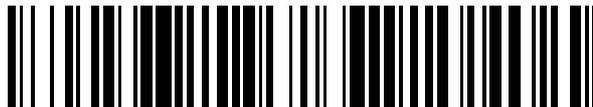


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 768**

51 Int. Cl.:

C12N 9/34 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

C12P 19/20 (2006.01)

C12P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05816997 .0**

96 Fecha de presentación: **07.10.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1824970**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.08.2007**

54

Título: **GLUCOAMILASA DE TRICHODERMA REESEI Y HOMÓLOGOS DE LA MISMA.**

30

Prioridad:
30.11.2004 WO PCT/US2004/040040
09.12.2004 WO PCT/US2004/041276
28.01.2005 US 647925 P
24.05.2005 WO PCT/US2005/018212
24.05.2005 WO PCT/US2005/018214

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.12.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.12.2011

73

Titular/es:
GENENCOR INTERNATIONAL, INC.
925 PAGE MILL ROAD
CA 94304 PALO ALTO, US

72

Inventor/es:
DUNN-COLEMAN, Nigel;
NEEFE-KRUIHOF, P.;
PILGRIM, Craig E.;
WARD, Donald E. y
VAN SOLINGEN, Pieter

74

Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 370 768 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

Glucoamilasa de *Trichoderma reesei* y homólogos de la misma

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a composiciones de nuevas enzimas que comprenden una glucoamilasa y una alfa amilasa útiles para la producción de glucosa y otros productos finales a partir de almidón. Las composiciones de enzimas son adecuadas para utilizar en varios procesos y son particularmente adecuadas para utilizar bajo condiciones de procesamiento convencional de almidón a alta temperatura y bajo condiciones de procesamiento de almidón sin cocción o baja temperatura.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 [0002] Las enzimas de glucoamilasa (α -1,4-glucano glucohidrolasas, E.C.3.2.1.3.) son carbohidrasas que hidrolizan el almidón que actúan de forma exógena. Las glucoamilasas catalizan la eliminación de unidades sucesivas de glucosa desde los extremos no reductores de almidón u oligomoléculas y polisacáridos relacionados y pueden hidrolizar enlaces glicosídicos tanto lineales como ramificados de almidón (amilasa y amilopectina).

20 [0003] Las glucoamilasas son producidas por numerosas cepas de bacterias, hongos, levadura y plantas. Las glucoamilasas particularmente interesantes son enzimas fúngicas que son producidas extracelularmente, por ejemplo, de cepas de *Aspergillus* (Boel et al., (1984) EMBO J. 3:1097-1102; Hayashida et al (1989) Agric. Biol. Chem. 53:923 - 929; USP 5,024,941; USP 4,794,175; y WO 88/09795), *Talaromyces* (USP 4,247,637; USP 6,255,084 y USP 6,620,924), *Rhizopus* (Ashikari et al. (1986) Agric. Biol. Chem. 50:957 - 964; Ashikari et al. (1989) App. Microbiol. and Biotech. 32:129 - 133 y USP 4,863,864), *Humicola* (WO05/052148 y USP 4,618,579) y *Mucor* (Houghton-Larsen et al., (2003) Appl. Microbiol. Biotechnol., 62: 210- 217). Muchos de los genes que codifican estas enzimas se han clonado y expresado en células de levadura y fúngicas.

30 [0004] Las glucoamilasas comerciales son enzimas muy importantes que se han utilizado en una amplia variedad de aplicaciones que requieren la hidrólisis de almidón. Las glucoamilasas se utilizan para la hidrólisis de almidón para producir edulcorantes de maíz con alto contenido de fructosa, y edulcorantes de maíz que comprenden por encima del 50% del mercado de edulcorantes de Estados Unidos. En general, los procesos que hidrolizan el almidón implican la utilización de alfa amilasas para hidrolizar el almidón en dextrinas y las glucoamilasas para hidrolizar las dextrinas a glucosa. A continuación, la glucosa se convierte en fructosa mediante otras enzimas, tales como glucosas isomerasas. La glucosa producida por glucoamilasas también se puede cristalizar o utilizar en fermentaciones para producir otros productos finales, tales como ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glutámico, 1,3-propanodiol y otros. Las glucoamilasas se utilizan en la producción de alcohol, tal como la producción de cerveza y la producción de sake. Las glucoamilasas también se utilizan en la producción de etanol para combustible y para el consumo. Recientemente, se han utilizado las glucoamilasas en procesos a baja temperatura para la hidrólisis de almidón granular (no cocinado). Las glucoamilasas también se utilizan en la preparación de alimentos de animales como aditivos alimenticios o como componentes de alimentos líquidos para animales de ganado.

45 [0005] Aunque las glucoamilasas se han utilizado de manera satisfactoria durante mucho tiempo, aún existe la necesidad de nuevas glucoamilasas útiles. La presente invención se basa en el descubrimiento de composiciones de nuevas enzimas adecuadas para utilizar en varias aplicaciones y particularmente procesos de conversión de almidón.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

50 [0006] La presente invención proporciona composiciones de enzimas y métodos de utilización de dichas composiciones de enzimas, tal como se define en las reivindicaciones.

[0007] La presente invención se refiere a una enzima que tiene actividad de glucoamilasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 4 o secuencias sustancialmente homólogas a la misma y variantes alélicas y fragmentos biológicamente funcionales de las mismas.

60 [0008] En otra realización, la presente invención se refiere a procesos de conversión de almidón que utilizan preparaciones de enzimas de la invención. En algunas realizaciones, la composición se puede utilizar en un proceso de conversión de almidón o almidón parcialmente utilizado en un jarabe que contiene dextrosa. La composición se puede utilizar en un proceso para producir jarabes especializados. En realizaciones adicionales, la composición se puede utilizar en una fermentación para producir productos finales, tales como alcoholes y particularmente etanol.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0009]

- 5 Las figuras 1A - B muestran secuencia de ADN genómico (SEC ID NO: 1) que codifican la glucoamilasa de *Trichoderma reesei* de la figura 3.
- Las figuras 2A - B muestran la secuencia de ADN sin intrones (SEC ID NO: 2) que codifica la glucoamilasa de *Trichoderma reesei* de la figura 3.
- 10 La figura 3A muestra la secuencia de aminoácidos deducida (SEC ID NO: 3) de la glucoamilasa de *Trichoderma reesei* que tiene 632 aminoácidos, donde la secuencia señal (SEC ID NO: 38) está en negrita y está representada por las posiciones de residuos 1 - 20; la prosequencia (SEC ID NO: 39) está en negrita y subrayada y representada por las posiciones de residuos 21 - 33; 15 el dominio catalítico (SEC ID NO: 40) está representada por las posiciones de residuos 34 - 486; la región adaptadora (SEC ID NO: 41) está en cursiva y representada por las posiciones de residuos 487 - 523; y el dominio de unión a almidón (SEC ID NO: 42) está en cursiva y subrayada y representada por las posiciones de residuos 524 - 632.
- 20 El residuo de aminoácido N-terminal de la proteína madura representada por la posición de residuo 34 es serina.
- La figura 3B muestra la secuencia de proteína madura deducida (SEC ID NO: 4) de la glucoamilasa de *Trichoderma reesei* de la figura 3A. La secuencia de la proteína madura incluye el dominio catalítico, que está subrayado (SEC ID NO: 40), la región adaptadora (SEC ID NO: 41) y el dominio de unión a almidón (SEC ID NO: 42).
- 25 La figura 4 muestra la secuencia de ADN genómico que tiene 2154 pb (SEC ID NO: 5) que codifica la glucoamilasa de *Hypocrea citrina* var. *americana* (GA102) (SEC ID NO: 6).
- 30 La figura 5 muestra la secuencia de ADN genómico que tiene 2152 pb (SEC ID NO: 7) que codifica la glucoamilasa de *Hypocrea vinosa* (GA104) (SEC ID NO: 8).
- La figura 6 muestra la secuencia de ADN genómico que tiene 2158 pb (SEC ID NO: 9) que codifica una glucoamilasa de *Trichoderma sp.* (GA105) (SEC ID NO: 10).
- 35 La figura 7 muestra la secuencia de ADN genómico que tiene 2144 pb (SEC ID NO: 11) que codifica una glucoamilasa de *Hypocrea gelatinosa* (GA107) (SEC ID NO: 12).
- La figura 8 muestra la secuencia de ADN genómico que tiene 2127 pb (SEC ID NO: 13) que codifica una glucoamilasa de *Hypocrea orientalis* (GA108) (SEC ID NO: 14).
- 40 La figura 9 muestra la secuencia de ADN genómico que tiene 2139 pb (SEC ID NO: 15) que codifica una glucoamilasa de *Trichoderma konilangbra* (GA109) (SEC ID NO: 16).
- La figura 10 muestra la secuencia de ADN genómico que tiene 2088 pb (SEC ID NO: 28) que codifica una glucoamilasa de *Trichoderma sp.* (GA113) (SEC ID NO: 29).
- 45 La figura 11 muestra la secuencia de ADN genómico que tiene 2141 pb (SEC ID NO: 30) que codifica una glucoamilasa de *Trichoderma harzianum* (GA103) (SEC ID NO: 31).
- 50 La figura 12 muestra la secuencia de ADN genómico que tiene 2131 pb (SEC ID NO: 32) que codifica una glucoamilasa de *Trichoderma longibrachiatum* (GA124) (SEC ID NO: 33).
- La figura 13 muestra la secuencia de ADN genómico que tiene 2151pb (SEC ID NO: 34) que codifica una glucoamilasa de *Trichoderma asperellum* (GA127) (SEC ID NO: 35).
- 55 La figura 14 muestra la secuencia de ADN genómico que tiene 2142 pb (SEC ID NO: 36) que codifica una glucoamilasa de *Trichoderma strictipilis* (GA128) (SEC ID NO: 37).
- 60 La figura 15A - I muestra las posibles secuencias de aminoácidos para las glucoamilasas codificadas por las secuencias de ADN de SEC ID NOs: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 28, 30, 32, 34 y 36, que corresponden a las secuencias de aminoácidos de SEC ID NOs: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 29, 31, 33, 35 y 37 respectivamente, donde el péptido líder está en negrita y la prosequencia está subrayada y en negrita para cada proteína. La secuencia de la proteína madura que excluye la secuencia líder y prosequencia para cada proteína también está representada como la SEC ID NO: 17 para (1) GA102; SEC ID NO: 18 para (2) GA104; SEC ID NO: 19 para (3) GA105; SEC ID NO: 20 para (4) GA107; SEC ID NO: 21 para (5) GA108; SEC ID NO: 22 para (6) GA109; SEC ID NO: 43 para (7) GA113; SEC ID
- 65

NO: 44 para (8) GA103; SEC ID NO: 45 para (9) GA124; SEC ID NO: 46 para (10) GA127 y SEC ID NO: 47 para (11) GA128.

La figura 16 ilustra el gel SDS-PAGE utilizado para determinar el PM de la TrGA purificado, donde el carril 1 muestra la TrGA y el carril 2 muestra el marcador de peso molecular SeeBlue Plus 2 (Invitrogen).

La figura 17A es un mapa del plásmido del vector de expresión de *T. reesei*, pTrex3g.

La figura 17B es un mapa de plásmido que incluye el vector de expresión de *T. reesei* pNSP23, donde el gen de TrGA se clona en pTrex3g.

La figura 18 muestra (A) el % de actividad relativa de GA' de la TrGA a 37°C desde pH 3 - 8 y (B) el % de actividad relativa de GA de la TrGA a pH 4,0 de 25°C a 78°C y se hace referencia al ejemplo 4.

La figura 19 ilustra el gel SDS-PAGE utilizado para determinar la secreción glucoamilasas sustancialmente homólogas en la cepa (1A52) del huésped de *Trichoderma*, donde la banda a aproximadamente 62kDa representa glucoamilasa y el carril 1 representa GA104, el carril 2 representa GA105; el carril 3 representa GC107; el carril 4 representa GA109; el carril 5 representa TrGA; el carril 6 representa una cepa huésped de control de *Trichoderma reesei* (1A52); y el carril 7 representa un marcador de peso molecular estándar.

La figura 20 (A) ilustra la secuencia de aminoácidos (SEC ID NO: 26) para una glucoamilasa de *Aspergillus niger* que incluye la secuencia líder. El residuo de aminoácido N-terminal de la proteína madura está representada por la posición de residuo 25, A (alanina); la región adaptadora está subrayada y el dominio de unión a almidón está en cursiva. (B) ilustra la secuencia de aminoácidos para una alfa amilasa de *Aspergillus kawachi* (SEC ID NO: 27) que incluye la secuencia líder, donde la secuencia líder está en negrita y subrayada y está representada por los residuos de aminoácidos 1-21; la región adaptadora está subrayada y el dominio de unión a almidón está en cursiva. La proteína madura incluye el dominio catalítico, el adaptador y el dominio de unión a almidón.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0010] En algunos aspectos, la presente invención se refiere a técnicas de rutina y métodos utilizados en el campo de la ingeniería genética y biología molecular. Los siguientes recursos incluyen descripciones de metodología general útiles de acuerdo con la invención: Sambrook et al. Eds., MOLECULE CLONING: A LABORATORY MANUAL (3rd Ed. 2000); Kriegler M. Ed., GENE TRANSFER AND EXPRESSION: A LABORATORY MANUAL (1990); y Ausubel et al. Eds., SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (5th Ed. 2002). Aunque se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos aquí en la práctica o análisis de la invención, los métodos y materiales preferidos se describen a continuación.

[0011] A menos que se defina lo contrario aquí, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado entendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la invención. Singleton et al., et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY 2nd Ed, John Wiley and Sons, NY (1994) y Hale and Margham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991) Addison Wesley Pub. Co. proporcionan a un experto diccionarios de muchos de los términos utilizados en la descripción de esta invención.

[0012] La presente invención se describirá en detalle a continuación a modo de referencia sólo utilizando las siguientes definiciones y ejemplos.

[0013] Las formas singulares "un" "una" y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contenido dictamine claramente lo contrario. De este modo, por ejemplo, la referencia a una composición que contiene "un compuesto" incluye una mezcla de dos o más compuestos. Cabe indicar que el término "o" se utiliza en general en el sentido de incluir "y/o" a menos que el contenido dictamine claramente lo contrario.

[0014] Los intervalos numéricos incluyen los números de los intervalos.

[0015] A menos que se indique lo contrario, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxilo, respectivamente.

[0016] Los encabezamientos proporcionados aquí no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la invención que se pueden haber proporcionado por referencia a la memoria en su totalidad.

Definiciones

[0017] El término "glucoamilasa" se refiere a la clase amiloglucosidasa de enzimas (E.C. 3.2.1.3, glucoamilasa, 1,4-alfa-D-glucan glucohidrolasa). Estas enzimas liberan residuos glucosilo de los extremos no reductores de las moléculas de amilasa y amilopectina.

[0018] La frase "que tiene actividad hidrolizante de almidón granular" significa una enzima que es capaz de hidrolizar el almidón en forma granular.

[0019] La frase "grupo de la familia de Trichoderma/Hypocrea" significa un miembro de la familia de Hypocreaceae incluyendo varios anamorfos como Trichoderma y Gliocladium de la orden de Hypocreales, Phylum Ascomycota y se hace referencia al Capítulo 12, Alexopoulos, C.J., et al., in INTRODUCTORY MYCOLOGY 4th Edition, John Wiley & Sons, NY 1996.

[0020] Los términos "secuencia de ácido nucleico" y "polinucleótido" se pueden utilizar indistintamente en la presente invención. El término comprende ADN genómico, ADN sin intrones, orígenes sintéticos o combinaciones de los mismos.

[0021] El término "intrón" significa una secuencia de ADN intermedia que se transcribe pero se elimina del transcrito mediante corte y empalme de las secuencias codificantes de la proteína madura.

[0022] El término "secuencia de ácido nucleico aislada" significa una secuencia de ácido nucleico que está esencialmente libre de otras secuencias de ácido nucleico.

[0023] El término "fragmentos biológicamente funcionales de una secuencia" (por ejemplo, fragmentos biológicamente funcionales de la SEC ID NO: 4) significa un polipéptido que tiene actividad glucoamilasa y uno o más residuos de aminoácidos eliminados de los extremos amino y/o carboxilo de la secuencia de aminoácidos.

[0024] El término "vector" significa una secuencia de polinucleótidos diseñada para introducir ácidos nucleicos en uno o más tipos de células.

[0025] El término "vector de expresión" significa una construcción de ADN que comprende una secuencia de ácidos nucleicos, que está unida operativamente a una secuencia de control adecuada capaz de realizar la expresión de la secuencia de ácido nucleico en un huésped adecuado. Las secuencias de control adecuadas incluyen promotores para realizar la transcripción, secuencias operadoras, secuencias que codifican sitios de unión a ribosoma adecuados en el ARNm, potenciadores y/o secuencias de terminación.

[0026] El término "promotor" significa una secuencia reguladora implicada en la unión de ARN polimerasa para iniciar la transcripción de un gen.

[0027] El término "unido operativamente" se refiere a la yuxtaposición donde los elementos están en una disposición que les permite estar funcionalmente relacionados. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia.

[0028] El término "un polipéptido aislado" significa un polipéptido que está esencialmente libre de otros polipéptidos que no son glucoamilasa. Un polipéptido aislado puede ser por lo menos un 20% puro, por lo menos 40% puro, por lo menos 60% puro, por lo menos 70% puro, por lo menos 80% puro, por lo menos 90% puro, por lo menos 95% puro determinado mediante SDS-PAGE.

[0029] El término "secuencia señal" significa una secuencia de aminoácidos unida a la parte N-terminal de una proteína, lo cual facilita la secreción de la forma madura de una proteína fuera de la célula. La definición de una secuencia señal es funcional. La forma madura de la proteína extracelular carece de la secuencia señal, la cual se separa durante el proceso de secreción. Los términos "secuencia señal", "péptido señal" y "péptido líder" se pueden utilizar indistintamente en el presente documento. En general, la secuencia señal se refiere a la secuencia de nucleótidos y el término péptido líder se refiere a la secuencia de aminoácidos.

[0030] Los términos "proteína" y "polipéptido" se utilizan indistintamente en el presente documento. En el presente documento se utiliza el código convencional de una letra o tres letras para aminoácidos

[0031] El término "dominio catalítico" se refiere a una región estructural de un polipéptido, que contiene el sitio activo para la hidrólisis de sustrato.

[0032] El término "adaptador" se refiere a una secuencia de aminoácidos corta que tiene en general entre 3 y 40 residuos de aminoácidos que se unen covalentemente a una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio de unión a almidón con una secuencia de aminoácidos que comprende un dominio catalítico.

[0033] El término "dominio de unión a almidón" se refiere a una secuencia de aminoácidos que se une preferentemente a sustrato de almidón.

[0034] El término "variantes alélicas" significa cualquiera de dos o más formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus cromosómico. La variación alélica surge de forma natural a través de la mutación y puede dar lugar al

polimorfismos entre poblaciones. Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

5 **[0035]** El término "célula huésped" o "cepa huésped" significa un huésped adecuado para un vector de expresión o construcción de ADN que comprende un polipéptido que codifica una glucoamilasa comprendida por la invención. Las células huésped adecuadas se utilizan de manera ventajosa en la producción recombinante de las glucoamilasas comprendidas por la invención.

10 **[0036]** Tal como se utiliza en la presente invención, el término "derivado de" utilizado en relación con un polinucleótido o polipéptido significa que el polipéptido o polinucleótido es nativo para el microorganismo.

[0037] El término "heterólogo" con referencia a un polinucleótido o proteína se refiere a un polinucleótido o proteína que no es natural en una célula huésped.

15 **[0038]** El término "endógeno" con referencia a un polinucleótido o proteína se refiere a un polinucleótido o proteína que es natural en una célula huésped.

20 **[0039]** El término "expresión" significa el proceso por el que se produce un polipéptido en base a la secuencia de ácidos nucleicos de un gen.

[0040] El término "sobreexpresión" significa el proceso de expresión de un polipéptido en una célula huésped donde un polinucleótido se ha introducido en la célula huésped.

25 **[0041]** El término "introducido" en el contexto de insertar una secuencia de ácido nucleico en una célula significa la transfección, transformación o transducción e incluye la referencia a la incorporación de la secuencia de ácido nucleico en una célula huésped.

30 **[0042]** El término "almidón granular" se refiere a almidón crudo no cocinado (por ejemplo, almidón granular que no se ha sometido a gelatinización).

[0043] El término "almidón" se refiere a cualquier material comprendido de los carbohidratos de polisacáridos complejos de planta, comprendidos de amilasa y amilopectina con la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_x$, donde X puede ser cualquier número.

35 **[0044]** El término "gelatinización" significa la solubilización de una molécula de almidón mediante cocción para formar una suspensión viscosa. La frase "por debajo de la temperatura de gelatinización" se refiere a una temperatura inferior a la temperatura a la que empieza la gelatinización.

40 **[0045]** El término "cultivar" se refiere al crecimiento de una población de células microbianas bajo condiciones adecuadas en un medio líquido o sólido. En una realización, el cultivo se refiere a la bioconversión fermentativa de un sustrato de almidón a un producto final (habitualmente en un recipiente o reactor). La fermentación es la rotura enzimática y anaeróbica de sustancias orgánicas por microorganismos para producir compuestos orgánicos más simples. Aunque la fermentación tiene lugar bajo condiciones anaeróbicas no se pretende que el término se limite únicamente a condiciones anaeróbicas estrictas ya que la fermentación también tiene lugar en presencia de oxígeno.

[0046] El término "producto final" se refiere a cualquier producto molecular derivado de fuentes de carbonos que se convierte enzimáticamente a partir de un sustrato de almidón.

50 **[0047]** El término "conversión enzimática" se refiere a la modificación de un sustrato mediante acción enzimática.

[0048] El término "actividad específica" significa una unidad enzimática definida como el número de moles de sustrato convertidos en producto mediante una preparación de enzimas por unidad de tiempo bajo condiciones específicas. La actividad específica se expresa como unidades (U)/mg de proteína.

55 **[0049]** El término "monosacárido" significa una unidad monomérica de un polímero, tal como almidón, donde el grado de polimerización (DP) es 1 (por ejemplo, glucosa, manosa, fructosa y galactosa).

60 **[0050]** El término "disacárido" significa un compuesto que comprende dos unidades de monosacáridos unidas covalentemente (DP2). El término comprende, pero sin limitación, compuestos, tales como sacarosa, lactosa y maltosa.

[0051] El término "un DP >3" significa polímeros con un grado de polimerización superior a 3.

65 **[0052]** El término "oligosacárido" significa un compuesto que tiene 2-10 unidades de monosacáridos unidos en enlaces glicosídicos.

[0053] El término "polisacárido" significa un compuesto que tiene múltiples unidades de monosacáridos unidas en una cadena lineal o ramificada. En algunas realizaciones, el término se refiere a cadenas largas con cientos o miles de unidades de monosacáridos. Ejemplos habituales de polisacáridos son almidón, celulosa y glicógeno.

[0054] Tal como se utiliza en la presente invención, el término "contenido de sólidos secos (DS o ds)" se refiere a los sólidos totales de una emulsión en % en una base de peso en seco.

[0055] El término "molienda" se refiere a la rotura de granos de cereales en partículas más pequeñas. En algunas realizaciones, el término se utiliza indistintamente con trituración.

[0056] El término "molienda en seco" se refiere a la molienda del grano completo en seco, donde las fracciones del grano, tales como el germen y salvado, no se han extraído intencionadamente.

[0057] Tal como se utiliza en la presente invención, los términos "grano seco residual (DDG)" y "grano seco residual con solubles (DDGS)" se refieren a coproductos útiles de los procesos de fermentación del grano.

[0058] El término "DE" o "equivalente de dextrosa" es un patrón de la industria para medir la concentración de azúcares reductores totales, calculado como D-glucosa en una base de peso seco. El almidón granular no hidrolizado tiene un DE que es esencialmente 0 y la D-glucosa tiene un DE de 100.

[0059] El término "jarabe de azúcar" se refiere a una composición acuosa que contiene carbohidratos solubles. En una realización, el jarabe de azúcar es un jarabe que contiene glucosa.

Secuencias de aminoácidos de glucoamilasa de *Trichoderma reesei*

[0060] Se ha clonado una glucoamilasa derivada de QM6a de *Trichoderma reesei* (ATCC, No. acceso 13631) tal como se describe en detalle en el ejemplo 1. La glucoamilasa de longitud completa derivada de *Trichoderma reesei* se ilustra en la figura 3 y tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 3. La secuencia de la proteína madura de la glucoamilasa de *Trichoderma reesei*, (SEC ID NO: 4) se representa por los residuos de aminoácidos 34 - 632 de la figura 3.

[0061] La presente invención se refiere a una composición de enzimas que comprende una glucoamilasa que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en por lo menos un 90% con la SEC ID NO:4 y una alfa-amilasa que tiene por lo menos un 90% de identidad con la secuencia de proteína madura de SEC ID NO:27

[0062] También se describe en este documento una glucoamilasa que comprende la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 3 o una enzima con actividad glucoamilasa que es sustancialmente homóloga a la misma. La glucoamilasa de SEC ID NO: 3 incluye la secuencia señal de la glucoamilasa obtenida de *Trichoderma reesei*.

[0063] También se describe en este documento un polipéptido que tiene actividad glucoamilasa que comprende el dominio catalítico de la glucoamilasa de SEC ID NO: 4, que también está representada por la SEC ID NO: 40.

Homología de la Secuencia de Proteínas

[0064] La homología entre las dos glucoamilasas se puede determinar mediante el grado de identidad entre las secuencias de aminoácidos de dos secuencias de proteínas. Un polipéptido o polinucleótido que tiene un cierto porcentaje de identidad con otra secuencia (es decir, 80%, 90% y 95%) significa que cuando se alinean, ese porcentaje de bases o residuos de aminoácidos son el mismo al comparar las dos secuencias. Este alineamiento y porcentaje de homología o identidad se pueden determinar utilizando cualquier programa de software adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, algunos programas adecuados se describen en CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel et al., eds 1995, Capítulo 19). Los programas preferidos incluyen el programa GCG Pileup (Wisconsin Package, Version 8.1 y 10.0), FASTA, BLAST y TFASTA. Otro programa de alineamiento preferido es ALIGN o ALIGN Plus (Dayhoff (1978) en ATLAS OF PROTEIN SEQUENCE AND STRUCTURE 5: Suppl. 3 (National Biomedical Research Foundation)). También se pueden utilizar algoritmos adicionales como BLASTP, BLASTN y BLASTX (Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410). Otros métodos útiles incluyen ClustralW (Thompson et al., (1997) Nucleic Acid Research 25:4.876 -4882) que utilizan software proporcionado por DNASTAR (Madison WI). También se hace referencia a Needleman et al., (1970) J. Mol. Biol. 48:443, Smith et al., (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482, Smith et al., (1997) Meth. Mol. Biol. 70: 173-187 and Pearson et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:24444.

