamilasa (AGU) se define como la cantidad de enzimas que hidrolizan 1 micromol de maltosa por minuto en condiciones normales (37 °C, pH 4,3, sustrato: maltosa 23,2 mM, sistema tampón: acetato 0,1 M y tiempo de reacción: 5 minutos).

[0193] Se puede usar un sistema autoanalizador. Se añade mutarotasa al reactivo de glucosa deshidrogenasa para que cualquier alfa-D-glucosa presente se convierta en beta-D-glucosa. La glucosa deshidrogenasa reacciona específicamente con beta-D-glucosa en la reacción descrita anteriormente y forma

50

NADH, que se determina empleando un fotómetro a 340 nm como medida de la concentración de glucosa original.

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

- 5 [0194] Hay disponible a petición de Novozymes A/S, Dinamarca, una carpeta (EB-SM-0131.02/01) que describe este método analítico con más detalle, la cual se incluye aquí por referencia.

Actividad alfa-amilasa (KNU)

- 10 [0195] La actividad alfa-amilasa puede determinarse usando como sustrato almidón de patata. Este método se basa en la descomposición del almidón de patata modificado mediante la enzima, y la reacción continúa mezclando muestras de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo. Al principio se forma un color azul negruzco, pero durante la descomposición del almidón, el color azul se vuelve más suave y se convierte progresivamente en marrón rojizo, que se compara con un vidrio coloreado estándar.
- 15 [0196] Una unidad Kilo Novo de alfa-amilasa (KNU) se define como la cantidad de enzimas que, en condiciones normales (es decir, a 37 °C +/- 0,05; 0,0003 M Ca²⁺ y pH 5,6) dextrinizan 5260 mg de sustancia seca de almidón Merck Amylum soluble.
- 20 [0197] Hay disponible previa solicitud a Novozymes A/S, Dinamarca, una carpeta EB-SM-0009.02/01 que describe este método analítico con más detalle, la cual se incluye aquí por referencia.

Actividad alfa-amilasa ácida

- 25 [0198] Según el uso del término de acuerdo con la presente invención, cualquier actividad alfa-amilasa ácida puede medirse en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida). De forma alternativa, la actividad alfa-amilasa ácida se puede medir en AAU (unidades de alfa-amilasa ácida).

Unidades de alfa-amilasa ácida (AAU)

- 30 [0199] La actividad alfa-amilasa ácida se puede medir en AAU (unidades de alfa-amilasa ácida), que es un método absoluto. Una unidad de alfa-amilasa ácida (AAU) se define como la cantidad de enzimas que convierten 1 g de almidón (100 % de materia seca) por hora, en condiciones estandarizadas, en un producto que tiene una transmisión a 620 nm tras la reacción con una solución de yodo de potencia conocida igual a la de una referencia de color.

Condiciones normales/condiciones de reacción:

- 35 [0200]

Sustrato:	Almidón soluble. Concentración aprox. 20 g DS/l
Sistema tampón:	Citrato, aprox. 0,13 M, pH = 4,2
Solución de yodo:	40,176 g de yoduro de potasio + 0,088 g de yodo/l
Agua corriente:	15° - 20° dH (grado alemán de dureza)
pH:	4,2
Temperatura de incubación:	30 °C
Tiempo de reacción:	11 minutos
Longitud de onda:	620 nm

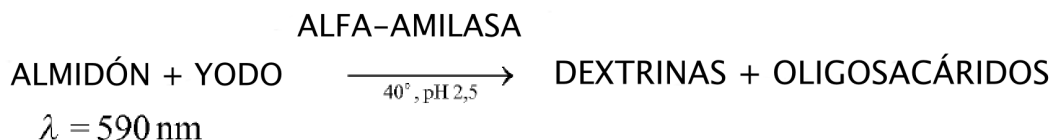
Concentración de enzimas:	0,13-0,19 AAU/ml
Rango de trabajo de la enzima:	0,13-0,19 AAU/ml

- [0201] El almidón debe ser almidón de Lintner, que es un almidón de punto de ebullición fino utilizado en el laboratorio como indicador colorimétrico. El almidón de Lintner se obtiene sometiendo al almidón nativo a un tratamiento con ácido clorhídrico diluido para que conserve la capacidad de teñirse de azul con yodo. Para más información, consúltese EP 0140410 B2, cuya descripción se incluye aquí por referencia.

Actividad alfa-amilasa ácida (AFAU)

- [0202] La actividad alfa-amilasa ácida puede medirse en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida), que se determinan con relación a un estándar enzimático. 1 AFAU se define como la cantidad de enzimas que degradan 5,260 mg de materia seca de almidón por hora en las condiciones normales descritas más adelante.