[0065] Según la presente invención, una secuencia de aminoácidos "sustancialmente homóloga" muestra actividad glucoamilasa y una identidad de por lo menos un 90%, por lo menos 93%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% y por lo menos 99% con la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 4. Las secuencias de glucoamilasa sustancialmente homólogas particularmente preferidas son las secuencias de proteína madura mostradas en la figura 15 y que corresponden con las SEC ID NOs: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 43, 44, 45, 46 y 47. Adicionalmente, las

secuencias de glucoamilasa sustancialmente homologas preferidas son las secuencias mostradas en la figura 15, que corresponden a las SEC ID NOs: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 29, 31, 33, 35 y 37 e incluyen una secuencia líder. Polipéptidos sustancialmente homólogos adicionales incluyen variaciones alélicas y mutantes naturales que tienen actividad de glucoamilasa. En la presente invención, la actividad específica de las glucoamilasas analizadas esencialmente bajo las mismas condiciones tendrá por lo menos un 90%, por lo menos 100%, por lo menos 125%, por lo menos 150%, por lo menos 175% y también por lo menos 200% de la actividad específica de la proteína madura derivada de *Trichoderma reesei* que tiene la secuencia ilustrada en la figura 3 (SEC ID NO: 4). En algunas realizaciones, la actividad específica se puede medir en un sustrato de almidón soluble y en otras realizaciones la actividad específica se puede medir en un sustrato de almidón granular.

[0066] Tal como se describe en el presente documento, una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 90% de identidad en la secuencia con la secuencia de SEC ID NO: 3 o SEC ID NO: 4 puede incluir sustituciones conservativas de aminoácidos utilizando L-aminoácidos, donde un aminoácido se sustituye por otro aminoácido biológicamente similar. Las sustituciones conservativas de aminoácidos son aquellas que conservan la carga general, la hidrofobicidad/hidrofilicidad y/o el volumen estérico del aminoácido que se sustituye. Ejemplos no limitantes de sustituciones conservativas incluyen aquellas entre los siguientes grupos: Gly/Ala, Val/Ile/Leu, Lys/Arg, Asn/Gln, Glu/Asp, Ser/Cys/Thr y Phe/Trp/Tyr. Otras sustituciones conservativas se puede extraer de la siguiente tabla.

Tabla 1 – Sustituciones conservativas de aminoácidos

Para el aminoácido	Código	Sustitución con cualquiera de
Alanina	A	D-Ala, Gly, beta-Ala, L-Cys, D-Cys
Arginina	R	D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Om, D-Om
Asparagina	N	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Ácido aspártico	D	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
Cisteína	C	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr
Glutamina	Q	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
Ácido Glutámico	E	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
Glicina	G	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, b-Ala, Acp
Isoleucina	I	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Leucina	L	D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
Lisina	K	D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D-Met, Ile, D-Ile, Om, D-Om
Metionina	M	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
Fenilalanina	F	D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4, o 5-fenilprolina, cis-3,4, ó 5-fenilprolina
Prolina	P	D-Pro, ácido L-l-tioazolidin-4-carboxílico, ácido D-o L-1-oxazolidin-4-carboxílico
Serina	S	D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys
Treonina	T	D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val
Tirosina	Y	D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His
Valina	V	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

[0067] Las sustituciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservativas.

[0068] Una glucoamilasa puede derivar de una cepa fúngica filamentosa y particularmente las secuencias sustancialmente homólogas se obtendrá de cepas del género *Aspergillus spp.*, *Rhizopus spp.*, *Humicola spp.*, *Fusarium spp.*, *Mucor spp.*, *Trichoderma spp.*, y similares. En una realización preferida, las secuencias sustancialmente homólogas que tiene actividad glucoamilasa derivarán de cepas del grupo de familias *Trichoderma/Hypocrea*. Algunas de las especies incluyen *T. stromaticum*, *H. citrina var. americana*, *H. citrina*, *H. lactea*, *H. hunua*, *T. fertile*, *T. tomentosum*, *H. vinosa*, *T. harzianum*, *T. inhamatum*, *T. oblongisporum*, *T. cf. aureoviride*, *T. cf. harzianum*, *T. fasciculatum*, *H. tawa*, *T. crassum*, *T. flavovirens*, *T. virens*, *T. longipilis*, *T. spirale*, *T. strictipilis*, *H. pilulifera*, *T. polysporum*, *T. croceum*, *T. minutisporum*, *T. hamatum*, *T. asperillum*, *T. atroviride*, *T. koningii*, *T. viride*, *H. gelatinosa*, *T. strigosum*, *T. pubescens*, *H. novazelandiae*, *T. saturnisporum*, *T. longibrachiatum*, *H. orientalis*, *T. citrinoviride*, *T. reesei*, *T. ghanense*, *T. pseudokoningii*, *H. andinensis* y *H. aureoviride*. Las cepas particularmente preferidas del género *Trichoderma* y *Hypocrea spp.* aliada incluyen *H. citrina var. americana*, *H. citrina*, *H. lactea*, *H. vinosa*, *T. harzianum*, *T. atroviride*, *T. koningii*, *T. viride*, *H. gelatinosa*, *T. saturnisporum*, *T. longibrachiatum*, *H. orientalis*, *T. citrinoviride*, *T. reesei*, y *T. konilangbra*.

[0069] Algunas cepas de las especies descritas anteriormente están accesible al público a partir de colecciones de cultivo, tales como American Type Culture Collection (ATCC) P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ); Agricultural Research Service Plant Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL); the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), P. O. Box 85167, 3508 AD Utrecht, The Netherlands; Plant Research Institute, Department of Agriculture, Mycology, Ottawa, (DAOM) Canada and International Mycological Institute (IMI), Genetic Resources Collection, Egham, United Kingdom..

[0070] Trichoderma reesei clonado y secuencias de ADN sustancialmente homólogas. En el presente documento se describe una secuencia de ADN clonada que codifica un polipéptido que muestra actividad de glucoamilasa de la invención, comprendiendo dicha secuencia de ADN

- 5
- a) la secuencia de ADN ilustrada en SEC ID NO: 1;
 b) la secuencia de ADN ilustrada en SEC ID NO: 2;
 c) una secuencia de ADN que codifica una glucoamilasa que tiene por lo menos un 80%, por lo menos 83%, por lo menos 85%, por lo menos 87%, por lo menos 90%, por lo menos 93%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% y por lo menos 99% de identidad con la secuencia de SEC ID NO: 3;
 10 d) una secuencia de ADN que codifica una glucoamilasa que tiene por lo menos un 80%, por lo menos 83 %, por lo menos 85%, por lo menos 87%, por lo menos 90%, por lo menos 93%, por lo menos 95%, por lo menos 97%, por lo menos 98% y por lo menos 99% de identidad con la secuencia de SEC ID NO: 4;
 e) una secuencia de ADN que codifica una enzima que tiene actividad de glucoamilasa, donde la enzima tiene por lo menos un 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% y por lo menos 99% de identidad en la secuencia con cualquiera de las secuencias mostradas en las SEC ID NOs: 17, 18, 19, 20, 21, 22, 43, 44, 45, 46 y 47;
 f) una secuencia de ADN que codifica un fragmento biológicamente funcional de una secuencia que tiene por lo menos un 85%, por lo menos 90%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97% y por lo menos 98% de identidad con las posiciones de residuos de aminoácidos 1 a 453 de la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 4;
 20 g) una secuencia de ADN que codifica una enzima que tiene actividad de glucoamilasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos un 90%, por lo menos 95%, por lo menos 97% y por lo menos 98% de identidad en la secuencia con cualquiera de las siguientes secuencias:
- 25 a. las posiciones de residuos de aminoácidos 1 a 453 de SEC ID NO: 17;
 b. las posiciones de residuos de aminoácidos 1 a 452 de SEC ID NO: 18;
 c. las posiciones de residuos de aminoácidos 1 a 454 de SEC ID NO: 19;
 d. las posiciones de residuos de aminoácidos 1 a 452 de SEC ID NO: 20;
 e. las posiciones de residuos de aminoácidos 1 a 453 de SEC ID NO: 21;
 30 f. las posiciones de residuos de aminoácidos 1 a 453 de SEC ID NO: 22;
 g. las posiciones de residuos de aminoácidos 1 a 452 de SEC ID NO: 43;
 h. las posiciones de residuos de aminoácidos 1 a 452 de SEC ID NO: 44;
 i. las posiciones de residuos de aminoácidos 1 a 453 de SEC ID NO: 45;
 j. las posiciones de residuos de aminoácidos 1 a 452 de SEC ID NO: 46; y
 35 k. las posiciones de residuos de aminoácidos 1 a 453 de SEC ID NO: 47.
- h) un ADN que es por lo menos un 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90%, por lo menos 93%, por lo menos 95%, por lo menos 97% y por lo menos un 99% idéntico con la secuencia mostrada en la SEC ID NO: 1 o SEC ID NO: 2, donde dicha secuencia de ADN codifica una enzima que tiene actividad de glucoamilasa; o
 40 i) una secuencia de ADN, que se hibrida bajo condiciones rigurosas elevadas a una sonda de ácido nucleico que corresponde a la secuencia de ADN de SEC ID NO: 2 o un fragmento de la misma que tiene por lo menos 20, por lo menos 30 por lo menos 40, por lo menos 50 por lo menos 60, por lo menos 70 por lo menos 100, por lo menos 150 nucleótidos consecutivos.
- 45 **[0071]** También se describe en este documento una secuencia de ADN clonada que codifica una enzima que tiene actividad de glucoamilasa y por lo menos un 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97% por lo menos 98% y por lo menos 99% de identidad en la secuencia con las secuencias de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID NOs: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 29, 31, 33, 35, y 37.
- 50 **[0072]** Debido a la degeneración del código genético, se puede utilizar más de un codón para codificar un aminoácido concreto. Por lo tanto, diferentes secuencias de ADN pueden codificar un polipéptido que tiene exactamente la misma secuencia de aminoácidos que el polipéptido de, por ejemplo, SEC ID NO: 4. También se describen polinucleótidos que codifican el mismo polipéptido. Las secuencias de ADN que codifican las glucoamilasas comprendidas por la invención pueden incluir o no intrones.
- 55 **[0073]** La homología de las secuencias de ADN se determina por el grado de identidad entre las dos secuencias de ADN. La homología se puede determinar utilizando programas informáticos descritos anteriormente para determinar la homología de la secuencia de proteínas.
- 60 **[0074]** Un ácido nucleico es hibridable con otro ácido nucleico cuando una forma de cadena sencilla del ácido nucleico se puede hibridar con otro ácido nucleico bajo condiciones apropiadas de temperatura y fuerza iónica en solución. Las condiciones de hibridación y lavado son conocidas en la técnica para la hibridación bajo condiciones de rigurosidad baja, media, media/alta, alta y muy alta (véase, por ejemplo, Sambrook et al., supra, particularmente los capítulos 9 y 11). En general, la hibridación implica una sonda de nucleótidos y una secuencia de ADN homóloga que forman híbridos estables de doble cadena mediante un emparejamiento de bases extenso de polinucleótidos complementarios (Véase, Capítulo 8, GeneCloning, An Introduction, T.A. Brown, (1995) Chapman and Hall, London).
- 65

[0075] El filtro con la sonda y la secuencia homóloga se lavan en 2 veces de cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC), SDS al 0,5% a aproximadamente 60°C (rigurosidad media); 65°C (rigurosidad media/elevada) 70°C (rigurosidad elevada) y aproximadamente 75°C (rigurosidad muy elevada).

Vectores

[0076] En el presente documento se describe el ensamblaje de una construcción de ADN que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucoamilasa comprendida por la invención e unida operativamente a una secuencia para transferir a una célula huésped. La construcción de ADN se puede introducir en una célula huésped utilizando un vector. El vector puede ser cualquier vector que cuando se introduce en una célula huésped se integra en el genoma de la célula huésped y se replica. Los vectores incluyen vectores de clonación, vectores de expresión, vectores lanzadera, plásmidos, partículas de fagos, cassettes y similares. El vector puede ser un vector de expresión que comprende secuencias reguladoras unidas operativamente a la secuencia codificante de glucoamilasa.

[0077] Ejemplos de vectores de expresión y/o integración adecuados se proporcionan en Sambrook et al., (1989) supra, y Ausubel (1987) supra, y van den Hondel et al. (1991) en Bennett and Lasure (Eds.) MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press pp. 396-428 y la Patente de Estados Unidos No. 5,874,276. También se hace referencia a Fungal Genetics Stock Center Catalogue of Strains (FGSC, < www.fgsc.net>) para una lista de vectores. Entre los vectores particularmente útiles se incluyen vectores obtenidos a partir de por ejemplo de Invitrogen y Promega. Los vectores específicos para utilizar en células huésped fúngicas incluyen vectores, tales como pFB6, pBR322, pUC18, pUC100, pDON™201, pDONR™221, pENTR™, pGEM@3Z y pGEM@4Z.

[0078] El promotor, que muestra actividad transcripcional en una célula huésped fúngica, puede derivar de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula huésped. El promotor puede ser un promotor mutante, truncado e híbrido. Preferiblemente, el promotor es útil en un huésped de *Trichoderma* o *Aspergillus*. Entre los promotores de ejemplos se incluyen los promotores de *T. reesei cbh1*, *cbh2*, *egl1*, *egl2*, *eg5*, *xln1* y *xln2*. Otros ejemplos de promotores útiles incluyen promotores de genes de glucoamilasa de *A. awamori* y *A. niger* (*glaA*) (véase, Nunberg et al., (1984) Mol. Cell Biol. 4:2306-2315 y Boel et al., (1984) EMBO J. 3:1581-1585), genes de acetamidasa de *Aspergillus nidulans* y genes de lipasa de *Rhizomucor miehei*.

[0079] El promotor puede ser nativo a la célula huésped. Por ejemplo, cuando *T. reesei* es el huésped, el promotor es un promotor de *T. reesei* nativo.

[0080] Alternativamente, el promotor puede ser heterólogo a la célula huésped fúngica.

[0081] El promotor puede ser *cbh1* de *T. reesei*, que es un promotor inducible y se ha depositado en el GenBank bajo el número de Acceso D86235.

[0082] Un "promotor inducible" es un promotor que es activo bajo regulación del medio o por desarrollo. La construcción de ADN puede incluir ácidos nucleicos que codifican una secuencia señal que es una secuencia de aminoácidos unida al extremo terminal amino del polipéptido que dirige el polipéptido codificado en el mecanismo secretor de la célula. El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de ácido nucleico puede incluir de forma natural una región codificante de péptido señal que está unida de forma natural en el marco de lectura de traducción con el segmento de la secuencia codificante de glucoamilasa que codifica la glucoamilasa secretada o el extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de ácido nucleico puede incluir un péptido señal que es exógena a la secuencia. La construcción de ADN puede incluir una secuencia señal que está asociada de forma natural con el gen de glucoamilasa a expresar. Las secuencias señal eficaces pueden incluir las secuencias señal obtenidas a partir de glucoamilasas de otras células fúngicas filamentosas, tales como *Humicola*, *Aspergillus*, y *Rhizopus*.

[0083] El ácido nucleico de la construcción de ADN que codifica una secuencia señal que tiene por lo menos un 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% y por lo menos 99% de identidad en la secuencia con la secuencia señal representada en la figura 3.

[0084] La construcción o vector de ADN que comprende una secuencia señal y una secuencia de promotor a introducir en una célula huésped fúngica pueden derivar de la misma fuente. Por ejemplo, la secuencia señal puede ser la secuencia señal *cbh1* que está unida operativamente a un promotor de *cbh1*. Alternativamente, se puede utilizar la secuencia señal de glucoamilasa nativa de un miembro del grupo de familias de *Trichoderma/Hypocrea*.

[0085] El vector de expresión también puede incluir una secuencia de terminación. Se puede utilizar cualquier secuencia de terminación funcional en la célula huésped. Por ejemplo, la secuencia de terminación y la secuencia de promotor pueden derivar de la misma fuente. La secuencia de terminación puede ser homóloga a la célula huésped. Una secuencia de terminación particularmente adecuada es *cbh1* derivada de la cepa de *Trichoderma* y particularmente *T. reesei*. Otros terminadores fúngicos útiles incluyen el terminador de genes de glucoamilasa de *A.*

niger o *A. awamori* (Nunberg et al. (1984) supra, and Boel et al., (1984) supra), genes de antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, genes de TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, o *A. nidulans trpC* (Punt et al., (1987) Gene 56:117 - 124).

5 [0086] Un vector de expresión puede incluir un marcador seleccionable. Ejemplos de marcadores seleccionables preferidos incluyen los que confieren resistencia antimicrobiana (por ejemplo, higromicina y fleomicina). También son útiles marcadores selectivos nutricionales incluyendo aquellos marcadores conocidos en la técnica, *amdS*, *argB* y *pyr4*. Los marcadores útiles en los sistemas de vectores para la transformación de *Trichoderma* son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Finkelstein, capítulo 6 en BIOTECHNOLOGY OF FILAMENTOUS FUNGI, Finkelstein et al. Eds. Butterworth-Heinemann, Boston, MA (1992), Chap. 6.; y Kinghorn et al. (1992) APPLIED MOLECULAR GENETICS OF FILAMENTOUS FUNGI, Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, London). Un marcador selectivo es el gen *amdS*, el cual codifica la enzima acetamidasa, permitiendo que las células transformadas crezcan en acetamida como fuente de nitrógeno. La utilización de gen de *amdS* de *A. nidulans* como marcador selectivo se describe en Kelley et al., (1985) EMBO J. 4:475 - 479 y Penttilä et al., (1987) Gene 61:155-164.

10 [0087] Los métodos utilizados para unir la construcción de ADN que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una glucoamilasa, un promotor, un terminador y otras secuencias y para insertarlas en un vector adecuado son conocidos en la técnica. La unión se realiza en general mediante la unión en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se utilizan adaptadores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica convencional. (Véase, Sambrook (1989) supra, y Bennett y Lasure, MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press, San Diego (1991) pp 70 - 76.). Adicionalmente, los vectores se pueden construir utilizando técnicas de recombinación conocidas (por ejemplo, invitrogen Life Technologies, Gateway Technology).

25 Células huésped

[0088] En el presente documento se describen células huésped que comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima de la invención, que se utilizan en la producción de las composiciones de la invención. Las células huésped preferidas son células fúngicas filamentosas y el término célula huésped incluye las células, la progenie de las células y protoplastos creados a partir de las células de una cepa fúngica filamentosa.

30 [0089] El término "hongos filamentosos" se refiere a todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycotina (Véase, Alexopoulos, C. J. (1962), INTRODUCTORY MYCOLOGY, Wiley, New York). Estos hongos están caracterizados por un micelio vegetativo con una pared celular compuesta de quitina, celulosa y otros polisacáridos complejos. Los hongos filamentosos de la presente invención son morfológicamente, fisiológicamente y genéticamente diferentes de las levaduras. El crecimiento vegetativo por hongos filamentosos es mediante elongación hifal y el catabolismo del carbono es obligatoriamente aeróbico. La célula parental fúngica filamentosa puede ser una célula de una especie de, pero sin limitación, *Trichoderma*, (por ejemplo, *Trichoderma reesei*, la forma asexual de *Hypocrea jecorina*, *T. longibrachiatum*, *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma harzianum*), *Penicillium sp.*, *Humicola sp.* (por ejemplo, *H. insolens*, *H. lanuginosa* y *H. grisea*); *Chrysosporium sp.* (por ejemplo, *C. lucknowense*), *Gliocladium sp.*, *Aspergillus sp.* (por ejemplo, *A. oryzae*, *A. niger*, *A. nidulans*, y *A. awamori*), *Fusarium sp.*, (por ejemplo *F. gramineum* y *F. venenatum*), *Neurospora sp.*, *Hypocrea sp.*, *Mucor*, y *Emericella sp.* (Véase también, Innis et al., (1985) Sci. 228:21 -26). El término "*trichoderma*" o "*Trichoderma sp.*" Se refieren a cualquier género fúngico previamente o actualmente clasificado como *Trichoderma*. La célula huésped puede ser una célula huésped modificada genéticamente donde se han inactivado genes nativos, por ejemplo mediante delección. Cuando se desee obtener una célula huésped fúngica que tenga uno o más genes inactivados, se pueden utilizar métodos conocidos (por ejemplo, métodos descritos en la Patente de Estados Unidos No. 5,246,853, Patente de Estados Unidos No. 5,475,101 y WO92/06209). La desactivación génica se puede realizar mediante la delección completa o parcial, mediante desactivación por inserción o mediante cualquier otro medio que hace que un gen sea no funcional para su objetivo pretendido (de manera que se evita que el gen exprese una proteína funcional). Se puede eliminar cualquier gen de una *Trichoderma sp.* u otro huésped fúngico filamentoso que se ha clonado. Si la célula huésped es una célula de *Trichoderma* y particularmente células huésped de *T. reesei*, los genes *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl2* se pueden desactivar y preferiblemente eliminar. Las células huésped de *Trichoderma reesei* particularmente preferidas que tienen proteínas con quad eliminado se establecen y describen en la Patente de Estados Unidos 5,847,276 y WO 05/001036.

55 Transformación de células huésped

60 [0090] La introducción de una construcción o vector de ADN en una célula huésped incluye técnicas, tales como la transformación; electroporación; microinyección nuclear; transducción; transfección, (por ejemplo, transfección mediada por lipofección y transfección mediada por DEAE-Dextrina); incubación con precipitado de ADN con fosfato de calcio; bombardeo a alta velocidad con microproyectiles recubiertos de ADN; y fusión de protoplastos. Las técnicas generales de transformación se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel et al., (1987), supra, capítulo 9; y Sambrook (1989) supra, y Campbell et al., (1989) Curr. Genet. 16:53-56). La expresión de proteína heteróloga en *Trichoderma* se describe en la Patente de Estados Unidos 6,022,725; Patente de Estados Unidos 6,268,328; Harkki et al. (1991); Enzyme Microb. Technol. 13:227-233; Harkki et al., (1989) Bio Technol. 7:596-603;

EP 244,234; EP 215,594; y Nevalainen et al., "The Molecular Biology of Trichoderma and its Application to the Expression of Both Homologous and Heterologous Genes", en MOLECULAR INDUSTRIAL MYCOLOGY, Eds. Leong and Berka, Marcel Dekker Inc., NY (1992) pp. 129 -148). También se hace referencia a Cao et al., (2000) Sci. 9:991 - 1001 y EP 238 023 para la transformación de cepas de *Aspergillus* y WO96/00787 para la transformación de cepas de *Fusarium*.

[0091] Preferiblemente, se construyen transformantes genéticamente estables con sistemas de vectores mediante los cuales el ácido nucleico que codifica la glucoamilasa está integrado de manera estable en un cromosoma de la cepa huésped. A continuación, los transformantes se purifican mediante técnicas conocidas. En un ejemplo no limitante, los transformantes estables, incluyendo un marcador *amdS*, se diferencian de los transformantes inestables por su mayor velocidad de crecimiento y la formación de colonias circulares con un perfil liso, en lugar de irregular, en el medio de cultivo sólido que contiene acetamida. Adicionalmente, en algunos casos, se realiza un test adicional de estabilidad mediante el crecimiento de los transformantes en un medio sólido no selectivo (es decir, $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ (5 mg/mL) como fuente de nitrógeno), la recogida de esporas de este medio de cultivo y la determinación del porcentaje de estas esporas que posteriormente germinan y crecen en un medio selectivo que contiene acetamida 10 mM como única fuente de nitrógeno. Alternativamente, se pueden utilizar otros métodos conocidos en la técnica para seleccionar transformantes.

[0092] La preparación de *Trichoderma sp.* para la transformación puede implicar la preparación de protoplastos de micelios fúngicos (véase, Campbell et al., (1989) Curr. Genet. 16:53-56). También se conoce la transformación mediada por *agrobacterium tumefaciens* de hongos filamentosos (véase, de Groot et al., (1998) Nat. Biotechnol. 16:839 - 842).

[0093] Los micelios se pueden obtener a partir de esporas vegetativas germinadas. Los micelios se tratan con una enzima que digiere la pared celular dando lugar a protoplastos. A continuación, los protoplastos se protegen por la presencia de un estabilizante osmótico en el medio en suspensión. Estos estabilizantes incluyen sorbitol, manitol, cloruro de potasio, sulfato de magnesio y similares. Normalmente la concentración de estos estabilizantes varía entre 0,8 M y 1,2 M. Es preferible utilizar aproximadamente una solución 1,2 M de sorbitol en el medio en suspensión. La captación de ADN en la cepa huésped de *Trichoderma sp.* depende de la concentración de ion calcio. En general, se utiliza entre aproximadamente 10 mM de CaCl_2 y 50 mM de CaCl_2 en una solución de captación. También se hace referencia a la Patente de Estados Unidos 6,022,725 y la Patente de Estados Unidos 6,268,328 para procedimientos de transformación utilizados con huéspedes fúngicos filamentosos.

[0094] En el presente documento se describen métodos de producción recombinante de la glucoamilasa que comprende expresar un polinucleótido que codifica una glucoamilasa de la invención en una célula huésped fúngica filamentososa y cultivar la célula huésped bajo condiciones adecuadas para la producción de la glucoamilasa y opcionalmente recuperar la glucoamilasa.

[0095] Las células fúngicas se pueden cultivar bajo condiciones adecuadas en cultivo con matraces de agitación, en fermentaciones a pequeña y gran escala (incluyendo fermentación continua, por lotes y alimentación por lotes) en fermentadores de laboratorio o industriales, con un medio adecuado que contiene sales fisiológicas y nutrientes (véase, por ejemplo, Pourquie, J. et al., BIOCHEMISTRY AND GENETICS OF CELLULOSE DEGRADATION, eds. Aubert, J. P. et al., Academic Press, pp. 71-86, 1988 e Ilmen, M. et al., (1997) Appl. Environ Microbiol. 63:1298-1306). Los medios preparados comercialmente habituales (por ejemplo, caldo de Extracto de Malta de Levadura (YM), caldo de Luria Bertano (LB) y caldo de Dextrosa Sabouraud (SD)) son útiles en la presente invención. Las condiciones de cultivo preferidas para un hongo filamentososo determinado son conocidas en la técnica y se pueden hallar en la literatura científica y/o a partir de la fuente de los hongos, tales como la American Type Culture Collection y Fungal Genetics Stock Center. En los casos en los que la secuencia codificante de la glucoamilasa se encuentra bajo el control de un promotor inducible, se añade el agente inductor (por ejemplo, un azúcar, una sal metálica o un antimicrobiano) al medio en una concentración efectiva para inducir la expresión de glucoamilasa.

[0096] A efectos de evaluar la expresión de un glucoamilasa por una línea celular que ha sido transformada con un polinucleótido que codifica una enzima comprendida por la invención, se pueden realizar ensayos a nivel de proteína, a nivel de ARN y/o mediante la utilización de bioensayos bifuncionales particulares a la actividad y/o producción de glucoamilasa. Algunos de estos ensayos incluyen transferencia Northern, transferencia por "puntos" ("dots") (análisis de ADN o ARN), RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa), o hibridación in situ, utilizando una sonda marcada apropiadamente (en base a la secuencia codificante de ácido nucleico) y transferencia Southern convencional y autorradiografía.

[0097] Además, la producción y/o expresión de una glucoamilasa se puede medir en una muestra de manera directa, por ejemplo, mediante ensayos midiendo directamente azúcares reductores, tales como glucosa, en el medio de cultivo y mediante ensayos para medir la actividad, expresión y/o producción de glucoamilasa. En particular, la actividad de glucoamilasa se puede analizar mediante el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Véase, Goto et al., (1994) Biosci. Biotechnol. Biochem. 58:49 - 54). La expresión de proteína se puede evaluar mediante métodos inmunológicos, tales como la tinción inmunohistoquímica de células, secciones de tejido o inmunoensayo de medio de cultivo tisular (por ejemplo, mediante transferencia Western o ELISA). Dichos inmunoensayos se pueden utilizar

para evaluar cualitativa y cuantitativamente la expresión de una glucoamilasa. Los detalles de dichos métodos son conocidos por los expertos en la materia y muchos reactivos para realizar dichos métodos están disponibles comercialmente.

5 [0098] Las enzimas contenidas en la composición de la presente invención se pueden recuperar o purificar a partir del medio de cultivo mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo centrifugación, filtración, extracción, precipitación y similares.

Usos y composiciones

10 [0099] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden glucoamilasas y métodos de utilización de la composición en aplicación industrial y comercial tal como se describe en las reivindicaciones. Ejemplos no limitantes, que incluyen el uso de glucoamilasas comprendidas por la invención en aplicaciones industriales y comerciales, se describen brevemente a continuación.

15 [0100] Las composiciones de enzimas se pueden utilizar en composiciones hidrolizantes y sacarificantes de almidón, composiciones de limpieza y detergentes (por ejemplo, detergentes de lavandería, detergentes para el lavado de platos, composiciones de limpieza de superficies duras), y en composiciones de alimentación de animales. Además, las composiciones de enzimas se pueden utilizar en aplicaciones de panadería, tales como producción de pan y pasteles, elaboración de cerveza, asistencia sanitaria, textil, procesos de conversión de desechos medioambientales, procesado de biopulpa y aplicaciones de conversión de biomasa.

20 [0101] En particular, las composiciones de enzimas se pueden utilizar para procesos de conversión de almidón, y particularmente en la producción de dextrosa para jarabes de fructosa, azúcares especializados y en la producción de alcohol y otros productos finales (por ejemplo, ácido orgánico, ácido ascórbico y aminoácidos) a partir de la fermentación de sustratos que contienen almidón (G.M.A van Beynum et al., Eds, (1985) STARCH CONVERSION TECHNOLOGY, Marcel Dekker Inc. NY). Las dextrinas producidas utilizando las composiciones de enzimas de la invención pueden dar lugar a rendimientos de glucosa de por lo menos el 80%, por lo menos 85%, por lo menos 90% y por lo menos 95%. La producción de alcohol a partir de la fermentación de sustratos de almidón utilizando composiciones de enzimas de la invención puede incluir la producción de alcohol como combustible o alcohol circulante.

25 [0102] Las glucoamilasas de la invención pueden ser útiles en la hidrólisis de almidón de varios sustratos de base vegetal que se utilizan para la producción de alcohol. Los sustratos de base vegetal pueden incluir maíz, trigo, cebada, centeno, sorgo, arroz, caña de azúcar y combinaciones de los mismos. El sustrato de base vegetal puede ser material vegetal fraccionado, por ejemplo, un grano de cereal, tal como maíz, que se fracciona en componentes, tales como fibra, germen, proteína y almidón (endosperma) (Patente de Estados Unidos 6,254,914 y Patente de Estados Unidos 6,899,910). Los métodos de fermentaciones de alcoholes se describen THE ALCOHOL TEXTBOOK, A REFERENCE FOR THE BEVERAGE, FUSEL AND INDUSTRIAL ALCOHOL INDUSTRIES, 3rd Ed., Eds K.A. Jacques et al., 1999, Nottingham University Press, UK. El alcohol puede ser etanol. En particular, los procesos de producción de fermentación de alcohol se caracterizan como procesos de molienda en húmedo o en seco. Las composiciones se pueden utilizar en un proceso de fermentación de molienda en húmedo o un proceso de molienda en seco.

35 [0103] La molienda del grano seco implica una serie de etapas básicas, que en general incluyen; molienda, cocción, licuación, sacarificación, fermentación y separación de líquidos y sólidos para producir alcohol y otros coproductos. Se tritura el material vegetal y particularmente los granos de cereales completos, tales como maíz, trigo o centeno. En algunos casos, el grano se puede fraccionar en primer lugar en partes componentes. El material vegetal triturado se puede moler para obtener una partícula gruesa o fina. El material vegetal triturado se mezcla con un líquido en un tanque de emulsión. La emulsión se somete a temperaturas elevadas en una cocina por inyección junto con enzimas licuantes (por ejemplo, alfa amilasas) para solubilizar e hidrolizar el almidón en el cereal hasta dextrinas. La mezcla se enfría y posteriormente se trata con enzimas sacarificantes, tales como glucoamilasas comprendidas por la presente invención, para producir glucosa. A continuación, el puré que contiene glucosa se fermenta durante aproximadamente 24 a 120 horas en presencia de microorganismos de fermentación, tales como microorganismo que produce etanol, y particularmente levadura (*Saccharomyces spp*). Los sólidos en el puré se separan de la fase líquida y se obtiene alcohol, tal como etanol y coproductos útiles, tales como granos residuales.

40 [0104] La etapa de sacarificación y la etapa de fermentación se pueden combinar y el proceso se refiere como sacarificación y fermentación simultáneas o sacarificación, propagación de levadura y fermentación simultáneas.

45 [0105] En algunas realizaciones, se puede eliminar la etapa de cocción del sustrato que contiene almidón a temperaturas por encima de la temperatura de gelatinización del almidón en el sustrato. Estos procesos de fermentación pueden incluir la molienda de un grano de cereal o un grano fraccionado y la combinación del grano de cereal triturado con líquido para formar una emulsión que, a continuación, se mezclan en un único recipiente con una composición según la invención y opcionalmente otras enzimas, tales como, pero sin limitación, otras alfa amilasas,

oras glucoamilasas y enzimas que tienen actividad hidrolizante del almidón granular y levadura para producir etanol y otros coproductos (Patentes de Estados Unidos 4,514,496, WO 04/081193 y WO 04/080923).

5 [0106] En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un método de sacarificación de una solución de almidón líquido, que comprende una etapa de sacarificación enzimática utilizando una composición de la presente invención.

10 [0107] Se puede obtener una composición de enzimas comprendidas por la invención en medios de cultivo o se pueden recuperar y purificar del medio de cultivo y se pueden utilizar opcionalmente en combinación con alguna o una combinación de las siguientes enzimas - alfa amilasas, proteasas, pululaninas, isoamilasas, celulasas, hemicelulasas, xilanasas, ciclodextrin glicos transferasas, lipasas, fitasas, lacasas, oxidasas, esterases, cutinasas, xilanasas, enzima hidrolizante de almidón granular y otras glucoamilasas.

15 [0108] Las composiciones de la presente invención comprenden glucoamilasas combinadas con alfa amilasas, tales como alfa amilasas fúngicas (por ejemplo *Aspergillus* sp.) o alfa amilasas bacterianas (por ejemplo, *Bacillus* sp., tales como *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*) y variants de las mismas. Tal como se describe en la reivindicación 1, la alfa amilasa será una alfa amilasa que tiene por lo menos un 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad en la secuencia con la secuencia de la proteína madura de SEC ID NO: 27. Las alfa amilasas disponibles comercialmente para utilizar en las composiciones de la invención son conocidas e incluyen GZYME G997, SPEZYME FRED, SPEZYME EHTYL (Genencor International Inc.) y TERMAMYL 120-L y SUPRA (Novozymes, Biotech.).

25 [0109] Las composiciones de la presente invención se puede combinar con otra glucoamilasa, por ejemplo una o más glucoamilasas derivadas de cepas de *Aspergillus* o variants de las mismas, tales como *A. oryzae*, *A. niger* (por ejemplo, la secuencia de proteína madura de la figura 20(A), *A. kawachi*, y *A. awamori*; glucoamilasas derivadas de cepas de *Hemicella* o variantes de las mismas, particularmente, particularmente *H. grisea*, tal como la glucoamilasa que tiene por lo menos un 90%, 93%, 95%, 96%, 97%, 98% y 99% de identidad en la secuencia con la SEC ID NO: 3 descrita en WO 05/052148; glucoamilasas derivadas de cepas de *Talaromyces* o variantes de las mismas, particularmente *T. emersonii*; y glucoamilasas derivadas de cepas de *Athelia* y particularmente *A. rolfsii*.

30 MATERIAL Y MÉTODOS

[0110] En la sección de descripción y experimental siguiente se aplican las siguientes abreviaturas:

35 [0111] TrGA (una composición de glucoamilasas de *Trichoderma reesei*, la proteína madura que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 4); AkAA (una composición de alfa amilasas de *Aspergillus kawachi* que tiene la proteína madura de la secuencia SEC ID NO: 27); AnGA (DISTILLASE que comprende una GA de *Aspergillus niger* (Genencor International Inc.)); GA (glucoamilasa); GAU (unidad de glucoamilasa); AAU (unidad de alfa amilasa); % (porcentaje en peso); °C (grados centígrados); rpm (revoluciones por minuto); H₂O (agua); dH₂O (agua desionizada); dH₂O (agua desionizada, filtración Milli-Q); aa o AA (aminoácidos); pb (pares de bases); kb (pares de kilobases); kD o kDa (kilodaltons); g o gm (gramos); µg (microgramos); mg (miligramos); µL (microlitros); ml y mL (mililitros); mm (milímetros); µm (micrómetros); M (molar); mM (milimolar); µM (micromolar); U (unidades); V (voltios); PM (peso molecular); s (segundos); min(s) (minuto/minutos); hr(s) (hora/horas); DO (oxígeno disuelto); y EtOH (etanol).

45 [0112] Se utilizan los siguientes ensayos y métodos en los ejemplos proporcionados a continuación:

1) Ensayo de GA – ensayo de Glucoamilasa: Se midió la actividad de glucoamilasa utilizando un ensayo conocido que se basa en la capacidad de la glucoamilasa de catalizar la hidrólisis de p-nitrofenil-alfa-D-glucopiranosido (pNPG) en glucosa y p-nitrofenol. A un pH alcalino, el nitrofenol forma un color Amarillo que es proporcional a la actividad de glucoamilasa y se monitoriza a 400nm y se compara frente a una enzima estándar medida como GAU (Elder, M. T. y Montgomery R. S., Glucoamylase activity in industrial enzyme preparations using colorimetric enzymatic method, Journal of AOAC International, vol. 78(2), 1995). Un GAU se define como la cantidad de enzima que producirá 1 g de azúcar reductor calculada como glucosa por hora a partir de sustrato de almidón soluble (4% ds) a pH 4,2 y 60°C.

2) Cebadores y protocolo PCR para la amplificación de genes de cepas de *Trichoderma/Hypocrea*:

Trichoderma/Hypocrea GA - gen	Cebador	Secuencia específica del gen	SEC ID NO:
<i>Trichoderma reesei</i>	NSP231F	ATGCCCGCCTTCGCCATGGACC	23
	NSP232R	TTACGACTGCCAGGTGTCCTCC	24
	NSP233F	ATGCACGTCCTGTCTGACTGCGG	25

Componente	μ l
Cebador directo (10 μ M)	1
Cebador inverso (10 μ M)	1
ADN genómico de plantilla	5
DNTP (10 m)	1
Tampón HiFi	5
MgSO ₄ (50mM)	2
ADN polimerasa - Platinum Taq Polymerase High Fidelity (Invitrogen, cat. No. 11304-029 0.5	0,5
Agua Milli-Q, estéril	34,5

Con respecto al programa de PCR, la desnaturalización inicial fue de 2 min, a 94°C durante 1 ciclo; desnaturalización 30 s, a 94°C, hibridación durante 30 s, a 55°C y extensión durante 2 min a 68°C durante 30 ciclos y una etapa final de extensión de 7 min a 68°C.

3) Determinación de etanol y carbohidratos

La composición de etanol y carbohidratos de las muestras se determinó utilizando el método de HPLC tal como se ha descrito en el presente documento:

- se llenó un tubo de centrifuga Eppendorf de 1,5 mL con fermento o cerveza y se enfrió en hielo durante 10 min;
- el tubo de muestra se centrifugó durante 1 min en una centrifuga de mesa Eppendorf;
- se transfirió una muestra de 0,5 mL del sobrenadante a un tubo de ensayo que contenía 0,05 mL de solución Kill (H₂SO₄ 1,1 N) y se dejó reposar durante 5 min;
- se añaden 5,0 mL de agua a la muestra del tubo de ensayo y a continuación se filtra en un vial de HPLC a través de un Filtro de Jeringa de Nylon de 0,45 μ m; y
- se desarrolla la HPLC.

20 Condiciones de HPLC

[0113]

a) Sistema de etanol: Columna: Columna de ácido orgánico Phenomenex Rezex (RHM-Monosacárido) #OOH 0132-KO (Equivalente a Bio-Rad 87H); Temperatura de columna: 60°C; Fase móvil: H₂SO₄ 0,01 N; Velocidad de flujo: 0,6 mL/min;

Detector: RI; y Volumen de inyección: 20 μ L.

b) Sistema de carbohidratos: Columna: Carbohidrato Phenomenex Rezex (RCM-Monosacárido) #00H-0130-KO (Equivalente a Bio-Rad 87H); Temperatura de columna: 70°C ; Fase móvil: H₂O DI Nanopura, Velocidad de flujo: 0.8 mL/min;

Detector: RI; Volumen de inyección: 10 PL (3% material DS)

[0114] La columna se separa en base al peso molecular de los sacáridos, que se designan como DP-1 (monosacáridos); DP-2 (disacáridos); DP-3 (trisacáridos) y DP > 3 (azúcares oligosacáridos que tiene un grado de polimerización superior a).

4) Test de yodo de almidón residual: se centrifuga una muestra de la cerveza (caldo de fermentación) en tubos de centrifuga de plástico de 2 ml. El sobrenadante se decantó y el tubo que contenía el residuo se colocó en un baño de hielo. Se añadieron varias gotas de una solución de yodo 0,025 N (yodo 0,1 N de VWR Cat. No. VW3207-1 diluido 4 veces) al residuo y se mezclaron. Un almidón positivo (+) muestra un rango de color desde azul a violeta y la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de almidón. Un resultado negativo (-) permanece amarillento.

5) Determinación del contenido total de almidón: Se utilizó el proceso de licuación y sacarificación del almidón enzima-enzima (método enzimático dual) para determinar el contenido total de almidón. En un análisis habitual, se tomaron 2 g de la muestra seca en un matraz de 100 ml de Kohlrausch y se añadieron 45 ml de tampón MOPS, pH 7,0. La mezcla se agitó durante 30 minutos. Se añadió 1,0 ml de SPEZYME FRED (diluido en agua 1:50), y se calentó hasta ebullición durante 3-5 min. El matraz se colocó en un autoclave mantenido a 121°C durante 15 min. Después del autoclave, el matraz se colocó en un baño de agua a 95°C y se añadió 1 ml de SPEZYME FRED diluido 1:50 y se incubó durante 45 min. El pH se ajustó a pH 4,2 y la temperatura se redujo hasta 60°C. A continuación, se añadieron 20 ml de tampón acetato, pH 4,2. La sacarificación se llevó a cabo añadiendo 1,0 ml de OPTIDEX L-400 diluido 1:100 (Glucoamilasa de Genencor International Inc.) y la incubación continuó durante 18 horas a 60°C. La reacción enzimática se terminó calentando a 95°C durante 10 min. La composición de azúcares total se determinó mediante análisis HPLC utilizando glucosa como patrón. El hidrolizado de almidón soluble de la extracción con agua de una muestra a temperatura ambiente sin tratamiento enzimático se restó del azúcar total.

6) **Análisis de proteína total:** Se determinó el nitrógeno (N) total en las preparaciones de muestras utilizando el método Kjeldhal (American Assoc. Cereal Chemists (AACC), (1983), Methods 22B60 8th Ed. St Paul, MN). El contenido de proteína se calculó mediante $6,25 \times N$ total.

5 EJEMPLOS

[0115] Se proporcionan los siguientes ejemplos a efectos de demostrar e ilustrar adicionalmente ciertas realizaciones preferidas y aspectos de la presente invención y no debe interpretarse como limitantes del alcance de la misma.

Ejemplo 1- Aislamiento y clonación de la TrGa

[0116] El ADN cromosómico de QM6a de *Trichoderma reesei* se aisló de masa micelial de un cultivo líquido en Caldo de Dextrosa de Patata (Difco™ Cat. No. 254920) utilizando el BIO101 Fast Prep® System según el método descrito por el suministrador (Qbiogene). El ADN se purificó utilizando una columna Quick Spin (Qiagen art No. 28106). El gen de glucoamilasa se aisló utilizando cebadores con secuencias específicas de GA, NSP232R (SEC ID NO: 24) y NSP233F (SEC ID NO: 25) diseñados según la secuencia de nucleótidos prevista en la base de datos del genoma de *Trichoderma reesei* del Department of Energy (DOE) copropiedad con Genome Institute. Los cebadores se flanquearon en el extremo 5' por secuencias attB Gateway® (Invitrogen). El ADN cromosómico de QM6a de *T. reesei* se utilizó como plantilla.

[0117] La mezcla de PCR contenía los siguientes componentes: cebador directo (10 μ M) 4 μ l; cebador inverso (10 μ M) 4 μ l; ADN plantilla (500ng/ μ L) 1 μ L; mezcla de dNTP (10 mM) 2 μ L; 10 veces tampón Cx 10 μ L, y ADN polimerasa Cx Hotstart PfuTurbo® 0,5 μ L (Stratagen Cat. No. 600410). Se añadió agua desionizada hasta un volumen total de 100 μ L.

[0118] El protocolo PCR fue el siguiente: desnaturalización inicial durante 30 s a 98°C, desnaturalización, hibridación y extensión en 30 ciclos de 10 s a 98°C; 30 s a 68°C; 45 s a 72°C, respectivamente, y una etapa de extensión final de 10 min a 72°C.

[0119] Los fragmentos de PCR se analizaron mediante electroforesis en agarosa al 1%. Los fragmentos del tamaño esperado se aislaron utilizando el Kit de Purificación por Extracción en Gel (Qiagene Cat. no. 28706). Los fragmentos de PCR se clonaron en el vector pDONR201 de Gateway® Entry y se transformaron en células Max Efficiency de *E. coli* DH5alfa (Invitrogen Cat.No. 18258012). Se determinó la secuencia de nucleótidos del ADN insertado, a partir de la cual se dedujo la secuencia de ADN genómico del gen de TrGA (figura 1 (SEC ID NO: 1)).

Ejemplo 2 – Transformación de *T. reesei* y fermentación/expresión de la TrGA

[0120] El ADN vector que contenía la secuencia del gen de GA correcta se recombinó en el vector de expresión de *T. reesei* pTrex3g (figura 17).

[0121] El vector pTrex3g se basa en el vector pSL1180 de *E. coli* (Pharmacia Inc., Piscataway, NJ) que es un vector de base fagémido pUC118 (Brosius, J. (1989), DNA 8:759) con un sitio de clonación múltiple extendido que contiene 64 secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción en hexámeros: se diseñó como vector de destino Gateway (Hartley et al., (2000) Genome Research 10:1788 -1795) para permitir la inserción utilizando la tecnología Gateway (Invitrogen) de cualquier marco de lectura abierto deseado entre las regiones del promotor y el terminador del gen *cbh1* de *T. reesei*. También contiene el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* para utilizar como marcador selectivo en la transformación de *T. reesei*. Los detalles del vector pTrex3g son los siguientes (Figura 17A). El vector tiene un tamaño de 10,3 kb. Los siguientes fragmentos de ADN se encuentran insertados en la región poliadaptadora de pSL1180: a) un segmento de 2,2 pb de ADN de la región de promotor del gen *cbh1* de *T. reesei*; b) el cassette A del marco de lectura de Gateway adquirido de Invitrogen que incluye los sitios de recombinación attR1 y attR2 en cualquier extremo que flanquea el gen de resistencia a cloramfenicol (CmR) y el gen *ccdB*; c) un segmento de ADN de 336 pb de la región del terminador del gen *cbh1* de *T. reesei*; y d) un fragmento de ADN de 2,7 kb de ADN que contiene el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* con sus regiones promotor y terminador.

[0122] El vector de expresión que contiene el gen de GA de *T. reesei*, pNSP23 (figura 17) se transformó en una cepa huésped de *T. reesei* derivada de RL-P37 (IA52) y que tiene varias deleciones en los genes (Δ cbh1, Δ cbh2, Δ ea1, Δ eg2) utilizando bombardeo de partículas mediante el sistema PDS-1000/Helium System (BioRad Cat. No. 165-02257). El protocolo se indica a continuación y se hace también referencia a los ejemplos 6 y 11 de WO 05/001036.

[0123] Se preparó una suspensión de esporas (aproximadamente 5×10^8 esporas/ml) de una cepa con quad eliminado de *T. reesei*. Se extendieron 100 μ l-200 μ l de una suspensión de esporas sobre el centro de placas de medio acetamida con Medio Mínimo (MM). El medio acetamida con MM tenía las siguientes composiciones: acetamida 0,6 g/L; CsCl 1,68 g/L; glucosa 20 g/L; KH₂PO₄ 20 g/L; CaCl₂ 2H₂O 0,6 g/L; 1 m1/L 1000X solución de

elementos traza; agar Noble 20 g/L; y pH 5,5. La solución de elementos traza 1000X contenía FeSO₄ 7H₂O 5,0 g/L; MnSO₄ 1,6 g/L; ZnSO₄ 7H₂O 1,4 g/L y CoCl₂ 6H₂O 1,0 g/L. La suspensión de esporas se dejó secar en la superficie del medio de acetamida con MM.

5 **[0124]** La transformación siguió las instrucciones de los fabricantes. Brevemente, se colocaron en un tubo de microcentrífuga partículas de tungsteno M10. Se añadió 1 mL de etanol y se dejó reposar durante 15 segundos. Las partículas se centrifugaron a 15.000 rpm durante 15 segundos. Se extrajo el etanol y las partículas se lavaron tres veces con dH₂O estéril antes de añadir 250 µL de glicerol estéril (v/v) al 50%. Se colocaron 25 µL de una suspensión de partículas de tungsteno en un tubo de microcentrífuga. Mientras se agitaba de forma continua, se añadió lo siguiente: 5 µl (100 - 200 ng/µl) de ADN plasmídico, 25 µl de CaCl₂ 2,5 M y 10 µl de espermidina 0,1M. Las partículas se centrifugaron durante 3 segundos. Se extrajo el sobrenadante y las partículas se lavaron con 200 µl de etanol al 100% y se centrifugaron durante 3 segundos. Se extrajo el sobrenadante, se añadieron 24 µl de etanol al 100% y se mezclaron mediante pipeteo, a continuación se extrajeron alícuotas de partículas de 8 µl y se colocaron sobre el centro de discos macroportadores que se encontraban en un desecador. Una vez la solución de tungsteno/ADN se había secado, el disco macroportador se colocó en la cámara de bombardeo junto con la placa de acetamida con MM con esporas y el proceso de bombardeo se realizó según las instrucciones del fabricante. Después del bombardeo de las esporas en placas con las partículas de tungsteno/ADN, las placas se incubaron a 30°C. Las colonias transformadas se transfirieron a placas de medio acetamida con MM recién preparado y se incubaron a 30°C.

20 Ejemplo 3 – Demostración de la actividad de GA a partir de la TrGA expresada en células transformadas

25 **[0125]** Después de 5 días de crecimiento en placas de acetamida con MM los transformantes que muestran una morfología estable se inocularon en matraces de agitación de 250 ml que contenían 30 ml de medio Proflo (medio Proflo contenía: α-lactosa 30 g/L; (NH₄)₂SO₄ 6,5 g/L; KH₂PO₄ 2 g/L; MgSO₄ 7H₂O 0,3 g/L; CaCl₂ 0,2 g/L; 1000X solución de sales de elementos traza 1 ml/L; 2 ml/L de Tween 80 al 10%; harina de semilla de algodón ProFlo 22,5 g/L (Traders protein, Memphis, TN); CaCO₃ 0,72 g/L. Después de dos días de crecimiento a 28°C y 140 rpm, se transfirió un 10% de cultivo Proflo a un matraz de agitación de 250 ml que contenía 30 ml de Medio Definido de Lactosa. La composición del Medio Definido de Lactosa fue la siguiente: (NH₄)₂SO₄ 5 g/L; tampones PIPPS 33 g/L; casaminoácidos 9 g/L; KH₂PO₄ 4,5 g/L; MgSO₄ 7H₂O 1,0 g/L; antiespumante Mazu DF60-P 5 ml/L (Mazur Chemicals, IL); 1000X de solución de elementos traza; pH 5,5; se añadieron 40 ml/L de solución de lactosa al 40% (p/v) al medio después de la esterilización. Los matraces de agitación con Medio Definido de Lactosa se incubaron a 28°C, 140 rpm durante 4 - 5 días.

35 **[0126]** Se extrajo el micelio mediante centrifugación y se analizó el sobrenadante por la proteína total (Kit de Ensayo de Proteínas BCA, Pierce Cat. No. 23225) y la actividad de GA utilizando pNPG como sustrato (Sigma N-1377).

40 **[0127]** Las muestras de sobrenadante de cultivo se mezclaron con un volumen apropiado de 2 veces el tampón de carga de muestra con agente reductor y se determinó el perfil de proteína mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) utilizando el Gel Bis-Tris al 10% Novex NuPAGE® con Tampón de desarrollo MES SDS. Los geles se tiñeron con SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

45 **[0128]** En el análisis con SDS-PAGE, una banda de proteína que no se observaba en el sobrenadante de la cepa con quad eliminada se observó en el sobrenadante de algunos transformantes con el vector pTrex3g que contenía el marco de lectura abierto de la glucoamilasa (Figura 16). Esta nueva banda de proteína presentaba un peso molecular aparente de aproximadamente 64 kDa. Este resultado confirma que la TrGA se secreta al medio.

50 Ejemplo 4 – Caracterización bioquímica del producto génico de GA

55 **[0129]** Los transformantes productores de GA se desarrollaron en una escala de 4 L. El filtrado de cultivo se concentró utilizando una unidad de ultra filtración con un límite de peso molecular nominal de 10.000 Da (Pall Omega Centramate OS010c10). La preparación cruda de enzimas se purificó mediante un procedimiento de 2 etapas utilizando un Sistema ÄKTA explorer 100 FPLC (Amersham Biosciences). Se equilibró una columna HiPrep 16/10 FF Q-Sepharosa (Amersham BioSciences Cat. No. 17-5190-01) con Tris 25 mM pH 8,0 y se eluyó la proteína de la columna con NaCl 100 mM en Tris 25 mM pH 8,0. Se realizó una segunda etapa de afinidad utilizando una resina Cbind 200 (Novagen Cat. No. 701212-3) y Tris 50 mM pH 7,0 que contenía NaCl 500 mM como tampón de elución (figura 16). El extremo N-terminal del producto génico (Ser-Val-Asp-Asp-Phe-Ile) (SEC ID NO: 38) se determinó mediante la degradación de Edman (Edman, P. (1956) Acta Chem Scand 10:761-768).

60 **[0130]** Los perfiles de pH y temperatura de la actividad de glucoamilasa del producto génico se determinaron utilizando 4-nitrofenil-α-D-glucopiranosido como sustrato (Elder, M. T. y Montgomery R. S., Glucoamylase activity in industrial enzyme preparations using colorimetric enzymatic method; Collaborative study Journal of AOAC International, vol. 78 (2), 1995) (figura 18).