- [0203] La alfa-amilasa ácida, una endo-alfa-amilasa (1,4-alfa-D-glucano-glucanohidrolasa, EC 3.2.1.1) hidroliza enlaces alfa-1,4-glucosídicos en las regiones internas de la molécula de almidón para formar dextrinas y oligosacáridos con diferentes longitudes de cadena. La intensidad del color formado con yodo es directamente proporcional a la concentración de almidón. La actividad amilasa se determina usando colorimetría inversa como reducción de la concentración de almidón en las condiciones analíticas especificadas.



20

azul/violeta	t = 23 segundos	decoloración
--------------	-----------------	--------------

Condiciones normales/condiciones de reacción:

[0204]

Sustrato:	Almidón soluble, aprox. 0,17 g/l
Sistema tampón:	Citrato, aprox. 0,03 M
Yodo (I ₂):	0,03 g/l
CaCl ₂ :	1,85 mM
pH:	2,50 ± 0,05
Temperatura de incubación:	40 °C
Tiempo de reacción:	23 segundos
Longitud de onda:	590 nm
Concentración de enzimas:	0,025 AFAU/ml
Rango de trabajo de la enzima:	0,01-0,04 AFAU/ml

- [0205] Hay disponible previa solicitud a Novozymes A/S, Dinamarca, una carpeta EB-SM-0259.02/01 que describe este método analítico con más detalle, la cual se incluye aquí por referencia.

Sacarificación y Fermentación Simultánea (SSF) con AMG de *Byssocorticium* sp.

- [0206] El rendimiento de SSF de una glucoamilasa de *Byssocorticium* sp. puede evaluarse a diferentes dosis de enzimas. La fermentación se puede realizar en las siguientes condiciones:
Sustrato: el maíz molido se suspende junto con la vinaza y su sustancia seca se ajusta aproximadamente al 32 % (p/p). Después, se licua a 85 °C y a un pH de 5,8. El puré licuado tiene una DE de 13,4.

Temperatura:	32 °C
pH inicial:	5,0

- [0207] Dosis de enzimas: AMG de *Byssocorticium* sp. producido en *Aspergillus niger* en una relación de 30, 40, 55 y 70 microgramos de proteína enzimática/g de DS. Las enzimas se comparan con una muestra purificada del AMG comercial de *Talaromyces emersonii* en las mismas dosis. La dosis más alta de AMG de *Talaromyces emersonii* equivale a una cantidad industrial correspondiente de 0,56 AGU/g de DS. Se ha preparado un control para la sacarificación máxima alcanzable utilizando los excesos de AMG comercial y

alfa-amilasa.

Fermentación

[0208] Al sustrato para la SSF, se le agregan 1000 ppm de urea como fuente de nitrógeno y 3 ppm de penicilina para el control bacteriano; el pH se ajusta a 5,0 con H₂SO₄. Se transfieren alícuotas de 5 g del puré a tubos de centrifuga de 15 ml con un orificio perforado en la parte superior para la liberación de CO₂. Se añaden enzimas y levaduras, y los tubos se colocan en un baño de agua sin agitar a 32 °C durante 54 horas. Las muestras se analizan mediante HPLC para determinar la cantidad de etanol producido durante la fermentación.

Ejemplo 1:

[0209] Actividad específica de AMGs de *Byssocorticium* sp. en comparación con AMG de *Trametes cingulata*. La actividad específica se ha calculado dividiendo la actividad AGU de glucoamilasa (según el procedimiento anterior) y la proteína enzimática de cada preparación (análisis de AA). La tabla que se expone a continuación muestra los resultados de los AMG de *Byssocorticium* sp. comparados con el mejor AMG de la técnica anterior, el AMG de *Trametes cingulata*.

Tabla 1. Actividad específica	
	[AGU/mg]
AMG de <i>Trametes cingulata</i> , SEQ ID N.º 4	5,6
AMG de <i>Byssocorticium</i> sp., SEQ ID N.º 2	9,5

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Landvik, Sara
Ayabe, Keiichi
Coward-Kelly, Guillermo
- <120> Polipéptidos con actividad glucoamilasa y polinucleótidos que los codifican
- <130> 11739-WO-PCT
- <150> US 61/411,045
<151> 2010-11-08
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 2063
<212> DNA
<213> *Byssocorticium* sp.
- <400> 1