65

Ejemplo 5 – Clonación por aislamiento de homólogos de glucoamilasa de cepas en el grupo de familias de Trichoderma/Hypocrea

[0131] Se aislaron tal como se describe en el ejemplo 1 preparaciones de AND cromosómico de las cepas (GA102) - *Hypocrea citrina* var. *americana* (CBS976.69); (GA104) - *Hypocrea vinosa* (CBS960.68); (GA105)-*Trichoderma* sp.; (GA107) - *Hypocrea gelatinosa* (CBS254.62); GA108 - *Hypocrea orientalis* (ATCC 90550); (GA109) - *Trichoderma konilangbra*; (GA103) - *Trichoderma harzianum* (CBS433.95); (GA113) - *Trichoderma* sp.; (GA124) - *Trichoderma longibrachiatum*; (GA127) - *Trichoderma asperellum* (ATCC 28020); y (GA128) - *Trichoderma strictipilis* (CBS 347.93). Los genes de GA de longitud completa se clonaron tal como se han descrito en el ejemplo 1 utilizando los cebadores específicos del gen de TrGA NSP231F (SEC ID NO: 23) y NSP232R (SEC ID NO: 24). Las secuencias de nucleótidos de las cepas se describen en la figura 4 para GA102 (SEC ID NO: 5); la figura 5 para GA104 (SEC ID NO: 7); la figura 6 para GA105 (SEC ID NO: 9); la figura 7 para GA107 (SEC ID NO: 11); la figura 8 para GA108 (SEC ID NO: 13); la figura 9 para GA109 (SEC ID NO: 15); la figura 10 para GA113 (SEC ID NO: 28); la figura 11 para GA103 (SEC ID NO: 30); la figura 12 para GA124 (SEC ID NO: 32); la figura 13 para GA127 (SEC ID NO: 34) y la figura 14 para GA128 (SEC ID NO: 36). Las secuencias de aminoácidos correspondientes se muestran en la figura 15. La tabla 2 establece el porcentaje de identidad de las secuencias de aminoácidos de la proteína madura de glucoamilasa de *T. reesei* glucoamilasa (figura 3B, SEC ID NO: 4) con los homólogos de glucoamilasa del grupo Hypocrea/Trichoderma.

Tabla 2 - % Identidad de homólogos de GA del grupo Hypocrea/Trichoderma

	GA 102	GA 103	GA 104	GA 105	GA 107	GA 108	GA 109	GA 113	GA 124	GA 127	GA 128	TrGA
GA102	100	86	86	84	87	84	84	83	84	87	85	84
GA103		100	98	90	96	90	91	86	90	98	90	90
GA104			100	91	97	91	90	86	91	99	90	91
GA105				100	90	95	93	83	94	91	94	95
GA107					100	90	90	86	90	98	90	90
GA108						100	94	84	98	91	94	97
GA109							100	83	94	91	94	94
GA113								100	84	86	83	84
GA124									100	91	94	98
GA127										100	91	91
GA128											100	94
TrGA												100

[0132] Las cepas de *T. reesei* que sobreexpresan GA se obtuvieron tal como se ha descrito en el ejemplo 2. Las preparaciones crudas de enzimas se obtuvieron tal como se ha descrito en el ejemplo 3 y la figura 19 muestra los geles obtenidos para algunos de los homólogos. La Tabla 3 establece la actividad de glucoamilasa de algunos de los homólogos.

Tabla 3

Cepa	Gen de:	Proteína total mg/mL	U GA/mL	Actividad específica
GA104	<i>H. vinosa</i>	2,76	37	13
GA105	<i>T. sp.</i>	2,77	26	9
GA107	<i>H. gelatinosa</i>	3,61	178	49
GA109	<i>T. konilangbra</i>	2,22	10	5
TrGA	<i>T. reesei</i>	3,89	91	23
huésped control	<i>T. reesei</i>	0,7	3	4

Ejemplo 6 – Producción de glucosa utilizando TrGA

[0133] Se produjo una emulsión DS al 32% de almidón de bolsas Cargill con agua de ósmosis inversa. El pH de la emulsión se ajustó a pH 5,8. La emulsión se filtró a través de un tamizador de malla 100 y se dosificó a 4,0 AAU/g de ds utilizando SPEZYME® ETHYL, (Genencor International, Inc.). A continuación, la emulsión se inyectó a 107,3°C durante 5 min (licuación primaria). La actividad de enzimas se determina mediante la velocidad de hidrólisis del almidón, según se refleja por la velocidad de disminución en la capacidad de tinción de yodo. Una unidad de AAU de actividad de alfa amilasa bacteriana es la cantidad de enzima requerida para hidrolizar 10 mg de almidón por minuto bajo condiciones específicas. Después de la licuación primaria, el producto de la licuación se recogió y se conoció en un baño de agua a 95°C durante 120 min (licuación secundaria). Se tomaron muestras a 30, 60, 90 y 120 min y se comprobó DE utilizando el método estándar de azúcares reductores Schoorls de la scorn Refiners Association. El producto de la licuación se puso en alícuotas de 100 g en tarros con tapa de rosca, el pH se ajustó a pH 4,5 y se equilibró a 60°C durante 15 minutos antes de la dosificación. La enzima TrGA se diluyó para añadir 0,2 ml de enzima diluida al tarro a 0,22 GAU/g ds. Después de la dosificación, el producto de la licuación se puso en alícuotas en 7

5 tubos de tapa de rosca, cada uno conteniendo aproximadamente 10 ml de material y se volvió a la temperatura designada. Los tubos se extrajeron en los intervalos de tiempo seleccionados (18, 24, 30, 42, 50 y 55 horas) y se analizaron mediante HPLC con sistema de Carbohidratos: Columna: Carbohidratos de Phenomenex Rezex (RCM-Monosacárido) #00H-0130-KO (Equivalente a Bio-Rad 87H); Temperatura de columna: 70°C; Fase móvil: H₂O DI Nanopura; Velocidad de flujo: 0,8 mL/min; Detector: RI; Volumen de inyección: 10 µL (3% de material DS) para la composición de azúcares.

Tabla 4 – Producción de glucosa a partir de almidón de maíz utilizando TrGA

Tratamiento (horas)	%DP1	%DP2	%DP3	%DP>3
18	80,66	2,60	0,66	16,08
24	84,25	2,31	0,46	12,98
30	86,26	2,66	0,47	10,61
42	88,85	3,05	0,40	7,69
50	89,93	3,26	0,42	6,39
55	90,64	3,36	0,37	5,62

10 Ejemplo 7 – Producción de etanol utilizando TrGA en un proceso de Sacarificación y Fermentación simultáneas (SSF)

15 **[0134]** Se obtuvo una muestra de producto de licuación de puré de maíz de un productor local de etanol y se diluyó hasta 29% de DS utilizando un “stillage” delgado. El pH de la emulsión se ajustó a pH 4,3 utilizando ácido sulfúrico 6 N. Se colocó una alícuota de 300 g del puré en un baño de agua a 31°C y se dejó equilibrar. Se añadió TrGA a la muestra (0,4 GAU/g de ds, que es igual a 1,08 kg/MT de ds). Después de la adición de enzima, se añadió a cada muestra 1 ml de una solución de 15 g de levadura Red Star Red (Lesaffre yeast Corp. Milwaukee, WI) en 45 ml de agua DI. Se tomaron muestras a 18, 26, 41 y 53 horas y se analizaron mediante HPLC. Columna: Columna de ácidos orgánicos Phenomenex Rezex (RHM- Monosacárido) #00H-0132-KO (Equivalente a Bio-Rad 87H); Temperatura de columna: 60°C; Fase móvil: NH₂SO₄ 0,01; Velocidad de flujo: 0,6 mL/min; Detector: RI; Volumen de inyección: 20 µL.

Tabla 5 – Producción de etanol mediante TrGA (0,4 GAU/g) en un proceso SSF

Muestra (horas)	%p/v DP>3	%p/v DP-3	%p/v DP-2	%p/v DP-1	%p/v ácido láctico	%p/v glicerol	%v/v EtOH
18	6,38	0,61	3,42	2,69	0,31	0,97	7,44
26	4,39	0,76	1,02	1,81	0,30	1,12	10,68
41	1,62	0,47	0,35	0,77	0,31	1,27	13,65
53	1,03	0,37	0,36	0,16	0,32	1,32	14,46

25 Ejemplo 8 – Proceso sin cocción para la producción de etanol utilizando TrGA

30 **[0135]** En general, se preparó una emulsión al 33% de harina de maíz (Azure Standard Farms) en agua DI a la que se añadieron 400 ppm de urea. El pH se ajustó a 4,5. Las fermentaciones se realizaron en matraces de 125 ml que contenían un puré de 100 g y varios tratamientos de GAU/g TrGA. Se preparó una emulsión al 20% de levadura seca Fali en agua y se mezcló con un baño de agua a 32°C una hora antes de inocular los fermentadores mediante la adición de 0,2 ml de la emulsión de levadura. Los matraces se colocaron en un baño de agua a 32°C y se mezcló el puré suavemente. Durante las fermentaciones, se extrajeron las muestras para un análisis HPLC. Las fermentaciones terminaron después de 72 horas. La producción de compuestos, incluyendo azúcares, ácido láctico, glicerol y etanol, en varios intervalos de muestreo, se muestra a continuación en varias tablas. El puré se secó a 60°C para obtener el DDGS, y se determinó el contenido en almidón de el DDGS mediante el método dual de enzimas.

40 A. Todas las condiciones fueron tal como se han descrito anteriormente: el tratamiento incluía 1,2 GAU/g TrGA.

[0136]

Tabla 6 – Producción de etanol

Tratamiento	Horas	%p/v DP>3	%p/v DP-3	%p/v DP-2	%p/v DP-1	%p/v ácido láctico	%p/v glicerol	%v/v EtOH
TrGA	17	0,68	0,05	0,04	0,00	0,04	0,41	4,70
TrGA	24	0,67	0,06	0,05	0,02	0,04	0,42	5,44
TrGA	41	0,65	0,07	0,00	0,00	0,05	0,44	6,78
TrGA	48	0,59	0,08	0,08	0,00	0,07	0,43	7,77
TrGA	64	0,61	0,08	0,00	0,00	0,15	0,43	8,42
TrGA	72	0,60	0,08	0,07	0,01	0,17	0,43	8,59

ES 2 370 768 T3

B. Todas las condiciones son como se describieron anteriormente: los tratamientos incluían 0,75 GAU/g GA107 y 0,75 GAU/g GA104

5 **[0137]**

Tabla 7 – Producción de etanol

GA	h	%p/v DP>3	%p/v DP-3	%p/v DP-2	%p/v DP-1	%p/v Láctico	%p/v Glicerol	%v/v EtOH
		1,11	0,10	0,29	1,06	0,00	0,15	0,00
104	13	0,84	0,00	0,01	0,01	0,00	0,43	5,03
107	13	0,77	0,00	0,00	0,00	0,00	0,42	4,16
104	21	0,94	0,14	0,03	0,00	0,00	0,46	6,90
107	21	0,88	0,10	0,03	0,01	0,00	0,43	5,24
104	35	0,94	0,18	0,13	0,02	0,02	0,49	9,02
107	35	0,87	0,11	0,02	0,01	0,04	0,44	6,53
104	54	0,91	0,14	0,00	0,00	0,00	0,51	10,93
107	54	0,89	0,13	0,00	0,00	0,30	0,45	7,58
104	62	0,87	0,12	0,00	0,00	0,00	0,53	11,49
107	62	0,88	0,14	0,00	0,00	0,39	0,46	7,74
104	72	0,94	0,14	0,16	0,00	0,00	0,53	12,22
107	72	0,88	0,14	0,05	0,01	0,42	0,47	7,82

10 C. Todas las condiciones fueron tal como se han descrito anteriormente: los tratamientos incluían a) GA de *A. niger* 0,75 GAU/g + 2,25 SSU AkAA y b) TrGA 0,75 GAU/g + 2,25 SSU AkAA. Se determinó que el almidón residual para el tratamiento con AnGA + AkAA era 5,26% y se determinó que el almidón residual para el tratamiento con TrGA + AkAA era 8,71%.

15 **[0138]** La medición de la actividad de alfa amilasa para AkAA se basa en el grado de hidrólisis de sustrato de almidón de patata soluble (4% de ds) por una alícuota de la muestra de enzimas a pH 4,5, 50°C. El contenido de azúcar reductor se mide utilizando el método DNS descrito en Miller, G. L. (1959) Anal. Chem. 31:426 - 428. Una unidad de la actividad de la enzima (SSU; unidad de almidón soluble) es equivalente al poder reductor de 1 mg de glucosa liberada por minuto en las condiciones de incubación específicas.

20

Tabla 8 – Producción de etanol

Tratamiento	Horas	%p/v DP>3	%p/v DP-3	%p/v DP-2	%p/v DP-1	%p/v Láctico	%p/v Glicerol	%v/v EtOH
AnGA + AkAA	15	0,81	0,00	0,04	0,13	0,04	0,63	8,22
TrGA + AkAA	15	0,94	0,00	0,04	0,03	0,04	0,68	8,35
AnGA + AkAA	26,5	0,94	0,06	0,04	0,08	0,06	0,89	12,59
TrGA + AkAA	26,5	1,00	0,08	0,08	0,00	0,06	0,83	11,81
AnGA + AkAA	40	0,65	0,10	0,08	0,05	0,06	0,94	14,37
TrGA + AkAA	40	0,73	0,10	0,14	0,00	0,05	0,91	13,80
AnGA + AkAA	49	0,93	0,07	0,06	0,05	0,05	1,08	17,05
TrGA + AkAA	49	0,98	0,08	0,14	0,00	0,04	0,97	15,52
AnGA + AkAA	70	0,82	0,04	0,04	0,27	0,00	1,07	17,59
TrGA + AkAA	70	0,95	0,08	0,04	0,00	0,00	1,01	17,17

ES 2 370 768 T3

D. Todas las condiciones fueron tal como se han descrito anteriormente: los tratamientos incluían a) TrGA 0,695 GAU/g + 2,25 SSU AkAA y b) TrGA 0,695 GAU/g + 2,25 SSU AKAA + 2 ASPU/g pululanasa. Una unidad de pululanasa estable en ácido (ASPU) se define como la cantidad de enzima que libera un potencial reductor equivalente a la glucosa por minuto de puluano a pH 4,5 y una temperatura de 60°C.

5

[0139]

Tabla 9 – Producción de etanol

Tratamiento	Horas	%p/v DP>3	%p/v DP-3	%p/v DP-2	%p/v DP-1	%p/v Láctico	%p/v Glicerol	%v/v Etanol	%DDGS almidón
TrGA	15	0,92	0,05	0,05	0,04	0,03	0,60	7,69	
TrGA + pululanasa	15	0,91	0,05	0,04	0,04	0,03	0,60	8,00	
TrGA	24	0,94	0,08	0,09	0,05	0,04	0,72	10,46	
TrGA + pululanasa	24	0,91	0,12	0,10	0,05	0,04	0,73	10,93	
TrGA	41	0,91	0,10	0,17	0,05	0,04	0,86	13,89	
TrGA + pululanasa	41	0,92	0,13	0,16	0,04	0,05	0,87	14,33	
TrGA	47	0,87	0,10	0,20	0,05	0,04	0,90	14,51	
TrGA + pululanasa	47	0,94	0,13	0,19	0,04	0,03	0,91	15,32	
TrGA	70	0,92	0,11	0,06	0,03	0,00	0,98	17,27	18,5
TrGA + pululanasa	70	0,95	0,11	0,05	0,02	0,00	0,98	17,77	16,4

10

E. Todas las condiciones fueron tal como se han descrito anteriormente: los tratamientos incluían TrGA 0,695 GAU/g y los siguientes tratamientos con AkAA:

a) 3 SSU AkAA; b) 10 SSU AkAA and c) 30 SSU AkAA.

15

[0140]

Tabla 10

Tratamiento (AkAA)	Horas	%p/v DP>3	%p/v DP-3	%p/v DP-2	%p/v DP-1	%p/v Láctico	%p/v Glicerol	%v/v Etanol	%DDGS almidón
3 SSU	17	0,77	0,05	0,00	0,00	0,04	0,59	8,31	
10 SSU	17	0,76	0,04	0,03	0,00	0,03	0,62	8,85	
30 SSU	17	0,78	0,04	0,05	0,00	0,03	0,06	9,54	
3 SSU	30	0,74	0,07	0,05	0,00	0,05	0,73	11,35	
10 SSU	30	0,78	0,06	0,05	0,00	0,05	0,81	12,62	
30 SSU	30	0,85	0,71	0,05	0,03	0,05	0,84	13,91	
3 SSU	41	0,70	0,08	0,02	0,02	0,05	0,90	13,96	
10 SSU	41	0,69	0,08	0,02	0,03	0,05	0,91	15,02	
30 SSU	41	0,68	0,07	0,03	0,07	0,05	0,92	15,83	
3 SSU	51	0,73	0,09	0,09	0,04	0,05	0,98	15,38	
10 SSU	51	0,74	0,09	0,05	0,05	0,04	0,99	16,57	
30 SSU	51	0,73	0,08	0,04	0,03	0,04	0,96	16,53	
3 SSU	70	0,70	0,09	0,02	0,02	0,02	1,04	17,09	15,8
10 SSU	70	0,72	0,08	0,02	0,03	0,04	1,04	17,35	10,7
30 SSU	70	0,71	0,08	0,02	0,07	0,03	1,01	17,42	9,6

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición de enzimas que comprende una glucoamilasa que tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica por lo menos en un 90% con la SEC ID NO: 4 y una alfa amilasa de *Aspergillus*, en la que la alfa amilasa tiene por lo menos un 90% de identidad con la secuencia de proteína madura de la SEC ID NO: 27, y en la que la actividad específica de dicha glucoamilasa es por lo menos un 90% de la actividad específica de una glucoamilasa que tiene la secuencia de SEC ID NO: 4.
- 10 2. Composición de enzimas según la reivindicación 1, en la que la glucoamilasa tiene una identidad de secuencia de por lo menos un 95% ó un 97% con la SEC ID NO: 4.
- 15 3. Composición de enzimas según la reivindicación 1, en la que la alfa amilasa tiene por lo menos un 93%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de identidad con la secuencia de proteína madura de SEC ID NO: 27.
- 15 4. Método de hidrolización de almidón que comprende tratar un sustrato que contiene almidón con una composición de enzimas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 20 5. Método para producir un producto de fermentación a partir de un sustrato que contiene almidón granular que comprende
- 20 a) poner en contacto un sustrato que contiene almidón granular con una composición de enzimas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización, a un pH de aproximadamente 4 a 7,0 durante un periodo de tiempo para producir una composición que comprende glucosa, y
- 25 b) poner en contacto la glucosa con un organismo de fermentación bajo condiciones de fermentación adecuadas para producir un producto de fermentación.
- 25 6. Método según la reivindicación 5, en el que el producto de fermentación es etanol.
- 30 7. Método para sacarificar almidón licuado que comprende tratar almidón licuado con una composición de enzimas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y obtener una composición que incluye por lo menos un 80% de glucosa.

Figura 1A-B Secuencia de ADNg de *Trichoderma reesei* (Sec ID No: 1)

ATGCACGTCG TGTGACTGCG GGTGCTGCTC GGCTCCGTTG CCGTTCAAAA GGTCTGGGA
 AGACCAGGAT CAAGCGGTCT GTCGACGTCA CCAAGAGGTC TGTGACGAC TTCATCAGCA
 CCGAGACGCC TATTGCACTG AACAACTTC TTTGCAATGT TGGTCTGAT GGATGCCGTG
 CATTGCGCAC ATCAGCTGGT GCGGTGATTG CATCTCCCAG CACAATTGAC CCGGACTGTA
 AGTTGGCCTT GATGAACCAT ATCATATATC GCCGAGAAGT GGACCGCGTG CTGAGACTGA
 GACAGACTAT TACATGTGGA CGCGAGATAG CGCTCTTGTC TTCAAGAACC TCATCGACCG
 CTTCACCGAA ACGTACGATG CCGGCCTGCA GCGCCGCATC GAGCAGTACA TTTACTGCCCA
 GGTCACTCTC CAGGGCCTCT CTAACCCCTC GGGCTCCCTC GCGGACGGCT CTGGTCTCGG
 CGAGCCCAAG TTTGAGTTGA CCCTGAAGCC TTTACCCGGC AACTGGGGTC GACCGCAGCG
 GGATGGCCCA GCTCTGCGAG CCATTGCTTT GATTGGATAC TCAAAGTGGC TCATCAACAA
 CAACTATCAG TCGACTGTGT CCAACGTCAT CTGGCCTATT GTGCGCAACG ACCTCAACTA
 TGTGTCGCCAG TACTGGTCAG TGCTTGCTTG CTCTTGAATT ACGTCTTTGC TTTGTGTGCT
 AATGCCTCCA CCACAGGAAC CAAACCGGCT TTGACCTCTG GGAAGAAGTC AATGGGAGCT
 CATTCTTTAC TGTGCCAAAC CAGCACCGAG GTATGAAGCA AATCCTCGAC ATTCGCTGCT
 ACTGCACATG AGCATTGTTA CTGACCAGCT CTACAGCACT TGTCGAGGGC GCCACTCTTG
 CTGCCACTCT TGCCAGTCG GGAAGCGCTT ATTCATCTGT TGCTCCCCAG GTTTTGTGCT
 TTCTCCAACG ATTCGCGGTG TCGTCTGGTG GATACGTGCA CTCCAACAGT ATGCTTTTTTC
 ACTGTTTATA TGAGATTGGC CAATACTGAT AGCTCGCCTC TAGTCAACAC CAACGAGGGC
 AGGACTGGCA AGGATGTCAA CTCCGTCTTG ACTTCCATCC ACACCTTCGA TCCCAACCTT
 GGCTGTGACG CAGGCACCTT CCAGCCATGC AGTGACAAAG CGCTCTCAA CCTCAAGGTT
 GTTGTGCGACT CCTTCCGCTC CATCTACGGC GTGAACAAGG GCATTCCTGC CGGTGCTGCC
 GTCGCCATTT GCCGGTATGC AGAGGATGTG TACTACAACG GCAACCCCTG GTATCTTGCT
 ACATTTGCTG CTGCCGAGCA GCTGTACGAT GCCATCTACG TCTGGAAGAA GACGGGCTCC
 ATCACGGTGA CCGCCACCTC CCTGGCCTTC TTCCAGGAGC TTTGTTCTTG CGTGACGGCC
 GGGACCTACT CCAGCAGCTC TTTCGACCTTT ACCAACATCA TCAACGCCGT CTGCACATAC
 GCCGATGGCT TCCTCAGCGA GGCTGCCAAG TACGTCCCCG CCGACGGTTC GCTGGCCGAG
 CAGTTTGACC GCAACAGCGG CACTCCGCTG TCTGCGCTTC ACCTGACGTG GTCGTACGCC
 TCGTTCTTGA CAGCCACGGC CCGTCGGGCT GGCATCGTGC CCCCCTCGTG GGCCAACAGC
 AGCGCTAGCA CGATCCCCTC GACGTGCTCC GCGCGTCCG TGGTCGGATC CTTACTCGGT
 CCCACCGCCA CGTCATTCCT TCCGTGCGAG ACGCCCAAGC CTGGCGTGCC TTCCGGTACT
 CCCTACACGC CCCTGCCCTG CCGGACCCCA ACCTCCGTGG CCGTCACCTT CCACGAGCTC
 GTGTGACAC AGTTTGCCCA GACGGTCAAG GTGGCGGGCA ACGCCGCGGC CTTGGGCAAC
 TGGAGCACGA GCGCCCGCTT GGCTCTGGAC GCCGTCAACT ATGCCGATAA CCACCCCTG

 TGGATTGGGA CGGTCAACCT CGAGGCTGGA GACGTCTGTT AGTACAAGTA CATCAATGTG
 GGCCAAGATG GCTCCGTGAC CTGGGAGAGT GATCCCAACC AACTTTACAC GGTCTCTGCG
 GTGGCTTGTG TGACGCAGGT TGTCAGGAG GAACCTGGCA GTCGTA

ES 2 370 768 T3

Figura 2A-B Secuencia de ADNc de *Trichoderma reesei* (Sec ID No: 2)

```
ATGCACGTCC TGTGACTGCG GGTGCTGCTC GGCTCCGTTG CCGTTCAAAA GGTCTTGGGA
AGACCAGGAT CAAGCGGTCT GTCCGACGTC ACCAAGAGGT CTGTTGACGA CTTTCATCAGC
ACCGAGACGC CTATTGCACT GAACAATCTT CTTTGCAATG TTGGTCTGTA TGGATGCCGT
GCATTCGGCA CATCAGCTGG TGCGGTGATT GCATCTCCCA GCACAATTGA CCGGACTAC
TATTACATGT GGACGCGAGA TAGCGCTCTT GTCTTCAAGA ACCTCATCGA CCGCTTACC
GAAACGTACG ATGCGGGCCT GCAGCGCCGC ATCGAGCAGT ACATTACTGC CCAGTCACT
CTCCAGGGCC TCTCTAACCC CTCGGGCTCC CTCGCGGACG GCTCTGGTCT CCGGAGCC
AAGTTTGAGT TGACCTGAA GCCTTTCACC GGCAACTGGG GTCGACCGCA GCGGGATGGC
CCAGCTCTGC GAGCCATGCG CTTGATTGGA TACTCAAAGT GGCTCATCAA CAACAATAT
CAGTCTACTG TGTCCAACGT CATCTGGCCT ATTGTGCGCA ACGACCTCAA CTATGTTGCC
CAGTACTGGA ACCAAACCGG CTTTGACCTC TGGGAAGAAG TCAATGGGAG CTCATTCTTT
ACTGTTGCCA ACCAGCACCG AGCACTTGTG GAGGGCGCCA CTCTTGCTGC CACTCTTGGC
CAGTCCGGAA GCGCTTATTC ATCTGTTGCT CCCCAGGTTT TGTGCTTCT CCAACGATTC
TGGGTGTCGT CTGGTGGATA CGTCGACTCC AACATCAACA CCAACGAGGG CAGGACTGGC
AAGGATGTCA ACTCCGTCCT GACTTCCATC CACACCTCG ATCCCAACCT TGGCTGTGAC
GCAGGCACCT TCCAGCCATG CAGTGACAAA GCGCTCTCCA ACCTCAAGGT TGTGTGCGAC
TCCTTCCGCT CCATCTACGG CGTGAACAAG GGCATTCCCTG CCGGTGCTGC CGTCGCCATT
GGCCGGTATG CAGAGGATGT GTACTACAAC GGCAACCCCTT GGTATCTTGC TACATTTGCT
GCTGCCGAGC AGCTGTACGA TGCCATCTAC GTCTGGAAGA AGACGGGCTC CATCACGGTG
ACCGCCACCT CCCTGGCCTT CTTCCAGGAG CTTGTTCCTG GCGTGACGGC CCGGACCTAC
TCCAGCAGCT CTTGACCTT TACCAACATC ATCAACGCGG TCTCGACATA CGCCGATGGC
TTCCTCAGCG AGGCTGCCAA GTACGTCCCC GCCGACGGTT CGCTGGCCGA GCAGTTTGAC
CGCAACAGCG GCACTCCGCT GTCTGCGCTT CACCTGACGT GGTGCTACGC CTCGTCTTG
ACAGCCACGG CCCGTCGGGC TGGCATCGTG CCCCCCTCGT GGGCCAACAG CAGCGCTAGC
ACGATCCCCT CGACGTGCTC CGGCGCGTCC GTGGTCGGAT CCTACTCGCG TCCCACCGCC
ACGTCAATCC CTCCTGCGCA GACGCCCAAG CCTGGCGTGC CTTCCGGTAC TCCCTACAGC
CCCCTGCCCT GCGCGACCCC AACCTCCGTG GCCGTACCT TCCACGAGCT CGTGTGACA
CAGTTTGCC AGACGGTCAA GGTGGCGGGC AACGCCCGG CCCTGGGCAA CTGGAGCAGC
AGCGCCCGCG TGGCTCTGGA CGCCGTCAAC TATGCCGATA ACCACCCCT GTGGATTGGG
ACGGTCAACC TCGAGGCTGG AGACGTCGTG GAGTACAAGT ACATCAATGT GGGCCAAGAT

GGCTCCGTA CCTGGGAGAG TGATCCCAAC CACACTTACA CCGTTCCTGC GGTGGCTTGT
GTGACGCAGG TTGTCAGGA GGACACCTGG CAGTCGTAA
```

Figura 3A

Secuencia de aminoácidos de TrGA (SEC ID No: 3)

1 **MHVLSTAVLL GSVAVQKVLG RPSSGLSDV TKRSVDDFIS TETPIALNNL**
 51 LCNVGPDGCR AFGTSAGAVI ASPSTIDPDY YMWTRDSAL VPKNLIDRFT
 101 ETYDAGLQRR IEQYITAQVT LQGLSNPSGS LADGSGLGEP KFELTLKPFT
 151 GNVGRPQRDG PALRAIALIG YSKWLINNMY QSTVSNVIWP IVRNDLNYVA
 201 QYWNQTGFDL WEEVNGSSFF TVANQHRALV EGATLAATLG QSGSAYSSVA
 251 PQVLCFLQRF WVSSGGYVDS NINTNBGRTG KDVNSVLTSI HTFDPNLGCD
 301 AGTFQPCSDK ALSNLKVVVD SFRSIYGVNK GIPAGAATAI GRYAEDVYYN
 351 GNPWYLATFA AAEQLYDAIY VWKKTGSITV TATSLAFFQE LVPGVTAGTY
 401 SSSSSTFTNI INAVSTYADG FLSEAAKYVP ADGSLAEQFD RNSGTPLSAL
 451 HLTWSYASFL TATARRAGIV PPSWANSAS TIPSTC**SGAS** **VVGSYSRPTA**
 501 **TSFPFSQTPK PGVPSGTPYT PLPCATPTSV AVTFHELVST QFGQTVKVAG**
 551 NAAALGNWST SAAVALDAVN YADNHPLWIG TVNLEAGDVV EYKYINVGQD
 601 GSVTWESDPN HTYTVPAVAC VTQVVKEDTW QS

Figura 3B

proteína madura TrGA (SEC ID No: 4)

```

1  SVDDFISTET PIALNNLLCN VGPDGCRAFG TSAGAVIASP STIDPDYYYM
51 WTRDSALVFK NLIDRFTEY DAGLQRRIEQ YITAQVTLQG LSNPSGSLAD
101 GSGLGEPKFE LTLKPFTGNW GRPQRDGPAL RAIALIGYSK WLINNNYQST
151 VSNVIWPIVR NDLNYVAQYW NQTGFDLWEE VNGSSFFTVA NQHRALVEGA
201 TLAATLGQSG SAYSSVAPQV LCFLQRPWVS SGGYVDSNIN TNEGRTGKDV
251 NSVLTSIHTE DPNLGCDAGT FQPCSDKALS NLKVVDSPR SIYGVNKGIP
301 AGAAVAIGRY AEDVYYNGNP WYLATFAAAE QLYDAIYVWK KTGSIQVTAT
351 SLAFFQELVP GVITAGTYSSS SSTFTNIINA VSTYADGFLS EAAKYVPADG
401 SLAEQFDRNS GTPLSALHLT WSYASFLTAT ARRAGIVPPS WANSSASTIP
451 STCSGASVVG SYSRPTATSF PPSQTPKPGV PSGTPYTPLP CATPTSVAVT
501 FHELVSTQFG QTVKVAGNAA ALGNWSTSA VALDAVNAD NHPLWIGTVN
551 LEAGDVVEYK YINVGQDGSV TWESDPNHTY TVPAVACVTQ VVKEDIWQS

```

ES 2 370 768 T3

Figura 4A-B Secuencia de ADNg de *Hypocrea citrina* var. *Americana*, (GA102) – 2154 pb (SEC ID No: 5)

```

ATGCACGTC TGTCGACGGC TGTGPTGCTC GGCTTGGTGG CCGTTCAAAA GGTTCCTGGGA
AGGCCAGGGC TGAATGGCGT ACCCGACGTC ACAAACGGT CCGTTGACGA CTTCATCAGC
AATGAGTCTC CTATPGCACT GAACAACCTC CTGTGCAATG TCGGCCCTGA TGGATGCCGC
GCCTTTGGCG CATCGGCAGG CACTGTGCTC GCCTCGCCCA GCACAACCGA CCCAGACTGT
AAGTGTATAC GAGACAATCC ATGAGATGAG GCCCTCTACG TGTATTGCAC ACTAACACAG
ATATTGACGC GGATTACTAC ATGTGGACGC GAGACAGTGC TCTCATCTTC AAGACCGTTG
TCGACAGGTT CACCCAGAAC TACGATGCTA GCCTGCAGAA GCGCATTGAG CAGTACATFG
CTGTCTAGGC CACGCTTCAG GGGATTTCCA ACCCATCGGG CTCTCTAGCA GATGGGTCCG
GTCTCGGCGA GCCCAAGTTC GAGCTGACCC TGAATCAGTT CACCGGCCAC TGGGGCCGAC
CACAGCGGGA CGGTCCAGCT CTGCGAGCCA TTGCCTTGAT CGGCTATTGC AAGTGGCTCA
TCGACAACAA CTACCAAGTC ACTGTGTCCG ACATCATCTG GCCCATTCTG CGGAATGATC
TCAACTACGT AGCGCAGTAC TGGTATGTTG TGCTTACTGT TTTGCTCCGT TGAGAATGGT
CCGTTTCTAA CCTTTAAACT GTAGGAACCA AACCGGTTTT GACTTGTTGG AGGAAGTTGA
AGGAAGTCA TTCTTTACCG TTGCTAACCA GCACCGAGGT ACGGAACACG ACTCAGGTCA
ACTGACGAGA GGCGCTGCTA ACACGCTTCA CAGCCCTTGT CGAGGGCGCT ACGCTGTCTG
CTATCCTTGG CCAGTCGGGA AGCAGCTATT CTGCTGTTGC TCCCAGATT CTGTGCTTCC
TCCAAAAATT TTGGTGTCT TCCGGCGGAT ACGTGAACTC CAACAGTGGC TCTATGTGTG
CGCTCTGTGA GCTCTGATGA AGCGGATGCT AACAGTTTAT CTGTAATFAGT CAACAGTGAT
ATCAACAGAA CCGGAAAGGA TGCCAACTCT CTCTCGCCT CTATCCACAC ATTCGATCCT
AGCATTGGCT GTGACCCCGC TACCTTCCAG CCCTGCAGTG ATAAGGCCCT TTCCAACCTC
AAGTCCGTGC TCGATTCATT CCGCTCCATC TACGGCGTCA ACCAGGGCAT CTCTGCTGGC
TCTGCCGTGG CCATCGGCGG ATACTCCGAG GACGTCTACT TCAACGGAAA CCCCTGGTAC
CTGCCCACAT TTGCCGCCGC CGAGCAGCTG TACGACTCCC TGTACGTGTG GAAGCAGACG
GGCTCGATCA CGGTGACGGC CATCCCTCTG GCCTTCTTCC AGGAGCTCGT GCCCGGCGTG
GCCCGCGGCA CGTACCTCAG CAGCCAGTCT ACGTTACCA GCATCGTCAA CGCCGTCTCA
GCCFACGCGG ACGGCTTCTT AAACGAGGCG GCCAAGTACG TCCCCTCCGA TGGCTCGCTC
GCCGAGCAGT TTGACAAGAA CAACGGCAGC CCTCTGTGCG CCGTGCACCT GACCTGGTCC
TATGCCTCCT TTTTGACGGC GACCGCGCGT CGAGCTGGTT CTGTGCCTCC GTCGTGGGCC
AATAGCAACG CAACCTCGAT TCCGACGGCC TGCTCTGGAA CGTCGGTGGT TGGATCATA
TCGAGTCCCA CAGCCACGTC ATTCCTTCCC TCCCAGACGC CCAAAGTTGG CAAGCCAACG
GGCACGCCCT TCACGCCCAT TCCCTGCGCC ACGCCAACCT CCGTGGCCGT CACCTTCCAC
GAGCTCCCAA CGACGCAGTT TGGCCAGACC ATCAAATTGG CTGGCAGCGC TGAGGCCCTG

GGCAACTGGA GCACCGGTGC CGCCGTGGGC CTCGACGCCG CCAACTATGC GTCCAACCAC
CCGTTGTGGT TTGGCACGCT CAACCTCCAG GCCGGCGATG TCATCGAGTA CAAGTACATC
AACGTGGGCA AGGACGGCTC CGTGACGTGG GAGAGCGACC CCAACCACAC GTACACCGTT
CCTGCGGTGG CGTGTGTAC CGAGGTGGTC AAGGAGGACA CCTGGCAGTC GTAA

```

ES 2 370 768 T3

Figura 5A-B Secuencia de ADNg de *Hypocrea vinosa*, (GA104) – 2152 pb (SEC ID No: 7)

ATGCACGTGC TGTCGACTGC TGTGCTACTT GGCTCAGTTG CCGTCCAAAA GGTTCGGGA
 AGACCAGGAT CAAACGGTCT ATCCGGCGTC ACAAACGAT CTGTGGATGA CTTTATCAAC
 ACACAGACTC CCATTGCACT AAACAACCTT CTTTGCAATG TTGGCCCTGA TGGATGCCGT
 GCCTTTGGTA CATCGGCCGG TGCCGTGATT GCATCTCCGA GCACAACCTGA CCCAGACTGT
 AAGTTTACT TATACGGGCT TATCTCCTGA TATGTCAAGT TTCATATGCT AACACGAGGG
 TAATTAATCA GACTACTACA TGTGGACGCG AGATAGTCTT CTTGTCTTCA AGAACATTTGT
 AGACCGCTTC ACTCAGCAGT ATGATGCCGG CCTGCAGCGC CGCATCGAGC AGTACATTTT
 TGCCAGGTC ACTCTCAGG GCATCTCAA CCCCTCTGGC TCTCTCTCGG ACGGGTCCGG
 TCTTGGTGAA CCCAAGTTTG AGTTGACCTT GAGCCAGTTC ACTGGCAACT GGGGTCCGCC
 GCAGCGCGAC GGCCAGCTC TCCGAGCCAT TGCCCTGATT GGTATTTCGA AGTGGCTCAT
 CAACAACAAC TACCAGTCAA CGGTGTCAA TATCATCTGG CCCATCGTAC GGAATGACCT
 CAACTATGTT GCCCAACTACT GGTAAGTACA AGCTCGCCGT CTTTTCGTCT TGTATGACT
 AATTCCAACA CCTTCACTTT AGGAACCAA CCGGTTTCGA CCTGTGGGAG GAAGTCAATG
 GTAGCTCGTT CTTTACCGTT GCCAACCCAGC ACCGAGGTAT GTATCAACAT CTCATGTGCA
 ATTTTTAGTT GGAAATAAAC AATGCTGACG AGTTCTCCAG CTCITGTTGA GGGCGCCACA
 CTTGCTGCTA CCCTCGGCCA GTCGGGAAGC ACCTATTCCCT CAGTTGCGCC TCAGATCCTG
 TGCTTCCTCC AAAGATTCTG GGTGTCCGGT GGATATATTG ACTCTAATAG TAAGTCTACT
 AGTACCATAT GCTTTGATGA AGGGCGATAC TAAACAGCTT GCCATAGTCA ATACCAACGA
 AGGCAAGACT GGAAAGATG CCAACTCTCT TCTCGCATCT ATCCACACGT TCGATCCTAG
 CCTCGGCTGT GACGCCTCTA CCTTCCAGCC TTGCAGTGAC AAAGCTCTCT CCAACCTCAA
 GGTGTGTGTA GACTCCTTCC GCTCCATCTA CGGTGTCAAC AAGGGCATTG CTGCTGGCTC
 TGCTGTGCCC ATCGGCAGAT ACCCCGAAGA TGTGTACTTT AACGGAAACC CTTGGTACCT
 CGCACGTTT GCTGTGCGG AGCAACTTTA CGACTCCGTC TATGTCTGGA AGAAGACAGG
 CTCATCACA GTGACTTCCA CTTCTTCGGC CTTCTTCCAG GAGCTCGTTC CCGCGTCGC
 AGCTGGGACT TACTCCAGCA GCCAGTCTAC CTTCAACAAG ATCATCAACG CCATCTCGAC
 ATATGCTGAT GGATTCCTCA GCGAGGCTGC CAAGTACGTC CCCGCTGATG GTTCGCTCGC
 CGAGCAGTTT GATCGCAACA CCGGCACACC TCTGTGAGCC GTTACACTGA CCTGGTCTTA
 CGCCTCGTTT CTCACCGCG CGGCCCGTGC GGCTGGCGTT GTCCCCCCTT CGTGGGCCAG
 CAGCGGCGCT AATACAGTTC CTTCAAGCTG CTCGGGAGCT TCTGTGGTTG GATCCTACTC
 GCGTCTACA GCCACGTCAT TCCCACCATC GCAGACCCCC AAGCCTGGCG TTCCTTCTGG
 TACTCCCTTC ACTCCCATTC CCTGTGCTAC CCCGACTTCC GTTGGCGTCA CTTTCCACGA
 GCTTGCCACA ACCCAGTTTG GTCAGACTAT CAAGGTGCTT GGTAGCGCTC CCGAGCTGGG

CAACTGGAGC ACGAGCGCG CCATTGCTCT GGATGCCGTC AACTATGCCA CTAACCACCC
 CTTGTGGATT GGATCGGTCA ATCTGGAAGC CGGAGATGTT ATCGAGTACA AGTACATTA
 CGTGGGCCAG GATGGTTCCG TCACCTGGGA GAGCGATCCT AACCACACCT AACTGTTC
 TGCGGTGGCA TGTGTTACCG AGGTGGTTAA GGAGGACACC TGGCAGTCGT AA

ES 2 370 768 T3

Figura 6A-B Secuencia de ADNg de *Trichoderma* sp., (GA105) – 2158 pb (SEC ID No: 9)

ATGCACGTCC TGTCGACTGC GGTGCTGCTT GGCTCCGTTG CCGTTCAAAA GGTCCTGGGA
 AGACCAGGAT CAAGCGGGCT ATATGACGTC ACCAAGAGAT CCGTCGACGA CTTTCATCAGC
 ACCGAAACTC CTATTGCACT GAACAACCTT CTCTGCAATG TTGGTCCTGA TGGATGTGCT
 GCATTTGGCA CGTCAGCTGG TCGGGTGATT GCATCTCCCA GCACGACCGA CCCAGACTGT
 AAGTTGAAAT TCCAGCGCTA CATCTCACAT ATCGCCGAGC AGTCGACAGC GTGCTAATAT
 CGAGACAGAC TATTACATGT GGACGCGGGA TAGTGTCTTT GTCTTCAAAA ACCTTGTGCA
 CCGCTTCACC GAAGAGTACG ATGCTGGCCT GCACGCGCCG ATTGAGCAGT ACATCACTGC
 CCAGTCACT CTCCAGGGCC TCACCAACCC ATCGGGTTC CTCTCGGACG GGTCTGGTCT
 GGGCGAGCCC AAGTTTGAGT TGACCCGCA GCCATTCACT GGCAACTGGG GTCGGCCGCA
 GCGGGATGGC CCAGCTCTGC GAGCCATGTC CTTGATTGGC TATGCGAAGT GGCTTATCAA
 CAACAACAT CAGTCCACTG TGTCCAGCGT CATCTGGCCC ATTGTGCGCA ACGACCTCAA
 CTACGTTGCT CAATACTGGT TAGTGACGGC TTGCCCTCGA ATCACATCTT TGCTTGTGTG
 TCTAACGCTC TCACTTCAGG AACCAAACCG GCTTTGACCT CTGGGAGGAA GTCGATGGAA
 GCTCATCTCT CACTGTTGCC AACCCAGACC GAGGTATGAA GCAAACCGTC CACTCTGCT
 GTTACTGTAT GTGACCATTG TTAGTGACCA GCTCTCCAGC ACTTGTGAG GGTGCCACGC
 TTGTTGCCAC GCTTGGCCAG TCGGGAGACA CATATTCATC CGTTGCTCCC CAAGTCTTGT
 GCTTCCCTTCA GCGATTCTGG GTGTCGTCCG GTGGATACAT CGACTCCAAC AGTATGTTTT
 GCACTGGTCA TGAATGTGA TAACGACAAT GGCTAATGCG TCTCCTTTAG TCAACACCAA
 CGAGGGCAGG ACTGGAAAGG ATGCCAACTC GATTCCTACT TCCATCCACA CCTTTGACCC
 CAATCTTGGC TCGATGCGAG GCACCTTCCA GCCATGCGAGT GACAAAGGCG TCTCCAACCT
 CAAGTCTGTT GTCGACTCCT TCCGCTCCAT CTACAGCTTG AACAAAGGCA TTCCCGCTGG
 TGCTGCCAGT GCCATTGGCA GATATCCAGA GGATGTGTAC TTCAAACGGAA ACCCTTGGTA
 CCTTGCCACG TTTGCTGCTG CTGAGCAGCT GTACGATGCC GTCTACGTCT GGAAGGAGAC
 GGGCTCCATC ACGGTGACCG CCACCTCCCT GGCCTCTTC CAGGAGCTTG TTCCCGGCT
 GACAGCTGGG ACCTACTCCA GCAGCTGTC GTGACCTTT ACCACCATCA TCAACGCGT
 CTCGACGTAC GCCGATGGCT TCCTCAGCGA GGCTGCCAAG TACGTCCCG CCGACGGTTC
 GCTGGCAGAG CAGTTCGACC GCAACAACGG CACTGCGCTG TCCGCCCGTC ACCTGACGTG
 GTCGTACGCC TCCTTCTTGA CAGCCACGGC CCGTCGTGCT GGCCTCGTGC CCCCTTCGTG
 GGCAACAGC AGCGCCAGCA CGATTCCTTC GACGTGCTCC GGCCTCGTCC TGGTCCGCTC
 CTACTCGCGT CCCACAGCCA CGTCATTCCT TCCGTGCGAG ACGCCCAAGC CTGGCGTTC
 GTCCGGCACT CCTACACGC CCGTGCCTG CGCTACCCCA ACGTCCGTGG CCGTCACTTT

 CCTGGGCAAC TGGAGCACGA GCGCCGCTGT GGCTCTGGAT GCCGTCAACT ACGCCGATAA
 CCATCCCTG TGGATCGGAA CGGTTAACCT CGAGGCCGGA GACGTTGTGG AGTACAAGTA
 CATCAATGTC GGTACAGGAT GCTCCGTGAC CTGGGAGAGT GACCCCAACC ACCTTACAC
 GGTTCCTGCG GTGGCTTGTG TGACGCAGGT TGTCAGGAG GACACCTGGC AGTCGTAA

Figura 7A-B Secuencia de ADNg de *Hyprocrea gelatinosa*, (GA107) – 2144 pb (SEC ID No: 11)

```

ATGCACGTGC TGTCGACTGC TGTGCTACTC GGCTCAGTTG COGTCCAGAA GGTCTGGGA
AGACCAGGAT CAAACGGCCT TTCCGGCGTC ACAAACGAT CTGTGGATGA CTTTCATCAAC
ACACAGACTC CCATTGCGCT AAACAACCTC CTTTGCAATG TTGGCCCTGA TGGATGCCGT
GCCTTTGGCA CATCGGCCGG TGCTGTGATT GCATCTCCGA GCACAACCTGA CCCAGATGT
AAGTTTGACT TATACCGGCA TATTCTTGAG ATGTCAAGTT TCACATACTA ACACGGGGGT
AATTGATCAG ACTACTACAT GTGGACGCGA GACAGTGTCT TTGTCTTCAA GAACATTGTC
GACCGTTTCA CTCAACAGTA CGATGCCGGC CTGCAGCGCC GCATCGAGCA GTACATTTCT
GCCCAGGTCA CTCTCCAGGG GCCCTCAAAC CCCTCTGGCT CTCTCTCGGA CGGGTCCGGT
CTTGTGTAAC CCAAGTTTGA GCTGACTTTG AGTCAGTTCA CTGGAAACTG GGGTCTGCCG
CAGCGCGATG GCCCAGCTCT TCGAGCTATT GCCTTAATAG GCTATTCGAA GTGGCTCATC
AACAACAACCT ACCAGTCAAC TGTATCAAGT ATCATCTGGC CCATTGTACG AAATGATCTC
AACTATGTTG CCCAGTACTG GTTAGTACCA ACTCGCTGTC TCTTCGTCTT GTTTAAGACT
ATCTCTAATA CATTCACTTC AGGAACCAA CTGGTTTCGA CCTGTGGGAG GAAGTCAATG
GTAGTCTGTT CTTTACTGTT GCCAACCCAGC ATCGAGGTAT GTATCAACAA CTCATACATT
AATTGGAAAT AAAAAATGCT GACAAGTTC TTAGCTCTG TTGAGGGTGC CACACTTGCC
GCTACCCTCG GCCAGTCAGG AAGCACCCTAT TCCTCTGTTG CTCCTCAAAT CCTGTGCTTC
CTCCAGAGAT TTTGGGTGTC GGGAGGATAC ATTGACTCCA ACAGTAAGTC TATCAGCACT
ATGCCCTGGAT GAAGACCAAT ACTAAACAGC TCGTTATAGT CAACAGCAAC GATGGCAGGA
CTGGCAAAGA TGCCAACTCT CTTCTCGCAT CTATCCACAC CFTCGATCCT AGCCTGGGCT
GCGACGCCCT CACCTTCCAG CCTTGCAGTG ACAAAGCTCT CTCCAATCTC AAGGTTGTTG
TAGACTCCTT CCGCTCCATC TACGGCGTCA ACAAAGGTAT TTCTGCTGGC TCTGCTGTTG
CCATCGGCAG ATACCCCGAA GATGTGTACT TTAACGGAAA CCCCTGGTAT CTTGCCACGT
TCGCTGCTGC TGAGCAACTT TACGACTCCG TCTATGCTTG GAAGAAGACA GGCTCCATCA
CGGTGACTTC CACCTCTTTG GCCTTCTTCC AGGAGCTTGT CCCCCTGTC GCGCTGGA
CTTACTCCAG CAGCCAGTCT ACCTTACGA GCATCGTCAA CGCCGTCTCG ACATATGCTG
ATGGATTCCT CAGCGAGGCT GCCAAGTACG TCCCTGCTGA TGGTTCGCTC GCCGAGCAGT
TOGATCGAAA CACCGGAACG CCTCTGTGAG CCGTTCACCT GACCTGGTCA TACGCCCTCGT
TTTTACCCGC TCGGCCCGT CCGTCTGGCG TTGTCCCCC ATCGTGGGCC AGCAGCGGCG
CTAACTCAAT CCCTGCAACC TGCTCCGGAG CGTCTGTGGT TGGATCCTAC TCGAGTCTTA
CAGCCACGTC ATTCCCACCA TCGCAGACCC CCAAGCCTGG CGTTCCTTCT GGTACTCCCT
TCACTCCCTT TCCCTGCGCT ACCCCGACTT CCGTTGCCGT CACTTTCCAT GAGCTTGCCA
CAACCCAGTT TGGCCAGAAT ATCAAGGTCG CCGGCAGCGC TCCCGAGCTG GGCAACTGGA

GCACGAGCGC GGCCATTGCT CTGGATGCCG TCAACTATGC CACTAACCAT CCCCTGTGGA
TTGGATCGGT CAATCTGGAA GCCGGAGACG TCATTGAGTA CAAGTACATC AACGTGGGTC
AGGATGGTTC CGTCACTGG GAGAGCGACC CCAACCACAC CTACACTGTT CCAGCGGTTG
CCTGTGTAC TGAGGTGGTT AAGGAGGACA CCTGGCAGTC GTAA

```

Figura 8A-B Secuencia de ADNg de *Hyprocrea orientalis*, (GA108) – 2127 pb (SEC ID No: 13)

```

ATGCACGTCC TGTCGACTGC GGTGTGCTC GGCTCCGTTG CCGTTCAGAA GGTCCCTGGGA
AGACCAGGAT CAAGCGGTCT TTCTGACGTA ACCAAGAGAT CCGTTGACGA CTTTCATCAGC
ACCGAGACCC CCATGCACT GAACAACCTT CTCTGCAATG TTGGTCTCTGA TGGATGTCTGT
GCATTTGGCA CATCAGCCGG TCGGGTGATT GCATCTCCCA GCACAATTGA CCGGACTGT
AAGTTGGATC AATACCGTTG ATCTATGTTT ACCGCATACT GAGACGGAAA CAGACTATTA
CATGTGGACG CGAGACAGCG CTCTTGTTTT CAAGAACCCTC GTGACCCGCT TCACCGAAAC
GTACGATGCT GGCCTGCAGC GCCGCATTGA GCAGTACATC ACTGCCCAGG TCACCTCTCCA
GGCCCTCTCC AACCCATCGG GATCCCTTAC GGACGGGTCT GGTCTGGGCG AGCCCAAGTT
TGAGCTGACC CTGCAGCCCT TCACCGGCAA CTGGGGTCGA CCGCAGCGCG ATGGCCAGC
CTTGGAGGCC ATTGCCCTGA TTGGATACTC CAAGTGGCTC ATCAACAACA ACTATCAGTC
AACTGTGTCC AACGTCACTT GGCCGATTGT GCGCAACGAC CTCAACTACG TTGCTCAATA
CTGGTTAGTG ACACTTGCCC TCGAACTACT GCTTGCCTCT AACCTCTTCA TCGTAGGAAC
CAGACTGGCT TTGACCTGTG GGAGGAAGTG AAAGGTAGCT CGTTCCTTAC CATTGCCAAC
CAGCACCGAG GTATGAAGCA CAACGTCCAT ACTCGCCGTC ATTACTTTGA GCATFACTGA
CCACCTCTCC AGCACTTGTG GAGGGTGCTA CTCTTGCCCG TACTCTTGGC CAGTCGGGAA
GCACCTTATTC ATCTGTGTGCT CCCCAGATCT TGTGCTTCCT CCAACGATTG TGGGTGTCTGT
CGGGCCGATA TGTCGACTCC AATAGTATGT CTTCOAAGGC TCGTATGATT GTTAAAGACA
AGTACTAACA GCTGGCCTCT AGTCAACACC AACGAGGGCA GGACTGGCAA GGATGTCAAC
TCCATCTGTA CCTCCATCCA CACCTTGGAT CCAACCTTG GCTGTGATGC AGGCACCTTC
CAGCCATGCA GTGACAAGGC GCTCTCCAAT CTCAAGGTTG TTGTGACTC CTTCCGCTCC
ATCTACGGTG TGAACAAGGG CATTCTGCCC GGTGCTGCCG TCGCCATTGG CCGATATGCA
GAGGATGTCT ACTTCAACGG TAACCCTTGG TATCTTGCCA CGTPTGTGTC CGCCGAACAG
CTGTACGATG CCGTCTATGT CTGGAAGAAG ACGGGCTCCA TCACGGTTFAC TGCCACCTCC
CTGGCCPTCT TCCAGGAGCT TGTTCGCCGC GTGGCGGCGG GGACCTACGC CAGCAGCTCG
TCGACCTTTA CGAACATCAT CAACGCCGTC TCAACATACG CCGATGGCTT CCTTAGCGAG
GCTGCCAAGT ACGTTCGCCG CGACGGTTCG CTGGCCGAGC AGTPTGACCG CAACAGCGGC
ACTCCGCTGT CCGCCCTTCA CCTGACGTGG TCGTACGCCT CGTTCCTGAC AGCCACGGCC
CGTCGGGCTG GCATCGTGCC CCCATCGTGG GCAAACAGCA GCGCCAGCAC GATTCCTCTG
ACGTGCTCCG GCGCGTCCGT GGTCCGATCC TACTCGCGTC CCACAGCCAC GTCATTCCTT
CCGTCGCAGA CGCCCAAGCC TGGCGTTCCT TCCGGTACGC CCTACACTCC CCTGCCCTGC
GCCACTCAA CGTCCGTGGC CGTCACCTTC CACGAGCTCG TGTGACGCA GCTTGGCCAG
ACGGTCAAGG TCGCGGGCAA CGCTCCGGCC CTGGGCAACT GGAGCACGAG CGCCGCCGTG

GCTCTCGATG CCGTCAACTA TGCCGACAAC CACCCGCTGT GGATCGGAAC GGTTCACCTC
GAGGCTGGAG ATGTCGTGCA GTACAAGTAC ATCAATGTCG GCCAGGATGG CTCCGTGACC
TGGGAGAGTG ATCCCAATCA CACTTACACG GTTCTGCGG TGGCTTGTGT GACGCAGGTT
GTCAAGGAGG ACACCTGGCA GTCGTAA