ES 2 649 555 T3

atgtacttcg ctccgcttct ctccggactc tctctcatca cctctgcggt tctcgcccag	60
accgttgact cctatgtcag cactgagggc cccatcgga aggcgggcct ccttgccaac	120
attggtccca gtggttcaa atccaacggt gcccatgtat gttatgcgc gtagtttcac	180
cgacattgtt tgctcattat tctttcttgc acaggctgga gttgtcgtcg ctagccctag	240
ccaagtcaac ccggactaca tgtacacatg ggtccgcgac tcttcctctg tgttcaaggt	300
cctcgtcgac cagctcgctt ccggccagga cacctctgtc cgtagcctga tcgatgcatt	360
cgtcgcagcg gagtcggcga tgcagcacac cccaacccc agtggtgaca tcaacactgg	420
tggctcttgc gagcccaagt tcaacatcga caccaccgcc ttactggcg catggggccg	480
ccgcgagcga ggtaaggact tcacatcttt tttcctcctt aaaaataata atgatatac	540
tcgtatagat ggccctgctc tccgttctac caccgtcatc aactacgcca actacctct	600
tgctaattggc aacaccactg cttgggtggg ggccaacctc tggcccatga tcaagctcga	660
cttggtactac atccagaaca actggaacca gtctacgtaa gtctcgcatc agcgtatctt	720
ttcgttctag ttcttatgcc gtctcggaac agcttcgacc tgtgggagga gctcaactcc	780
tcgtccttct tcaccaccgc tgttcagcac cgtgctctcc gcgagggtat tactctcggc	840
gcgaagctct cgaagactgc cgataccgcc aactatggca ccaggccgg caacatcctt	900
tgcttcctcc aggtgtgtat gcctcgacgt acttttgatc attcaccaga gcttacacga	960
tttctttag tagtcatactgga accctaccgc caactacgtg acctccaaca ccggtgggtgg	1020
acgctccggc aaggactcca actccgtcct tacttccatc cacactttcg accccgatgc	1080
cggatgtgat gctaccacct tccagccctg ctccgacaag gccctgtcca acctcaaggt	1140
ttacgtcgac tcgttccgct ccatctgggc catcaacgct ggcgctgctg ccaccgctcc	1200

ES 2 649 555 T3

cgtcgctgtc ggccgctacc ccgaggacac ttactacaac ggtaaccctt ggtacctctc 1260
 tactttcgcc gtcgcccagc agctctacga tgccatcatc gtctggaaca agcagggatc 1320
 catccagggtc accagccttt cccttccctt cttccagcag ttcatctcga ccctcaagac 1380
 cggcacgtac acccagagct ccacccagtt ccagaccctc gtccctgcca tcaaggcctg 1440
 ggctgacggc ttcgtcgcca tcaaccagaa gtacactcct cctaacggtg gtctcggtga 1500
 acagtacgac aaggtctctg gcgaccctgt cagcgctggt gaccttacct ggtcgtatgc 1560
 ttccgctctc accgtcttca acgctcgtgc cggaaactac tccccgggt ggggtgccaa 1620
 gggcctgacc gtcccggcag tctgccagcc caacgctggc cctcaagtcc aggtgacgtt 1680
 caaggttcag gccacgacgg tctacggcgg taagccagct ccctgatttc aaacatgcct 1740
 gggaagctaa cgtcctctgc agagaacatt tacctcactg gtgctaacc agctctgtcg 1800
 aactggtcgc ccgacaccgc cctcgccatg tctgctgcta actaccctac ctggtctggt 1860
 aagtttcagc tggctaatat ctctttttct ttcaaaaaaa cttattcttc accacagtca 1920
 cagtcaccct cccggcgaac agcgtcatcc agtacaagta catcaggaag aacaacggcg 1980
 ccgtcacctg ggagtctgac cccaacaacc aggtcaccat ccagcgagc ggcacctaca 2040
 ccgtcaacga taactggcgg taa 2063

<210> 2

<211> 573

5 <212> PRT

<213> Byssocortidium sp.