```

Figura 9A-B Secuencia de ADNq de *Trichoderma konilangbra*, (GA109) – 2139 pb (SEC ID No: 15)

```

ATGCACGTCC TGTCGACTGC GGTGCTGCTC GGCTCCGTTG CCGTCCAGAA GGTTCGTGGGA
AGACCGGGGT CAAGCGGCCT CTCCGACGTC ACCAAGAGAT CTGTGACGGA TTTCATCAGC
ACCCAGACGC CCATCGCACT GAACAACCTC CTCTGCAATG TTGGCCCTGA CGGATGCCGT
GCATTTGGCA CATCAGCTGG TGCGGTTATT GCATCGCCCA GCACAACGTA CCCAGACTGT
AAGTTGGGCT TGTACCAGTA TATCTACGAG AGTTGTACTG CATAGGTACT GATATCGATA
CAGATTATTA CATGTGGACG CGAGACAGTG CTCTGTCTTT CAAGAACCTT GTCGACCGCT
TCACTGAAAC GTACGATGCG GGCCTGCAGC GCCGCATCGA GCAGTACATT GCTGCCAGG
TCACTCTCCA GGGCCTCACC AATCCATCTG GTTCTCTCTC AGACGGGTCT GGTCTTTGGC
AGCCCAAGTT TGAGTTAACC CTGAAGCCCT TCACTGGCAA CTGGGGTCGA CCGCAGCGGG
ATGGCCAGC TCTGCGGGCC ATTGCCTTGA TTGGCTACTC AAAGTGGCTC ATCAACAACA
ACTATCAGTC AACCGTGTCC AGCCTCATCT GGCCTATTGT GCGCAACGAC CTCAACTATG
TTGCGCAGTA CTGGTCAGTG GTTGCCTGCT CTGTGTAACA CTTGTGTCTA ACGTCTTCAC
TTCAGGAACC AAACCGGCTT TGACCTGTGG GAGGAAGTTA ATGGAAGCTC ATTCTTTACC
ACTGCCAACC AGCACCAGG TATGAAGCCC GACGGCTAAA CTTGCCATCG CTGTATATGA
GAATTACGGA CTAGCTCTCC AGCACTTGTG GAGGGCGCCA CCCTGTGCTG CACTCTCAGC
CAGCCGGCAA GCACCTTATC TTCTGTGCTT CCCCAAATCT TGTGCTTCTT CCAGCGATAT
TGGGTGTCTT CCGGTGGATA CGTCGACTCC AACAGTATGT CTCTTCATGC TCGTGGGTTT
TCGAGAAAGA CAATCACTAA TAGCTTGCGC CTAGTCAACA CCAACGAGGG TAGGACTGGA
AAGGATGCCA ACTCCATTCT CGCTGCTATC CACACCTTTG ATCCCAATCT TGGCCGTGAT
GCAGGCACCT TCCAGCCATG CAGCGACAAA GCTCTCTCCA ACCTCAAGGT CGTTGTGAC
TCCTTCCGCT CCATCTACGG CGTGAACAAG GGCATTTCCG CTGGTGTCTG CGCCGCCGTT
GGCAGATATC CAGAGGACGT GTACTTCAAC GGAAACCCTT GGTACCTTGC AACTTTTGTCT
GCTGCTGAGC AGTTGTACGA TGCCATCTAC GTCTGGAAGA AGACAGGCTC CATCACAGTG
ACTGCCATCT CTCTGGCCTT CTTCAGGAG CTGTGTTCCG GTGTGGCAGC TGGGACCTAC
TCCAGCAGCC AGTCGACCTT TACGAACATC ATCAACGCCG TGTCCACTTA CGCCGATGGC
TTCATCAGCG AGGCCGCCAA GTACGTCCCC GCCGACGGTT CGCTGGCCGA GCAGTTCGAC
CGCAACAACG GCACTCTCTT GTCCGCCCTC CACCTGACGT GGTCTGACGC CTCGTCTTTG
ACAGCCACCG CCCGCCGGC TGGCATCGTG CCCCCCTGCT GGGCAAACAG CAGCGCCAGC
TCGATTCTCT CGACATGCTC CGCGCGTCC GTGGTCCGAT CCTATTACAG TCCCACAGCC
ACGTCAATTC CTCCTCGCA AACGCCAAG CCCGGCGTTC CTTCCGGTAC TCCCTACAG
CCCCTGCCCT GCGCTACCCC AGCGTCCGTG GCCGTACCT TCCAGAGCT CGTGTGACG
CAGCTTGGCC AGACGGTCAA AGTTGCGGGC AGCGCCCCGG CCTGGGCAA CTGGAGCACG

AGCGCCGCTG TCGCTCTGGA CGCGTCAAC TACGCCGATA ACCATCCCCT GTGGATTTGG
TCGGTCAAGC TTGAGGCTGG AGATGTGCTT GAATACAAGT ACATCAATGT GGGTCAGGAT
GGTTCCGTGA CCTGGGAGAG TGACCCCAAC CACACTTACA CGGTTCCCTG GGTGGCTTGT
GTGACGCAGG TCGTCAAGGA GGACACCTGG CAGTCGTAA

```

ES 2 370 768 T3

Figura 10A-B Secuencia de ADN de *Trichoderma sp.*, (GA113) – 2088 pb (SEC ID No: 28)

```

ATGCATGTCT TGTCAAACGGC CGTCCTGCTC GGCTCGGTFG CCGTCCAAAA GGTCTGGGA
AGACCTGGCG CATCCGACAT TACAAAACGA GCCGTACTG ACTTCATCAA CTCGGAAACT
CCCATTGCC TGAACAATCT GATTTGCAAT GTTGGTCCCTG ACGGATGCCG TGCTTTTGGC
ACATCGATCG GCGCTGTAGT TCGGTCGCCA AGCACAACTG ACCCAGACTG TAAGCTAGTT
TTTGCATTAT ACTTCCACTA TCGTATATAC AATCTATATA TACAGTGCGC TAACACGAAT
CTAAACAAAG ACTTTTACAT GTGGACTCGA GATAGTGCTC TTGTTTTCAA GACGCTTGTT
GATCGGTCA CACAGAACTA CGATGCAGGC CTGCAGCGCC GCATCGAGCA GTACATTGCT
GCTCAGGTCA CTCTTCAGGG CATCTCAAAC CCATCTGGTT CCCTCTCAGA CGGGTCTGGC
CTTGGCGAGC CCAAGTTCGA GCTTACCTTG AGCCAGTTCA CTGGCAACTG GGGCCGCCCG
CAGCGTGATG GTCCAGCTCT TCGAGCCATT GCCTTGATFG GCTATTCAAA GTGGCTCATT
AGCAACAACCT ACCAGTCGAC AGTGTGGAAC ATCATTTGGC CCATTGTGCG AAATGATCTC
AATACGTFG CCCAGTACTG GTCAGTGATT GCTTGTTFPC TTGCCCGCTA TTCACTGGTT
CTTTGCTAAC CTTGACTTTT AGGAACCAA CTGGATTTGA CCTGTGGGAG GAGGTCAACG
GCAGCTCATT CTTGCTGTGTA GCCAACCCAGC ACCGAGCACT TGTTGAGGGT GCTACCCTTG
CCACTACTCT TGGCCAGTCG GGAAGCAGCT ATTCCACTGT TGCTCCTCAG ATTCTCTGCT
TCCTTCAAAA GTTCTGGTCG CCATCCGGAT ATGTCTCTC CAACAGTAAG CTATCAATGC
AGACCAATTT TGTAGATGAA TGCCTATGCT AACACTAGTC GGCGCAGTCA ACAGCAACGA
CGGCAGGACT GAAAAGGAT CCAACTCCAT TCTTACATCT ATTACACTT TCGATCCCAG
CATTGGCTGC GATGCCGCCA CTTTCCAGCC TTGCAGTGAC AAGGCTCTTT CAAACCTCAA
GGTCTACGTC GACTCCTTCC GCTCCATCTA TGGCGTCAAC TCGGGCATTG CTGCTGGCAC
TGCTGTGGCC GTTGGTAGAT ACCCAGAGGA CGTCTACTTT AACGGAAACC CCTGGTATCT
TTCTACTTIT GCTGTGCTG AGCAGCTGTA CGACGCCCTG TATGTCTGGA AGAAGACTGG
CTCCATCACC GTCACTTCCA CCTCTCTGGC TTCTTCCAAG AGCTCGTCCC CAGCGTGACA
GCCGGAACCT ACGCCAGCAG CTCGTCTACC TTCACCAGCA TCGTCAACGC CGTATCCACC
TACGCCGATG GATTCGTCAG CGAGGCGGCC AAGTACGTC CCTCTGATGG TTCTCTCTCC
GAGCAGTTG ACAAGAACAC CGGCACTCCT CTCTCCGCG TTCACCTGAC CTGGTCTGAT
GCCTCCTTCC TGA CTGCCAC GACCCGTCGC GCTGGCATG TCCCTCCTTC ATGGATTAGC
AGCGGCGCCA ACACCGTTC CTGCTCCTGC TCCGGCACGA CAGTGGCTGG TTCCTACTCA
AGTCCCACAG CCACGTCATT CCTCCGTC CAGACTCCA AGACTGCGGC TACTGGTACC
AGCTTCACTC CCATTGCTG CGCTACCCCA ACTTCCGTTG CTGTGACCTT CCACGAGCTT
GCTACGACCG TCCCCGGCCA GACAATCAAG GTCGTTGGCA ATGCCAGGCCCTGGGCAAC
TGGAGACCA GCGCCGTTGT TGCCCTGAAC GCGTCAACT GTGCTTCCAA CCACCTCTG
TGGATCGGAC CCGTCAATCT CAAGGCCGGA GACGTCGTC AGTACAAGTA TATCAACGTG

GGCTCAGACG GCTCCGTGAC TTGGGAGGCC GACCCCAACC AACTTACAC TGTCCTTGCA
GTGGCCTGTG TTACCCGAGT TGTTAAGGAG GACACCTGGC AGTCGTAA

```

Figura 11A-B Secuencia de ADN de *Trichoderma harzianum*, (GA103) – 2141 pb (SEC ID No: 30)

```

ATGCATGTGC TGTCGACTGC TGTGCTGCTT GGCTCAGTTG CCGTCCAAAA GGTTCGGGA
AGGCCAGGAT CGAACGGCCT GTCCGGGCTC ACAAACGAT CCGTGGATGA CTCATCAAC
ACACAGACTC CCATTGCACT AAACAACCTC CTTTGCAATG TTGGCCCTGA TGGGTGCCGT
GCCTTTGGTA CATCGGCCGG TGTGTGATT GCATCTCCGA GCACAACCTGA CCCAGACTGT
AAGTTTACT TATAGCGGA TATTCCTGAC ATGTCAAATT TCACATACTA ATACGAGGGT
AATTGATCAG ACTACTACAT GTGGACCGA GACAGTGCTC TTGTCTCAA GAACATTGTA
GACCGCTTCA CTGAGCAGTA TGATGCTGGC CTGCAGCGCC GCATCGAGCA GTATATTTCT
GCCAGGTCA CTCTCAGGG GATCTCAAAC CCTCTGGTT CTCTCTCGGA TGGTCTGGT
CTTGGTGAAC CCAAGTTGA GTTGACCTTG AGCCAGTTCA CTGGCAACTG GGGTCGCCG
CAGCGCATG GCCAGCTCT CCGAGCCATT GCCTTGATTG GCTATTCAA GTGGCTCATC
AACAAACT ACCAGTCAAC GGTGTCAAAC ATCATCTGGC CCATTGTGCG GAATGATCTC
AATPATGTG CCCAGTACTG GTTAGTACAA GCTCGCTGTC TCTCTGCTCT GTTTATGACT
AATCTAACA CCTTCACCTT AGGAATCAA CCGTTTCGA CCTGTGGGAG GAAGTCAATG
GTAGTTGCTT CTTTACCGTT GCCAACCCAG ACCGAGGTAT GTATCAATAT CTCATGTGTT
TTTAGTTGTC AATGCTGACG AGTCCCCCAG CTCCTGTGTA GGGCGCCACA CTTGCCGTA
CCCTCGGCCA GTCGGGAAGC ACCTATTCCT CTGTTGCTCC TCAGATCCTG TGCTTCTCC
AAAGATTCTG GGTGTGGGT GGATACATG ACTCCAACAG TAAGTACACC AGCACCACAT
GCTTTGATGA AGAGCGATAC TAAACAGCTT GTCATAGTCA ACACCAACGA GGGCAGGACT
GGAAAAGATG CCAACTCTCT TCTCGCATCT ATCCACACGT TCGATCCAG CCTTGGCTGT
GACGCCTCTA CCTTCCAGCC TTGCAGTGAC AAGGCTCTCT CCAACCTCAA GGTGTGTG
GACTCCTTCC GCTCCATCTA CAGTGTCAA AAGGGCATTC CCGCTGGCG TGCTGTGCC
GTCGGCAGAT ACCCCGAAGA CGTGTACTTT AACGGAAACC CCTGGTATCT CGCCAGTTC
GCTGCTGCCG AGCAATTGTA CGACTCCGTC TATGTCTGGA AGAAGACAGS CTCATCAG
GTGACTTCCA CTTCTTGGC CTTCTTCCAG GAGCTCGTTC CCGCGTCCG GGTGGAAC
TACTCCAGCA GCCAGTCTAC CTTTACGAGC ATCATCAAAC CCGTCTCGAC ATATGCTGAT
GGATTCCTCA GCGAGGCTGC CAAGTACGTC CCCGCTGATG GTTCGCTCCG CGAGCAGTTC
GATCGCAACA CCGGCAGCC TCTGTAGCC GTTCACTGA CCTGGTCTGA CGCTCGTTT
CTCACCGCCG CGGCCGTCG GGCTGGCGTT GTGCCCCCT CGTGGGCCAG CAGCGCGCT
AACTCAGTCC CTTCAAGCTG CTGGGAGCT TCTGTGGTTG GATCCTACTC GGTCTTACA
GCCACGTCT TCCCACGTC GCAGACCCC AAGCCTGGCG CTCCTTCTGG TGCTCCCTC
ACTCCCATTC CTTGTGCTAC CCCGGCTTC GTTGGCGTTA CCTTCCAGCA GCTTGCACA
ACCCAAATTG GCCAGACAAT CAAGGTCGCT GTAGCGCCC CCGAGCTGG CAACTGGAGC

ACGAGCGCG CCATTGCTCT GGATGCCGTC AACTATGCCA CTAACCATCC CCTGTGGATT
GGATCGGTCA ATCTGGAGGC CGGAGACGTC ATCGAGTACA AGTACATCAG CGTGGGCCAG
GATGGTTCCG TCACCTGGGA GAGCGACCCC AACCACACCT ACACTGTTCC TGCGGTGGCC
TGTGTACCCG AGGTGGTTAA GGAGGACACC TGGCAGTCGT A

```

Figura 12A-B Secuencia de ADNg de *Trichoderma longibrachiatum*, (GA124) – 2131 pb (SEC ID No: 32)

ATGCACGTCC TGTGACTGC GGTGCTGCTC GGTTCCGTTG CCGFTCAGAA GGTCCTGGGA
 AGGCCAGGAT CAAGCGTCT ATCTGACGTA ACCAAGAGAT CTGTTGACGA CTTCATCAGC
 ACCGAGACTC CTATTGCACT GAACAACCTT CTCTGCAATG TTGGTCCCTGA TGGATGTCGT
 GCATTTGGCA CATCAGCTGG TCGGTTGATT GCATCTCCCA GCACAATTGA CCCGGACTGT
 AAGTGTATCA ATACCGTTGA TCTATGTTTA TCGCATGCTG AGACGGGGAC AGACTATTAC
 ATGTGGAGCG GAGACAGCGC TCTTGCTTTC AAGAACCTCG TCGACCGCTT CACCGAAACG
 TACGATGCTG GCCTGCAGCG CCGCATTGAG CAGTACATCA CTGCCCAGGT CACTCTCCAG
 GGCTCTCCA ACCCATCGGG TTCCCTTACG GACGGATCTG GCCTGGGCGA GCCCAAGTTT
 GAGCTGACCC TGAAGCCATT CACCGGCAAC TGGGGTCGAC CGCAGCGCGA CGGCCACGCT
 CTGCGAGCCG TTGCCTTGAT TGGATACTCC AAGTGGCTCA TCAACAACAA CTATCAGTCA
 ACTGTGTCCA ACGTCATCTG GCCGATTGTG CGCAACGACC TCAACTACGT TGCTCAGTAC
 TGGTTAGTGA TTACTTGCTC TTGAATTACT GCTTGCATCT GACCTCTTTA TCGTAGGAAC
 CAGACYGGCT TTGACCTGTG GGAGGAAGTG AATGGAAGCT CGTTCCTTAC CATGGCCAAC
 CAGCACCGAG GTATGAAGCA CAACGTCTAT ACTCGCCGTC APTACATGTG AGCATTACTG
 ACCCGCTATC CAGCACTTGT CGAGGGTGCT ACTCTTGCTG CCACTCTTGG CCAGTCGGGA
 AGCACTTATT CATCTGTGTC TCCCCAGATC TTGTGCTTCC TCCAACGATT CTGGGTGTCTG
 TCGGGCGGAT ATGTGACTC CAACAGTATG TCTTCCACGG CTGTTATGAT TGTGACAAT
 GACAAGTACT AACAGCTCGC TTCTAGTCAA CACCAACGAG GGCAGGACTG GCAAGGATGT
 CAACTCCGTT CTGACTTCCA TCCACACCTT TGATCCCAAC CTTGGCTGTG ATGCAGCCAC
 CTTCCAGCCA TGCAGTGACA AGGCGCTCTC CAATCTCAAG GTTGTGTGTC ACTCCTCCG
 CTCCATCTAC GGCCTGAACA AGGGCATTCC TGCCGGTGCT GCCGTCCGCA TTGGCCGATA
 TGCAGAGGAT GTGTACTTCA ACGGTAACCC TTGGTATCTT GCCACGTTTG CTGCGCCGGA
 ACAGCTGTAC GATGCCATCT ATGTCTGGAA GAAGACGGGC TCTATCACGG TTACTGCCAC
 CTCCCTGGCC TTCTTCCAGG AGCTTGTTC CGGCGTGGCG GCCGGGACCT ACGCCAGCAG
 CTCGTGACC TTTACGAACA TCATCAACGC CGTCTGACA TACGCCGATG GCTTCCCTCAG
 CGAGGCAGCC AAGTACGTTT CCGCCGACGG TTCGCTGGCC GAGCAGTTTG ACCGCAACAG
 CGGCACTCCG CTGTCCGCCC TTCACCTGAC GTGGTGTGAC GCCTCGTTTC TGACAGCCAC
 GGCCCGTCCG GCTGGCATCG TGCCCCCTC GTGGGCAAAC AGCAGCGCCA GCACGATCCC
 CTCCACGTGC TCCGGCGCGT CCGTGGTCCG ATCCTACTCG CGTCCCACAG CCACGTCATT
 CCCTCCGTCG CAGACGCCCA AGCCTGGCGT TCCCTCCGCT ACGCCCACA CTCCCTGCC
 CTGCGCCACC CCAACGTCCG TGCCCGTAC CTTCCACGAG CTCGTGTGGA CACAGTTTGG
 CCAGACGGTC AAGETCGCGG GCAACGCTCC GGCCCTCGGC AACTGGAGCG CAAGCGCCGC
 CGTGGCTCTC GATGCCATCA ACTATGCCGA CAACCACCCG CTGTGGATCG GAACGGTQGA

CCTCGAGGCT GGGGATGTCTG TCGAGTACAA GTACATCAAT GTCGGCCAGG ATGGCTCCGT
 GACCTGGGAG AGTGACCCCA ACCACACTTA CACGGTTCTT CCGGTGGCCT GTGTGACGCA
 GGTTGTCAAG GAGGACACCT GGCAGTCGTA A

ES 2 370 768 T3

Figura 13A-B Secuencia de ADN de *Trichoderma asperellum*, (GA127) – 2151 pb (SEC ID No: 34)

ATGCACGTCC TGTCGACTGC GGTGCTACTT GGCTCAGTTG CCGTCCAAAA GGTCTGCGGA
 AGACCAGGAT CAAACGGCCT GTCCGGCGTC ACAAACGAT CTGTGGATGA CTTTATCAAC
 ACACAGACTC CCATTGCTTT AAACAACCTT CTTTGCAATG TTGGCCCTGA TGGATGCCGT
 GCCTTTGGTA CATCGGCCGG TGCTGTGATT GCATCTCCGA GCACAACGA CCCAGACTGT
 AAGTTTGACC TATACTGGCA TATTCCTGAT ATGTCAAAGT TCATATACTA ACACGAGGGT
 AATTAATCAG ACTACTACAT GTGGACGCGA GATAGTGCTC TTGTCTTCAA GAACATGTTC
 GACCGCTTCA CTCAGCAGTA TGATGCCGGC CTGCAGCGCC GCATCGAGCA GTACATTTCT
 GCCCAGGTCA CTCTCAGGG CATCTCAAAC CCTCTGGCT CTCTCTCGGA CGGATCCGGT
 CTTGGTGAAC CCAAGTTGA GTTGACCTTG AGCCAGTCA CTGGCAACTG GGGTCGCCCG
 CAGCGCGATG GCCCAGCTCT CCGAGCCATT GCCTTGATTG GTTATTGAA GTGGCTCATC
 AACAACAACT ACCAGTCAAC GGTGTCAAAT ATCATCTGGC CCATGTGCG GAATGACCTC
 AACTATGTTG CTCAATACTG GTTAGTACAA GCTCGCTGTC TTTTCGTTG TTTATGATTTG
 ATCTAACAT CTTCACTTCA GGAACCAAAC CGGATTCGAT CTGTGGGAGG AAGTTAATGG
 TAGCTCGTTC TTTACCGTTG CCAACCAGCA CCGAGGTATG TATCAACATC TCATGTGCAA
 TTTTGTAGTTG GAAATAAACA ATACTGACGA GTTCTCCAGC TCTGTGTGAG GCGCCACAC
 TTGCTGCCAC CCTCGGCCAG TCGGGAAGCA CCTATTCTCT AGTTGCGCCT CAGATCCTGT
 GCTTCTTCCA GAGGTCTTGG GTGTCCGGTG GATACATGA CTCCAACAGT AAGTCCACCA
 GCACCATATG CTTTGTATGA GGGCGATACT AACACAGTTG CTATAGTCAA CACCAACGAG
 GGCAGGACTG GAAAAGATGC CAACTCTCTT CTGCACTA TCCACACGTT CGATCCTAGC
 CTTGGCTGTG ACGCCTCCAC CTTCCAGCCT TGCAGTGACA AAGCCCTCTC CAACCTCAAG
 GTCGTTGTAG ACTCCTTCCG CTCCATCTAC GGTGTCAACA AGGGCAITCC CGTGGCTCT
 GCTGTGCCA TCGGCAGATA CCCCAGAAC GTGTACTTTA ACGGAAACCC CTGGTATCTC
 GCTACGTTG CTGCTGCCGA GCAACTTTAC GACTCGTCT ATGTCTGGAA GAAGACAGGC
 TCCATCAGG TGACTTCCAC TTCTTTGGCC TTCTTCCAGG AGCTCGTCC CCGGCTCGCG
 GCTGGAACTT ACTCCAGCAG CCAGTCTACC TTCACGAGCA TCATCAACGC CGTCTCGACA
 TATGCTGATG GATTCTCAG CGAGGCTGCC AAGTACGTC CCGCTGATGG TTCGCTCGCC
 GAGCAGTTG ATCGCAACAC CGGCACACCT CTGTCAGCCG TTCACCTGAC CTGGTCTGAC
 GCCTCGTTTC TCACCGCCGC GGCCCGTCGG GCTGGCGTTG TCCCCCTC ATGGGCCAGC
 AGCGCGCTA ACTCAGTTC TTCAAGCTGC TCGGGAGCTT CTGTGGTTGG ATCTACTCG
 CGTCTACAG CCACGTCAT CCCACCATCG CAGACCCCA AGCCTGGCGT TCCTTCTGGT
 ACTCCCTTCA CTCCATTC CTGTGCTACC CCGACTTCCG TTGCTGTAC TTCCACGAG
 CTTGCCACAA CGCAGTTTG TCAGACTATC AAGTTCGCTG GTAGCGCTCC CGAGCTGGGC
 AACTGGAGCA CGAGCGCGC CATTGCTCTG GATGCCGTC ACTATGCCAC TAACCACCTT

CTGTGGATTG GATCAGTCAG TCTGGAGGCC GGAGACGTTA TCGAGTACAA GTACATCAAC
 GTGGGCCAGG ATGGTTCGT CACCTGGGAG AGCGATCCCA ACCACACCTA CACTGTCCCT
 CGGGTGGCCT GTGTACTGA GGTGGTTAAG GAGGACACCT GGCAGTCGTA A

ES 2 370 768 T3

Figura 14A-B Secuencia de ADN de *Trichoderma strictipilis*, (GA128) – 2142 pb (SEC ID No: 36)

ATGCACGTCC TGTCGACTGC GGTGCTGCTC GGCTCCGTTG CCGTTCAAAA GGCTCTGGGA
 AGACCGGGAT CAAGCGGTCT ATCTGACATC ACCAAGAGAT CCGTCGACGA CTTTCATCAGC
 ACCCAGACTC CTATTGCACT GAACAACCTT CTCTGCAATG TTGGTCCCAG TGGATGTGCT
 GCATTTGGCA CATCCGCTGG TGCGGTATT GCATCCCCCA GCACAACCTGA CCCCGACTGT
 AAGTTGGAAC TGTACCGGC ATAAACCCAC AGGATGTGTA TCGCATACTG AGATCGAGAC
 AGACTATTAC ATGTGGACGC GAGACAGCGC TCTTGTCTTC AAGAACCCTG TCGACCGCTT
 CACCGAAACG TACGATGCTG GCCTGCAGCG CCGCATCGAG CAGTACATTA CTGCCCAGGT
 CACTCTCCAG GGCTCACCA ACCCATCAGG TTCCTCGCG GACGGGTCTG GCCTTGGCGA
 GCCCAAGTPT GAGTTGACCC TGAGTCCCTT CACCGCAAC TGGGGTCGAC CGCAGCGGGA
 TGGCCAGCT CTGCGAGCCA TTGCCTTGAT TGGCTATTCG AAATGGCTTA TCAACAACAA
 CTATCAGTCA ACCGTGTCCA ACGTCATCTG GCCTATTGTG CGCAACGACC TCAGCTACGC
 TGCTCAGTAC TGGTTAGTGA CAGCTTACCC TCGAATTACG GCTCGTGTCT AACGTCTTCA
 CTACAGGAAC CAGACCGCT TTGATCTGTG GGAAGAGGTT AGCGGAAGCT CTTTTTTTAC
 TGTTCGAAC CAGCACCAG GTATGAAGCA AAACGTCCAC ACTCACTGTC ACTGTATATG
 AACGCTACTG ACCAGCTCCC CAGCTCTGTG TGAGGGTCC ACGCTTGTG CCACGCTCGG
 CCAGTCGGGA AGCACCTATT CATCTGTTC TCCCCAATC TTGTGCTTTC TCCAACGATT
 CTGGGTGTCG TCCGGTGGAT ACGTCGACTC CAACAGTATG TCCTTCGCTG CPTCATGGATT
 TGGAAAAGTPT CTGTTACTAA TGCCAGCTCG CCTCTAGTCA ACACGAATGA GGGTAGGACT
 GGAAAGGATG TCAACTCCAT TCTCACTTCC ATCCACACCT TCGATCCCAA CCTTGGCTGT
 GACGCAGGCA CTTCCAGCC ATGCAGTGAC AAAGCCCTCT CCAACTCAA GGTGTGTGTC
 GACTCCTTCC GCTCCATCTA CGGCGTGAAC AACGGCATTC CTGCTGGTGC TGCCGTCGCC
 ATTTGGCAGAT ATCCAGAGGA TGTGTACTTC AACGGGAACC CTTGGTACCT TGCCACGTTT
 GCTGTGCTG AGCAGCTGTA CGACGCCATC TACGTCTGGA AGAAGACGGG CTCATCACA
 GTGACTGCCA TCTCTCTGCG CTTCTTCCAG GAGCTTGTTC CCGGCGTGAC AGCTGGGACC
 TACTCCAGCA GCCAGTCGAC TTTCACCAAC ATCATCAACG CTGCCTCGAC ATACGCCGAT
 GGCTTCGTCA CCGAGGCTGC CAAGTACGTT CCCACCGACG GTTCGCTGGC CGAGCAGTTC
 GACCGCAACA ACGGCACTCC GCTGTCCGCC CTTACACTGA CGTGGTCGTA CGCCTCGTTC
 TTGACTGCTT CGGCCCGTCG GGCTGGCGTC GTGCCCCCTT CGTGGGCAAA CAGCAGTGCC
 AGCTCGATTT CTTGACGCTG CTCCGGCGCG TCCGTGGTGC GATCCTACTC GAGTCCCACA
 GCCACGTCAT TCCCTCCGTC GCAGACGCC AAGCCCGGCG TTCTTCCGG TACCCCTAC
 ACGCCCTGCT CTTGCGCTAC CCCAACGTCC GTGGCCGTCA CCTTCCACGA GCTCGTGTG
 ACACAGTTTG GCCAGACGGT CAAGGCCGCG GGCAGCGCTC CGGCCCTGGG CAACTGGAGC

 ACGAGCGCGG CTGTCGGTCT GGACGCCGTC AACTACGCCG ATAACCACCC CCTGTGGATT
 GGGACGGTGC AGCTGGAGGC TGGAGACGTC GTTGAGTACA AGTACATCAA TGTGGGTCAG
 GATGGCTCCG TGACCTGGGA GAGTGACCCC AACCACACTT ACACGGTTC TCGGTGGCT
 TGTGTGACGG AGGTCGTCAA GGAGGACACC TGGCAGTCGT AA

Figura 15A-I

a) Posible secuencia de aminoácidos de la glucoamilasa de *Hypocrea citrina* var. *americana* (CBS976.69), (GA102) que tiene 632 aminoácidos (SEC ID No: 6), en la que la secuencia de la proteína madura está representada por las posiciones de los residuos de aminoácidos 34 – 632 (SEC Id No: 17)

MHVLSTAVLL GLVAVQKVLG RPGLNGVPDV TKRSVDDFIS NESPIALNNL LCNVGPDGCR
 AFGASAGTVA ASPSTTDPDY YYMWRDSAL IFKTVVDRFT QNYDASLQKR IEQYIAAQAT
 LQGISNPSGS LADGSGLGEP KFELTLNQFT GHWGRPQRDG PALRAIALIG YSKWLIDNNY
 QSTVSDIWP ILRNDLNYVA QYWNQTGF DL WEEVEGSSFF TVANQHRALV EGATLAAILG
 QSGSSYSAVA PQILCFLQKF WVSSGGYVNS NINS DINRTG KDANSLASI HTFDP SIGCD
 PATFQPCSDK ALSNLKSVVD SFRSIYGVNQ GISAGSAVAI GRYSEDVYFN GNPWYLATFA
 AAEQLYDSL Y VWKQTGSITV TAIPLAFFQE LVP GVAAGTY LSSQSTFTSI VNAV SAYADG
 FLNEAAKYVP SDGSLAEQFD KNNGTPLSAV HLTWSYASFL TATARRAGSV PPSWANSNAT
 SIPTACSGTS VVGSYSSPTA TSFPPSQTPK VGKPTGTPFT PIPCATPTSV AVTFHELPTT
 QFGQTIKLAG SAEALGNWST GAAVGLDAAN YASNHPLWFG TLNLQAGDVI EYKYINVGKD
 GSVTWESDPN HTYTVPAVAC VTEVVKEDTW QS

1b) Secuencia de la proteína madura para GA102 (SEC ID No: 17)

SVDDFISNESPIALNNLLCNVGPDGCR AFGASAGTVAASPSTTDPDY YYMWRDSALIFKTVVDRFTQNYDASL
 QKRIEQYIAAQATLQGISNPSGSLADGSGLGEPKFELTLNQFTGHWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLIDNNYQ
 STVSDIWPILRNDLNYVAQYWNQTGF DLWEEVEGSSFFTVANQHRALVEGATLAAILGQSGSSYSAVAPQILC
 FLQKFWVSSGGYVNSNINS DINRTGKDANSLASIHTFDP SIGCDPATFQPCSDKALSNLKSVD SFRSIYGVN
 QGISAGSAVAIGRYSEDVYFNPNWYLATFAAAEQLYDSL YVWKQTGSITVTAIPLAFFQELVPGVAAGTYLSS
 QSTFTSIVNAV SAYADGFLNEAAKYVPSDGSLAEQFDKNNGTPLSAVHLTWSYASFLTATARRAGSVPPSWANS
 NATSIPTACSGTSVVGSYSSPTATSFPSPQTPKVGKPTGTPFTPIPCATPTSV
 AVTFHELPTTQFGQTIKLAGSAEALGNWSTGAAVGLDAANYASNHPLWFGTLNLQAGDVI EYKYINVGKDGSVT
 WESDPNHTYTVPAVACVTEVVKEDTWQS

2a) Posible secuencia de aminoácidos de la glucoamilasa de *Hypocrea vinosa* (CBS960.68), (GA104) que tiene 631 aminoácidos (SEC ID No: 8), en la que la secuencia de la proteína madura está representada por las posiciones de los residuos de aminoácidos 34 – 631 (SEC Id No: 18)

MHVLSTAVLL GSVAVQKVLG RPGSNGLSGV TKRSVDDFIN TQTPIALNNL LCNVGPDGCR
 AFGTSAGAVI ASPSTTDPDY YYMWRDSAL VFKNIVDRFT QOYDAGLQRR IEQYISAQVT
 LQGISNPSGS LSDGSGLGEP KFELTLSQFT GNWGRPQRDG PALRAIALIG YSKWLINNNY

QSTVSNIIWP IVRNDLNYVA QYWNQTGF DL WEEVNGSSFF TVANQHRALV EGATLAATLG
 QSGSTYSSVA PQILCFLQRF WVSGGYIDS N INTNEGRTGK DANSLLASIH TFDPSLGCD A
 STFQPCSDKA LSNLKVVD S FRSIYGVNKG IPAGSAVAIG RYPEDVYFNG NPWYLATFAA
 AEQLYDSVYV WKKTGSITVT STSSAFFQEL VPGVAAGTYS SSQSTFTSII NAISTYADGF
 LSEAAKYVPA DGSLAEQFDR NTGTPLSAVH LTWSYASFLT AAARRAGVVP PSWASSGANT
 VPSSCSGASV VGSYSRPTAT SFPPSQTPKP GVPSTPFTP IPCATPTSVA VTFHELATTQ
 FGQTIKVAGS APELGNWSTS AAIALDAVNY ATNHPLWIGS VNLEAGDVIE YKYINVGQDG
 SVTWESDPNH TYTVPVAVACV TEVVKEDTWQ S

1b) Secuencia de la proteína madura para GA104 (SEC ID No: 18)

SVDDFINTQTPIALNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVIASPSTTDPDY YMMWTRDSALVFKNIVDRFTQOYDAGL
 QRRIEQYISAQVTLQGISNPSGSLSDGSGLGEPKFELTSLQFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQ
 STVSNIIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGF DLWEEVNGSSFFTVANQHRALVEGATLAATLGQSGSTYSSVAPQILC
 FLQRFVWVSGGYIDSNINTNEGRTGKDANSLLASIH TFDPSLGCDASTFQPCSDKALSNLKVVD SFRSIYGVNKG
 GIPAGSAVAIGRYPEDVYFNGNPWYLATFAAAEQLYDSVYVWKKTGSITVTSTSSAFFQELVPGVAAGTYSSSQ
 STFTSIIINAISTYADGFLSEAAKYVPADGSLAEQFDRNTGTPLSAVH LTWSYASFLTAAARRAGVPPSWASSG
 ANTVPSSCSGASVGSYSRPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPFTP IPCATPTSVA
 VTFHELATTQFGQTIKVAGSAPELGNWSTSAAIALDAVNYATNHPLWIGSVNLEAGDVIEYKYINVGQDGSVTW
 ESDPNHTYTVPVAVACVTEVVKEDTWQS

3a) Posible secuencia de aminoácidos de la glucoamilasa de *Trichoderma sp.* (GA105) que tiene 633 aminoácidos (SEC ID No: 10), en la que la secuencia de la proteína madura está representada por las posiciones de los residuos de aminoácidos 34 – 633 (SEC ID No: 19)

MHVLSTAVLL **GSVAVQKVLG** **RGSSGLYDV** **TKRSVDDFIS** TETPIALNNL LCNVGPDGCR
 AFGTSAGAVI ASPSTTDPDY YMMWTRDSAL VFKNLVDRFT EEYDAGLQRR IEQYITAQVT
 LQGLTNPSGS LSDGSGLGEP KFELTLQPFT GNWGRPQRDG PALRAIALIG YAKWLINNNY
 QSTVSSVIWP IVRNDLNYVA QYWNQTGF DL WEEVDGSSFF TVANQHRALV EGATLVATLG
 QSGDTYSSVA PQVLCFLQRF WVSSGGYIDS NINTNEGRTG KDANSILTSI HTFDPNLGCD
 AGTFQPCSDK ALSNLKVVD SFRSIYSLNK GIPAGAAVAI GRYPEDVYFN GNPWYLATFA
 AAQLYDAVY VKKETGSITV TATSLAFFQE LVPGVTAGTY SSSSSSTFTT IINAVSTYAD
 GFLSEAAKYV PADGSLAEQF DRNNGTALSA RHLTWSYASF LTATARRAGV VPPSWANSSA
 STIPSTCSGA SVVGSYSRPT ATSFPPSQTP KPGVPSGTPY TPLPCATPTS VAVTFHELVS
 TQFGQTVKVA GSAQALGNWS TSAAVALDAV NYADNHPLWI GTVNLEAGDV VEYKYINVGQ
 DGSVTWESDP NHTYTVAVA CVTQVVKEDT WQS

3b) Secuencia de la proteína madura para GA105 (SEC ID No: 19)

SVDDFISTETPIALNLLCNVGPDCRAFGTSAGAVIASPSTTDPDYIYMWTRDSALVFKNLVDRFTEEYDAGL
 QRRIEQYITAQVTLQGLTNPSGSLSDGSGLGEPKFELTLQPF TGNWGRPQRDGPALRAIALIGYAKWLINNNYQ
 STVSSVIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGF DLWEEVDGSSFFTVANQHRALVEGATLVATELGQSGDTYSSVAPQVLC
 FLQRFVWSSGGYIDSNTNEGRGTGKDANSILTSIH TFDPNLGCDAGTFQPCSDKALSNLKVVD SFRSIYSLN
 KGIPAGAAVAIGRYPEDVYFNGNPWYLATFAAAEQLYDAVYVWKETGSITVTATSLAFFQELVPGV TAGTYSS
 SSSFTTIIINAVSTYADGFLSEAAKYVPADGSLAEQFDRNNGTALSARHLTWSYASFLTATARRAGVVP SWAN
 SSASTIPSTCSGASVVGYSRPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPYTPLPCATPTS
 VAVTFHELSTQFGQTVKVAGSAQALGNWSTSAVALDAVNYADNHPLWIGTVNLEAGDVVEYKYINVGQDGSV
 TWESDPNH TYTTPAVACVTQVVKEDTWQS

4) Posible secuencia de aminoácidos de la glucoamilasa de *Hyprocrea gelatinosa* (CBS254.62) (GA107) que tiene 631 aminoácidos (SEC ID No: 12), en la que la secuencia de la proteína madura está representada por las posiciones de los residuos de aminoácidos 34 – 631 (SEC ID No: 20)

MHVLSTAVLL GSAVAVQKVLG RPGSNGLSGV TKRSVDDFIN TQTPIALNLL LCNVGPDCR
 AFGTSAGAVI ASPSTTDPDY YMWTRDSAL VFKNIVDRFT QQYDAGLQRR IEQYISAQVT
 LQGSPNPSGS LSDGSGLGEP KFELTLSQFT GNWGRPQRDG PALRAIALIG YSKWLINNNY
 QSTVSSIIWP IVRNDLNYVA QYWNQTGF DLWEEVNGSSFF TVANQHRALV EGATLAATLG
 QSGSTYSSVA PQILCFLQRF WVSGGYIDSN INSNDGRTGK DANSL LASIH TFDPSLGCD
 STFQPCSDKA LSNLKVVD SFRSIYGVNKG ISAGSAVAIG RYPEDVYFNG NPWYLATFAA
 AEQLYDSVYV WKKTGSI TSTSLAFFQEL VPGVAAGTYS SSQSTFTSIV NAVSTYADGF
 LSEAAKYVPA DGS LAEQFDR NTGTPLSAVH LTWSYASFFT AAARRSGVVP PSWASSGANS
 IPATCSGASV VGSYSSPTAT SFPPSQTPKP GVPSTPFTPLPCATPTSVA VTFHELATQ
 FGQNIKVAGS APELGNWSTS AAIALDAVNY ATNHPLWIGS VNLEAGDVIE YKYINVGQDG
 SVTWESDPNH TYTTPAVACV TEVVKEDTWQ S

4b) Secuencia de la proteína madura para GA107 (SEC ID No: 20)

SVDDFINTQTPIALNLLCNVGPDCRAFGTSAGAVIASPSTTDPDYIYMWTRDSALVFKNIVDRFTQQYDAGL
 QRRIEQYISAQVTLQGPSNPSGSLSDGSGLGEPKFELTLSQFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQ
 STVSSIIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGF DLWEEVNGSSFFTVANQHRALVEGATLAATLGQSGSTYSSVAPQILC
 FLQRFVWSSGGYIDSNINSNDGRTGKDANSL LASIH TFDPSLGCDASTFQPCSDKALSNLKVVD SFRSIYGVN
 KISAGSAVAIGRYPEDVYFNGNPWYLATFAAAEQLYDSVYVWKKTGSI TSTSLAFFQELVPGVAAGTYSSSQ
 STFTSIVNAVSTYADGFLSEAAKYVPADGSLAEQFDRNTGTPLSAVHLTWSYASFFTAARRSGVVP SWASSG
 ANSIPATCSGASVVGYSRPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPFTPLPCATPTSVA

VTFH~~EL~~ATTQFGQNIKVAGSAPELGNWSTSAALDAVNYATNHPLWIGSVNLEAGDVIEYKYINVGQDG
SVTWESDPNHTYTVPAVACVTEVVKEDTWQS

5a) Posible secuencia de aminoácidos de la glucoamilasa de *Hyprocrea orientalis* (ATCC90550) (GA108) que tiene 632 aminoácidos (SEC ID No: 14), en la que la secuencia de la proteína madura está representada por las posiciones de los residuos de aminoácidos 34 – 632 (SEC Id No: 21)

MHVLSTAVLL GSAVQKVLG RPGSSGLSDV TKRSVDDFIS TETPIALNNL LCNVGPDGCR
AFGTSAGAVI ASPSTIDPDY YYMWTRDSAL VFKNLVDRFT ETYDAGLQRR IEQYITAQVT
LQGLSNPSGS LTDGSGLGEP KFE~~LT~~LQPF~~T~~ GNWGRPQRDG PALRAIALIG YSKWLINNNY
QSTVSNVIWP IVRNDLNYVA QYWNQTGFDL WEEVKGSSFF TIANQHRALV EGATLAATLG
QSGSTYSSVA PQILCFLQRF WVSSGGYVDS NINTNEGRTG KDVNSILTSI HTLDPNLGCD
AGTFQPCSDK ALSNLKVVVD SFRSIYGVNK GIPAGAAVAI GRYAEDVYFN GNPWYLATFA
AAEQLYDAVY VWKKTGSITV TATSLAFFQE LVPGVAAGTY ASSSSTFTNI INAVSTYADG
FLSEAAKYVP ADGSLAEQFD RNSGTPLSAL HLTWSYASFL TATARRAGIV PPSWANSAS
TIPSTCSGAS VVGSYSRPTA TSFPPSQTPK PGVPSGTPYT PLPCATPTSV AVTFHEL~~V~~ST
QLGQTVKVAG NAPALGNWST SAAVALDAVN YADNHPLWIG TVDLEAGDVV EYKYINVGQD
GSVTWESDPN HTYTVPAVAC VTQVVKEDTW QS

5b) Secuencia de la proteína madura para GA108 (SEC ID No: 21)

SVDDFISTETPIALNNLLCNVGPDGCR~~AF~~GTSAGAVIASPSTIDPDY~~YY~~MWTRDSALVFKNLVDRFTET~~Y~~DAGL
QRRIEQYITAQVTLQGLSNPSGSLTDGSGLGEPKFE~~LT~~LQPF~~T~~GNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQ
STVSNVIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDLWEEVKGSSFF~~T~~IANQHRALVEGATLAATLGQSGSTYSSVAPQILC
FLQRFVWSSGGYVDSNINTNEGRTGKDVNSILTSIHTLDPNLGCDAGTFQPCSDKALSNLKVVVDSFRSIYGVN
KGIPAGAAVAIGRYAEDVYFNGNPWYLATFAAAEQLYDAVYVWKKTGSITVTATSLAFFQELVPGVAAGTYASS
SSTFTNIINAVSTYADGFLSEAAKYVPADGSLAEQFDRNSGTPLSALHLTWSYASFLTATARRAGIVPPSWANS
SASTIPSTCSGASVVGSYSRPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPYTPLPCATPTSV
AVTFHEL~~V~~STQLGQTVKVAGNAPALGNWSTSAVALDAVNYADNHPLWIGTVDLEAGDVVEYKYINVGQD
GSVTWESDPNHTYTVPAVACVTQVVKEDTWQS

6a) Posible secuencia de aminoácidos de la glucoamilasa de *Trichoderma konilangbra* (GA109) que tiene 632 aminoácidos (SEC ID No: 16), en la que la secuencia de la proteína madura está representada por las posiciones de los residuos de aminoácidos 34 – 632 (SEC Id No: 22)

MHVLSTAVLL GSAVQKVLG RPGSSGLSDV TKRSVDDFIS TQTPIALNNL LCNVGPDGCR
AFGTSAGAVI ASPSTIDPDY YYMWTRDSAL VFKNLVDRFT ETYDAGLQRR IEQYIAAQVT

LQGLTNPSGS LSDGSGLGEP KFELTLKPFT GNWGRPQRDG PALRAIALIG YSKWLINNNY
 QSTVSSLIWP IVRNDLNYVA QYWNQTGF DL WEEVNGSSFF TTANQHRALV EGATLAATLS
 QPASTYSSVA PQILCFLQRY WVSSGGYVDS NINTNEGRTG KDANSILAAI HTFDPNLGRD
 AGTFQPCSDK ALSNLKVVVD SFRSIYGVNK GIPAGAAA AV GRYPEDVYFN GNPWYLATFA
 AAELYDAIY VWKKTGSITV TAISLAFFQE LVPGVAAGTY SSSQSTFTNI INAVSTYADG
 FISEAAKYVP ADGSLAEQFD RNNGTPLSAL HLTWSYASFL TATARRAGIV PPSWANSAS
 SIPSTCSGAS VVGSYSRPTA TSFPPSQTPK PGVPSGTPYT PLPCATPASV AVTFHELVST
 QLQGTVKVAG SAPALGNWST SAAVALDAVN YADNHPLWIG SVELEAGDVV EYKYINVGQD
 GSVTWESDPN HTYTVPAVAC VTQVVKEDTW QS

6b) Secuencia de la proteína madura para GA109 (SEC ID No: 22)

SVDDFISTQTPIALNNLLCNVGPDCRAF GTSAGAVIASPSTTDPDY YMWTRDSALVFKNLVDRFTETYDAGL
 QRRIEQYIAAQVTLQGLTNPSGSLSDGSGLGEPKFELTLKPFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQ
 STVSSLIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGF DLWEEVNGSSFFTTANQHRALVEGATLAATLSQPASTYSSVAPQILC
 FLQRYWVSSGGYVDSNINTNEGRTGKDANSILAAIHTFDPNLGRDAGTFQPCSDKALS NLKVVVDSFRSIYGVN
 KGIPAGAAA AVGRYPEDVYFNGNPWYLATFAAAEQLYDAIYVWKKTGSITVTAISLAFFQELVPGVAAGTYSSS
 QSTFTNI INAVSTYADGFISEAAKYVPADGSLAEQFDRNNGTPLSALHLTWSYASFLTATARRAGIVPPSWANS
 SASSIPSTCSGASVVGSYSRPTATSFPSPKPGVPSGTPYTPLPCATPASV
 AVTFHELVSTQLQGTVKVAGSAPALGNWSTSAVALDAVNYADNHPLWIGSVELEAGDVVEYKYINVGQD
 GSVTWESDPNHTYTVPAVACVTQVVKEDTWQS

7a) Posible secuencia de aminoácidos de la glucoamilasa de *Trichoderma* sp. (DAOM177690) (GA113) que tiene 627 aminoácidos (SEC ID No: 29), en la que la secuencia de la proteína madura está representada por las posiciones de los residuos de aminoácidos 31 – 627 (SEC ID No: 43)

MHVLSTAVLL GSAVQKVLG RPGASDITKR AVTDFINSET PIALNNLICN VGPDCRAF G
 TSIGAVVASP STTDPDYFYM WTRDSALVFK TLVDRFTQKY DAGLQRRIEQ YIAAQVTLQG
 ISNPSGSLSD GSGLGEPKFE LTLSQFTGNW GRPQRDGPAL RAIALIGYSK WLISNNYQST
 VSNIIWPIVR NDLNYVAQYW NQTGF DLWEE VNGSSFFAVA NQHRALVEGA TLATTLGQSG
 SSVSTVAPQI LCFLQKFWSP SGYVISNINS NDGRTGKDSN SILTSIH TFD PSIGCDAATF
 QPCSDKALS N LKVYVDSFRS IYGVNSGIPA GTAVAVGRYP EDVYFNGNPW YLSTFAVAEQ
 LYDALYVWKK TGSITVTSTS LAFFQELVPS VTAGTYASSS STFTSIVNAV STYADGFVSE
 AAKYVPSDGS LSEQFDKNTG TPLSAVHLTW SYASFLTATT RRAGIVPPSW ISSGANTVPS
 SCSGTTVAGS YSSPTATSFP PSQTPKTAAT GTSFTPIACA TPTSVAVTFH ELATTVPGQT
 IKVVGNAQAL GNWSTSAGVA LNAVNCASNH PLWIGPVNLK AGDVVEYKYI NVGSDGSVTW
 EADPNHTYTV PAVACVTAVV KEDTWQS

7b) Secuencia de la proteína madura para GA113 (SEC ID No: 43)

AVTDFINSETPIALNNLICNVGPDGCRAFGT SIGAVVASPSTTDPDYFYMWTRDSALVFKTLVDRFTQKY
 DAGLQRRIEQYIAAQVTLQGISNPSGSLSDGSGLGEPKFEFTLSQFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSK
 WLISNNYQSTVSNIIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDLWEEVNGSSFFAVANQHRALVEGATLATTLGQSG
 SSVSTVAPQILCFLQKFWSPSGYVISNINSNDGRTGKDSNSILTSIHFTDPSIGCDAATFQPCSDKALS
 LKVYVDSFRSIYGVNSGIPAGTAVAVGRYPEDVYFNGNPWYLSTFAVAEQLYDALYVWKKTGSITVTST
 LAFFQELVPSVTAGTYASSSSTFTSIVNAVSTYADGFVSEAAKYVPSDGLSEQFDKNTGTPLSAVHLTW
 SYASFLTATRRAGIVPPSWISSGANTVPSSCSGTTVAGSYSSPTATSFPPSQTPKTAATGTSFTPIACA
 TPTSAVTFHELATTVPGQTIKVVGNAQALGNWST SAGVALNAVNCASNHPWIGPVNLKAGDVVEYKYI
 NVGSDGSVTWEADPNHTYTVPAVACVTAVVKEDTWQS

8a) Posible secuencia de aminoácidos de la glucoamilasa de *Trichoderma harzianum* (CBS433.95) (GA103) que tiene 631 aminoácidos (SEC ID No: 31), en la que la secuencia de la proteína madura está representada por las posiciones de los residuos de aminoácidos 34 – 631 (SEC ID No: 44)