<400> 2

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

Val Leu Ala Gln Thr Val Asp Ser Tyr Val Ser Thr Glu Gly Pro Ile
 20 25 30

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

Asn Gly Ala His Ala Gly Val Val Val Ala Ser Pro Ser Gln Val Asn
 50 55 60

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

Val Leu Val Asp Gln Leu Ala Ser Gly Gln Asp Thr Ser Val Arg Ser
 85 90 95

10

ES 2 649 555 T3

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

Asn Pro Ser Gly Asp Ile Asn Thr Gly Gly Leu Ala Glu Pro Lys Phe
115 120 125

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

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

Leu Leu Ala Asn Gly Asn Thr Thr Ala Trp Val Val Ala Asn Leu Trp
165 170 175

Pro Met Ile Lys Leu Asp Leu Asp Tyr Ile Gln Asn Asn Trp Asn Gln
180 185 190

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

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

Lys Leu Ser Lys Thr Ala Asp Thr Ala Asn Tyr Gly Thr Gln Ala Gly
225 230 235 240

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

Val Thr Ser Asn Thr Gly Gly Gly Arg Ser Gly Lys Asp Ser Asn Ser
260 265 270

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

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

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

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

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

ES 2 649 555 T3

Tyr	Asp	Ala	Ile	Ile	Val	Trp	Asn	Lys	Gln	Gly	Ser	Ile	Gln	Val	Thr
		355					360					365			
Ser	Leu	Ser	Leu	Pro	Phe	Phe	Gln	Gln	Phe	Ile	Ser	Thr	Leu	Lys	Thr
	370					375					380				
Gly	Thr	Tyr	Thr	Gln	Ser	Ser	Thr	Gln	Phe	Gln	Thr	Leu	Val	Pro	Ala
385					390					395					400
Ile	Lys	Ala	Trp	Ala	Asp	Gly	Phe	Val	Ala	Ile	Asn	Gln	Lys	Tyr	Thr
				405					410					415	
Pro	Pro	Asn	Gly	Gly	Leu	Gly	Glu	Gln	Tyr	Asp	Lys	Val	Ser	Gly	Asp
			420					425					430		
Pro	Val	Ser	Ala	Val	Asp	Leu	Thr	Trp	Ser	Tyr	Ala	Ser	Ala	Leu	Thr
		435					440					445			
Val	Phe	Asn	Ala	Arg	Ala	Gly	Asn	Tyr	Ser	Pro	Gly	Trp	Gly	Ala	Lys
	450					455					460				
Gly	Leu	Thr	Val	Pro	Ala	Val	Cys	Gln	Pro	Asn	Ala	Gly	Pro	Gln	Val
465					470					475					480
Gln	Val	Thr	Phe	Lys	Val	Gln	Ala	Thr	Thr	Val	Tyr	Gly	Glu	Asn	Ile
				485					490					495	
Tyr	Leu	Thr	Gly	Ala	Asn	Pro	Ala	Leu	Ser	Asn	Trp	Ser	Pro	Asp	Thr
			500					505					510		
Ala	Leu	Ala	Met	Ser	Ala	Ala	Asn	Tyr	Pro	Thr	Trp	Ser	Val	Thr	Val
		515					520					525			
Thr	Leu	Pro	Ala	Asn	Ser	Val	Ile	Gln	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Arg	Lys	Asn
	530					535					540				
Asn	Gly	Ala	Val	Thr	Trp	Glu	Ser	Asp	Pro	Asn	Asn	Gln	Val	Thr	Ile
545					550					555					560
Pro	Ala	Ser	Gly	Thr	Tyr	Thr	Val	Asn	Asp	Asn	Trp	Arg			
				565					570						

<210> 3
<211> 1725
<212> DNA
5 <213> *Trametes cingulata*

<400> 3

ES 2 649 555 T3

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

<210> 4

<211> 574

5 <212> PRT

<213> Trametes cingulata

ES 2 649 555 T3

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 649 555 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 649 555 T3

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido aislado que posee actividad glucoamilasa, seleccionado del grupo que consiste en:
 - 5 a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, como al menos un 95 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o incluso un 100 % de identidad con los aminoácidos 20 a 573 de la SEQ ID N.º 2;
 - 10 b) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que presenta al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, como al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o incluso un 100 % de identidad con el dominio catalítico mostrado
 - 15 como los aminoácidos 21 a 472 de la SEQ ID N.º 2.
2. Polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la reivindicación 1.
- 20 3. Constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido de la reivindicación 2 enlazado operativamente a una o más (varias) secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.
4. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos de la reivindicación 3.
- 25 5. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos de la reivindicación 3.
6. Método para producir el polipéptido de la reivindicación 1, que comprende: a) el cultivo de una célula huésped, que incluye un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en condiciones propicias para la producción del mismo; y b) la recuperación del polipéptido.
- 30 7. Uso de un polipéptido de la reivindicación 1 para la producción de jarabe y/o un producto de fermentación.
8. Uso, según la reivindicación 7, en el que el material precursor es material que contiene almidón gelatinizado o no gelatinizado.
- 35 9. Composición que comprende un polipéptido de la reivindicación 1.
10. Composición, según la reivindicación 9, que además comprende una alfa-amilasa.
- 40 11. Proceso de producción de un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón, que consta de las siguientes etapas:
 - 45 a) licuefacción del material que contiene almidón,
 - b) sacarificación del material licuado, y
 - c) fermentación con un organismo de fermentación,
 en el que la etapa b) se lleva a cabo mediante el uso de al menos una glucoamilasa, de acuerdo con la reivindicación 1.
- 50 12. Proceso para producir un producto de fermentación a partir de material que contiene almidón, que consta de las siguientes etapas:
 - a) sacarificación de material que contiene almidón a una temperatura inferior a la temperatura de gelatinización inicial de dicho material que contiene almidón, y
 - 55 b) fermentación con un organismo de fermentación,
 en el que la etapa a) se lleva a cabo mediante el uso de al menos una glucoamilasa, de acuerdo con la reivindicación 1.