MHVLSTAVLL GSAVQKVLG RGSNGLSGV TKRSVDD SIN TQTPIALNNL LCNVGPDGCR
 AFGTSAGAVI ASPSTTDPDY YMWTRDSAL VFKNIVDRFT EQYDAGLQRR IEQYISAQVT
 LQGISNPSGS LSDGSGLGEP KFELTSLQFT GNWGRPQRDG PALRAIALIG YSKWLINNNY
 QSTVSNIIWP IVRNDLNYVA QYWNQTGF DL WEEVNGSSFF TVANQHRALV EGATLAATLG
 QSGSTYSSVA PQILCFLQRF WVSGGYIDSN INTNEGRTGK DANSLLASIH TFDPSLGDA
 STFQPCSDKA LSNLKVVVDS FRSIYSVNKG IPAGAAVAVG RYPEDVYFNG NPWYLATFAA
 AEQLYDSVYV WKKTGSITVT STSLAFFQEL VPGVAAGTYS SSQSTFTSII NAVSTYADGF
 LSEAAKYVPA DGSLAEQFDR NTGTPLSAVH LTWSYASFLT AAARRAGVVP PSWASSGANS
 VPSSCSGASV VGSYSRPTAT SFPPSQTPKP GAPSGAPFTP IPCATPASVA VTFHELATTQ
 FGQTIKVAGS APELGNWSTS AAIALDAVNY ATNHPLWIGS VNLEAGDVIE YKYISVGQDG
 SVTWESDPNH TYTVPAVACV TEVVKEDTWQ S

8b) Secuencia de la proteína madura para GA103 (SEC ID No: 44)

SVDDSI NTQTPIALNNLLCNVGPDGCR AFGTSAGAVIASPSTTDPDY YMWTRDSALVFKNIVDRFTEQYDAGL
 QRRIEQYISAQVTLQGISNPSGSLSDGSGLGEPKFEFTLSQFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQ
 STVSNIIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGF DL WEEVNGSSFF TVANQHRALVEGATLAATLGQSGSTYSSVAPQILC
 FLQRFWVSGGYIDSNINTNEGRTGKDANSLLASIHFTDPSLGCDASTFQPCSDKALS NLKVVVDSFRSIYSVNK
 GIPAGAAVAVGRYPEDVYFNGNPWYLATFAAAEQLYDSVYVWKKTGSITVTSTSLAFFQELVPGVAAGTYSSQ
 STFTSII NAVSTYADGFLSEAAKYVPADGSLAEQFDRNTGTPLSAVHLTWSYASFLTAAARRAGVPPSWASSG
 ANSVPSSCSGASV VGSYSRPTATSFPPSQTPKPGAPSGAPFTPIPCATPASVAVTFHELATTQFGQTIKVAGSA
 PELGNWSTSAALDAVNYATNHPLWIGSVNLEAGDVIEYKYISVGQDGSVTWESDPNHTYTVPAVACVTEVVK
 EDTWQS

9a) Posible secuencia de aminoácidos de la glucoamilasa de *Trichoderma longibrachiatum* (IMI92.027) (GA124) que tiene 632 aminoácidos (SEC ID No: 33), en la que la secuencia de la proteína madura está representada por las posiciones de los residuos de aminoácidos 34 – 632 (SEC Id No: 45)

MHVLSTAVLL GSAVAVQKVLG RPSSGLSDV TKRSVDDFIS TETPIALNNL LCNVGPDGCR
 AFGTSAGAVI ASPSTIDPDY **YYM**WTRDSAL VFKNLVDRFT ETYDAGLQRR IEQYITAQVT
 LQGLSNPSGS LTDGSGLGEP KFELTLKPFT GNWGRPQRDG PALRAVALIG YSKWLINNNY
 QSTVSNVIWP IVRNDLNYVA QYWNQTGF DL WEEVNGSSFF TMANQHRALV EGATLAATLG
 QSGSTYSSVA PQILCFLQRF WVSSGGYVDS NINTNEGRTG KDVNSVLTSI HTFDPNLGCD
 AATFQPCSDK ALSNLKVVVD SFRSIYGVNK GIPAGAAVAI GRYAEDVYFN GNPWYLATFA
 AAEQLYDAIY VWKKTGSITV TATSLAFFQE LVPGVAAGTY ASSSSTFTNI INAVSTYADG
 FLSEAAKYVP ADGSLAEQFD RNSGTPLSAL HLTWSYASFL TATARRAGIV PPSWANSAS
 TIPSTCSGAS VVGSYSRPTA TSFPPSQTPK PGVPSGTPYT PLPCATPTSV AVTFHELVT
 QFGQTVKVAG NAPALGNWSA SAAVALDAIN YADNHPLWIG TVDLEAGDVV EYKYINVGQD
 GSVTWESDPN HTYTVPAVAC VTQVVKEDTW QS

9b) Secuencia de la proteína madura para GA124 (SEC ID No: 45)

SVDDFISTETPIALNNLLCNVGPDCRAFGTSAGAVIASPSTIDPDY**YYM**WTRDSALVFKNLVDRFTETYDAGL
 QRRIEQYITAQVTLQGLSNPSGSLTDGSGLGEPKFELTLKPFTGNWGRPQRDGPALRAVALIGYSKWLINNNYQ
 STVSNVIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGF DLWEEVNGSSFFTMANQHRALVEGATLAATLGQSGSTYSSVAPQILC
 FLQRFVWVSSGGYVDSNINTNEGRTGKDVNSVLTSIHTFDPNLGCDAATFQPCSDKALSNLKVVVDSFRSIYGVN
 KGIPAGAAVAIGRYAEDVYFNGNPWYLATFAAAAEQLYDAIYVWKKTGSITVTATSLAFFQELVPGVAAGTYASS
 SSTFTNIINAVSTYADGFLSEAAKYVPADGSLAEQFDRNSGTPLSALHLTWSYASFLTATARRAGIVPPSWANS
 SASTIPSTCSGASVVGSYSRPTATSFPSPSQTPKPGVPSGTPYTPLPCATPTSV
 AVTFHELVTQFGQTVKVAGNAPALGNWSASAAVALDAINYADNHPLWIGTVDLEAGDVVEYKYINVGQDGSVT
 WESDPNHTYTVPAVACVTQVVKEDTWQS

10a) Posible secuencia de aminoácidos de la glucoamilasa de *Trichoderma asperellum* (ATCC28020) (GA127) que tiene 631 aminoácidos (SEC ID No: 35), en la que la secuencia de la proteína madura está representada por las posiciones de los residuos de aminoácidos 34 – 631 (SEC Id No: 46)

MHVLSTAVLL GSAVAVQKVLG RPSSNGLSGV TKRSVDDFIN TQTPIALNNL LCNVGPDGCR
 AFGTSAGAVI ASPSTIDPDY **YYM**WTRDSAL VFKNIVDRFT QOYDAGLQRR IEQYISAQVT
 LQGISNPSGS LSDGSGLGEP KFELTLSQFT GNWGRPQRDG PALRAIALIG YSKWLINNNY
 QSTVSNIIWP IVRNDLNYVA QYWNQTGF DL WEEVNGSSFF TVANQHRALV EGATLAATLG
 QSGSTYSSVA PQILCFLQRF WVSSGGYIDSN INTNEGRTGK DANLLASIH TFDPSLGCDA
 STFQPCSDKA LSNLKVVVDS FRSIYGVNKG IPAGSAVAIG RYPEDVYFNG NPWYLATFAA

AEQLYDSVYV WKKTGSITVT STSLAFFQEL VPGVAAGTYS SSQSTFTSII NAVSTYADGF
 LSEAAKYVPA DGSLAEQFDR NTGTPLSAVH LTWSYASFLT AAARRAGVVP PSWASSGANS
 VPSSCSGASV VGSYSRPTAT SFPPSQTPKP GVPSGTPFTP IPCATPTSVA VTFHELATTQ
 FGQTIKVAGS APELGNWSTS AAIALDAVNY ATNHPLWIGS VSLEAGDVIE YKYINVGQDG
 SVTWESDPNH TYTTPAVACV TEVVKEDTWQ S

10b) Secuencia de la proteína madura para GA127 (SEC ID No: 46)

SVDDFINTQTPIALNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVIASPSTTDPDY YMWTRDSALVFKNIVDRFTQQYDAGL
 QRRIEQYISAQVTLQGISNPSGSLSDGSGLGEPKFEFELTSLQFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQ
 STVSNIIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDLWEEVNGSSFFTVANQHRALVEGATLAATLGQSGSTYSSVAPQILC
 FLQRFVWSSGGYIDSNINTNEGRTGKDANSLASIHTFDP SLGCDASTFQPCSDKALSNLKVVD SFRS IYGVNK
 GIPAGSAVAIGRYPEDVYFNGNPWYLATFAAAEQLYDSVYVWKKTGSITVTSTSLAFFQELVPGVAAGTYSSSQ
 STFTSI INAVSTYADGFLSEAAKYVPADGSLAEQFDRNTGTPLSAVH LTWSYASFLTAARRAGVPPSWASSG
 ANSVPSSCSGASVGSYSRPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPFTPIPCATPTSVA
 VTFHELATTQFGQTIKVAGSAPELGNWSTSAALDAVNYATNHPLWIGSVSLEAGDVIEYKYINVGQDG
 SVTWESDPNH TYTTPAVACV TEVVKEDTWQS

11a) Posible secuencia de aminoácidos de la glucoamilasa de *Trichoderma strictipilis* (CBS347.93) (GA128) que tiene 632 aminoácidos (SEC ID No: 37), en la que la secuencia de la proteína madura está representada por las posiciones de los residuos de aminoácidos 34 – 632 (SEC ID No: 47)

MHVLSTAVLL GSAVQKVLG RPSGSLSDI TKRSVDDFIS TQTPIALNLL LCNVGPDGCRA
AFGTSAGAVI ASPSTTDPDY YMWTRDSAL VFKNLVDRFT ETYDAGLQRR IEQYITAQVT
LQGLTNPSGS LADGSGLGEP KFELTSLPFT GNWGRPQRDG PALRAIALIG YSKWLINNNY
QSTVSNVIWP IVRNDLSYAA QYWNQTGFDL WEEVSGSSFF TVANQHRALV EGATLAATLG
QSGSTYSSVA PQILCFLQRF WVSSGGYVDS NINTNEGRTG KDVNSILTSI HTFDPNLGCD
AGTFQPCSDK ALSNFKVVVD SFRSIYGVNN GIPAGAAVAI GRYPEDVYFN GNPWYLATFA
AAEQLYDAIY WKKTGSITV TAISLAFQEL LVPGVTAGTY SSSQSTFTNI INAASTYADG
FVTEAAKYVP TDGSLAEQFD RNNGTPLSAL HLTWSYASFL TASARRAGVV PPSWANSSAS
SISSTCSGAS VGSYSSPTA TSFPPSQTPK PGVPSGTPYT PLPCATPTSVA AVTFHELVTST
QFGQTVKAAG SAPALGNWST SAAVGLDAVN YADNHPLWIG TVELEAGDVV EYKYINVGQD
GSVTWESDPN HTYTTPAVAC VTEVVKEDTW QS

11b) Secuencia de la proteína madura para GA128 (SEC ID No: 47)

SVDDFISTQTPIALNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVIASPSTTDPDY YMWTRDSALVFKNLVDRFTETTYDAGL
 QRRIEQYITAQVTLQGLTNPSGSLADGSGLGEPKFEFELTSLPFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQ
 STVSNVIWPIVRNDLSYAAQYWNQTGFDLWEEVSGSSFFTVANQHRALVEGATLAATLGQSGSTYSSVAPQILC

FLQRFWVSSGGYVDSNINTNEGRTGKDVNSILTSIHTEFDPNLGC DAGTFQPC SDKALSNFKVVVDSFRSIIYGVN
NGIPAGAAVAIGRYPEDVYFNGNPWYLATFAAAEQLYDAIYVWKKTGSITVTAISLAFQELVPGVTAGTYSSS
QSTFTNIINAASTYADGFVTEAAKYVPTDGLAEQFDRNNGTPLSALHLTWSYASFLTASARRAGVPPSWANS
SASSISSTCSGASVVGSYSSPTATSFPSPQTPKPGVPSGTPYTPLPCATPTSV
AVTFHELVSTQFGQTVKAAGSAPALGNWSTSAAVGLDAVNYADNHPLWIGTVELEAGDVVEYKYINVGQDGSVT
WESDPNHTYTVPAVACVTEVVKEDTWQS

Figura 16. Gel SDS-PAGE utilizado para determinar el PM de la TrGA purificada

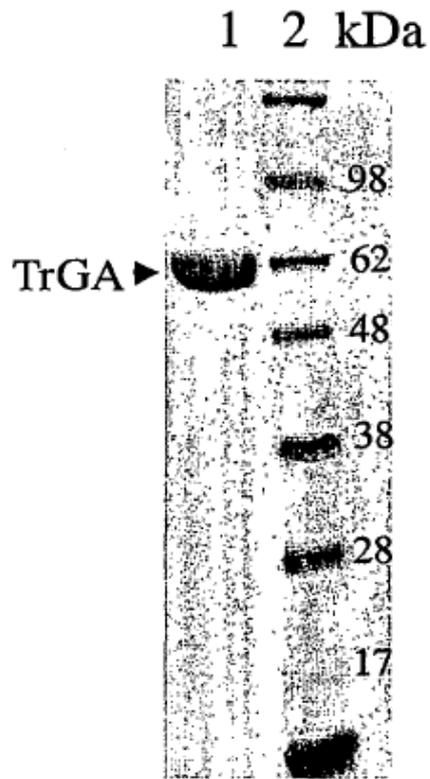


Figura 17A Mapa del plásmido del vector de expresión pTrex3g de *T. Reesei*

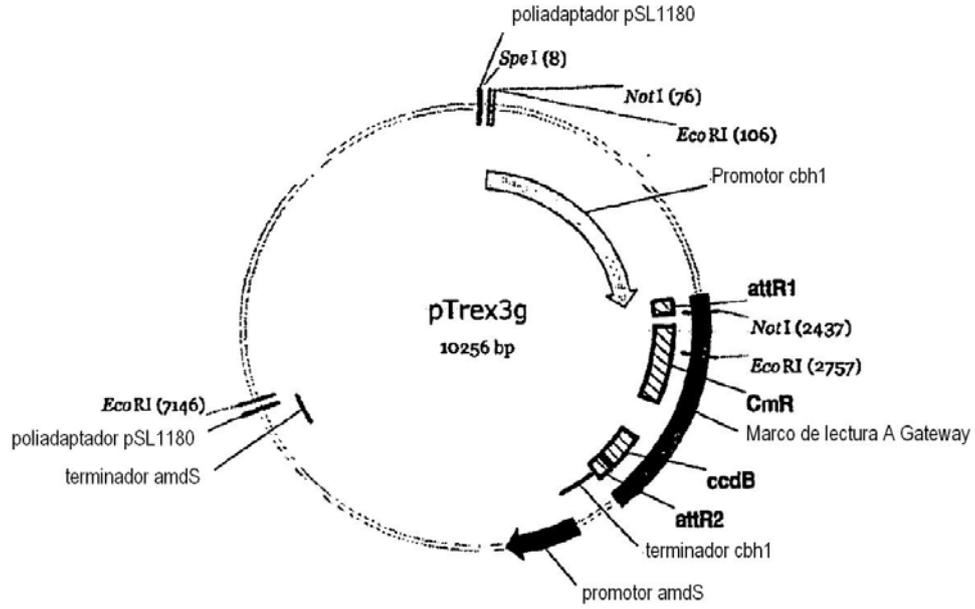


Figura 17B Mapa del plásmido que incluye el vector de expresión pNSP23 de *T. Reesei*, el gen de GA de *T. Reesei* clonado en pTrex3g

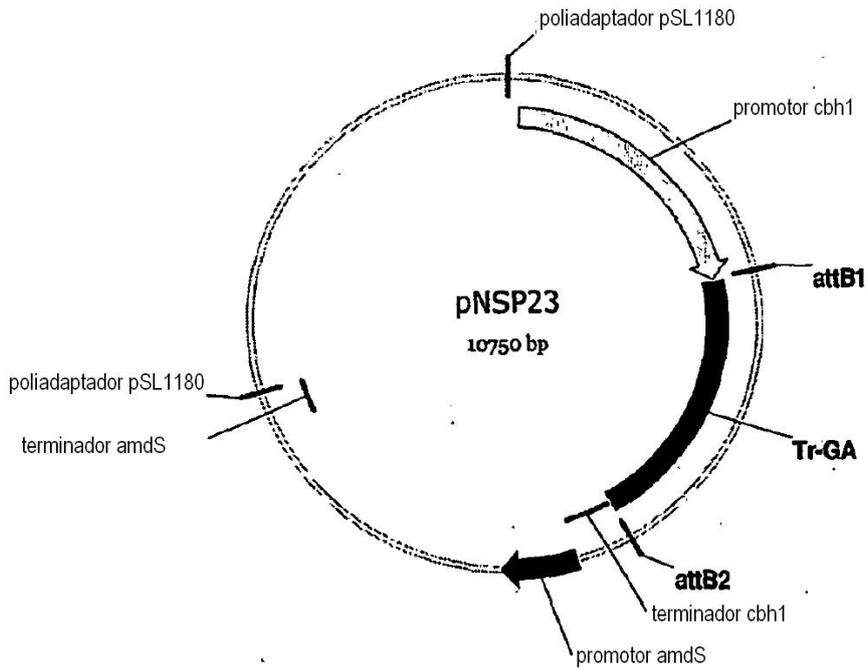
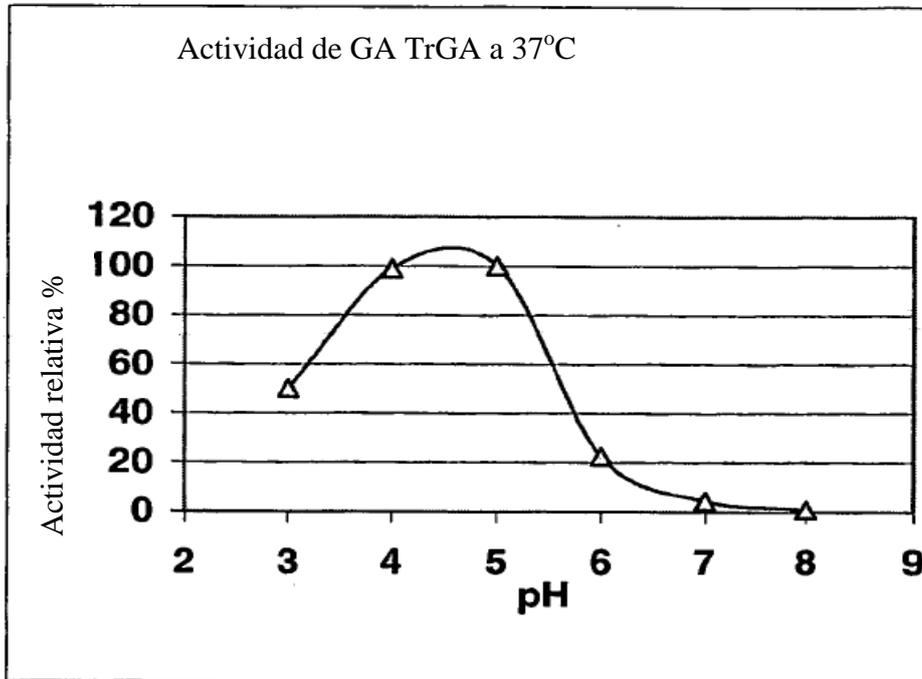


Figura 18

A.



B.

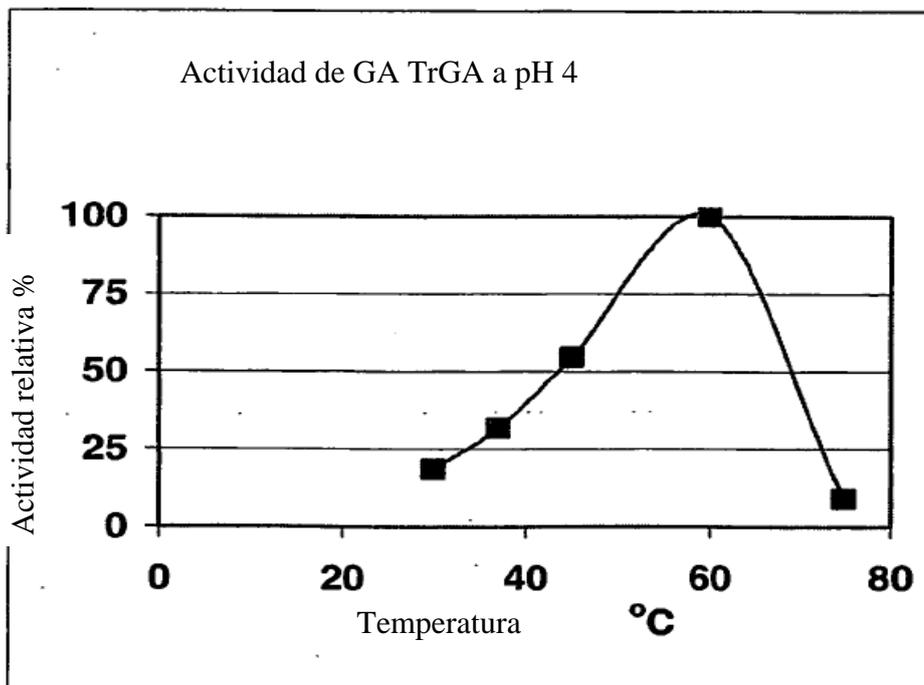
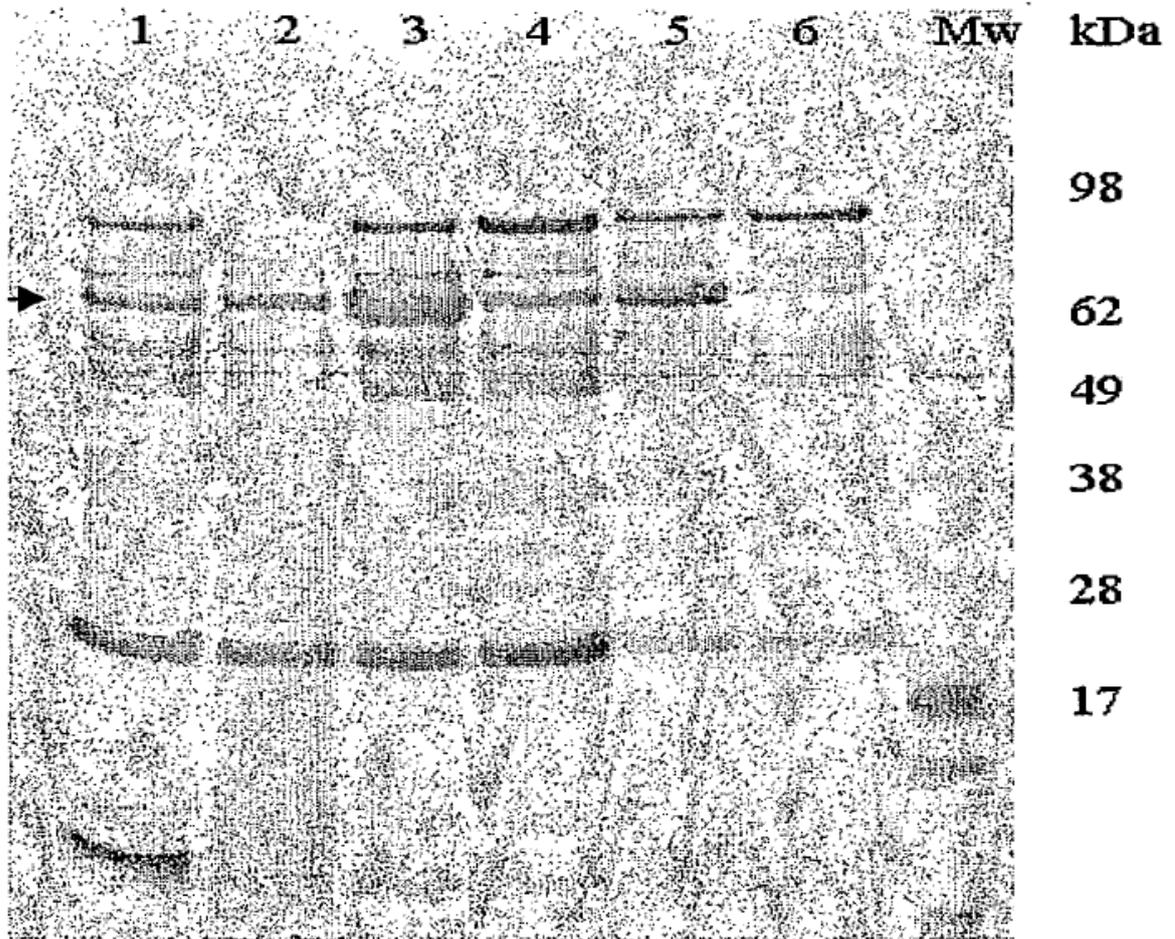


Figura 19



Carril 1: GA104
Carril 2: GA105
Carril 3: GA107
Carril 4: GA109
Carril 5: TrGA
Carril 6: Huésped T. reesei
Carril 7: Marcador PM

Figura 20

A. Secuencia de aminoácidos de glucoamilasa de *Aspergillus Níger* (SEC Id No: 26) que incluye la secuencia señal

MSFRSLALSGLVCTGLANVISKRATLD SWLSNEATVARTAILNNIGADGAWVSGADSG
 IVVASPSTDNDPDYFYTWTRDSGLVLKTLVDFRNGDTSLLSTIENYISAQAIVQGISNPSG
 DLSSGAGLGEPKFNVDETAYTGSWGRPQRDGPALRATAMIGFGQWLLDNGYTSTATDIVWP
 LVRNDLSYVAQYWNQTYDLWEEVNGSSFFTIAVQHRALVEGSFAFATAVGSSCSWCDSQAP
 EILCYLQSFWTGSFILANFDSRSRSGKDANTLLGSIHTFDPEAACDDSTFQPCSPRALANHK
 EVVDSFRSIYTLNDGLSDSEAVAVGRYPEDTYNGNPWF LCTLAAAEQLYDALYQWDKQGS
 LEVTDVSLDFFKALYSDAATGTYSSSSSTYSSIVDAVKTFADGFVSI VETHAASNGSMSEQ
 YDKSDGEQLSARDLTWSYAALLTANNRRNSVVPASWGETSASSVPGTCAATSAIGTYSSVT
VTSWPSIVATGGTTTTATPTGSGSVTSTSKTTATASKTSTSTSTSCTTPTAVAVTFDLTA
TTTTYGENIYLVGSISQLGDWETSDGIALSADKYTSSDPLWYVT
 VTLPAGESFEYKFI RIESDDSV EWESDPNREYTVPQACGTSTATVTDWR

B. Secuencia de aminoácidos de glucoamilasa de alfa amilasa de *Aspergillus kawachi* (AKAA) (SEC Id No: 27) que incluye la secuencia señal

MRVSTSSIALAVSLFGKLALGLSAAEWRTQSIYFLLTDRFGRDNDSTTATCNTGDQIYCGG
 SWQGIINHLDYIQGMGFTAIWISPITEQLPQDTS DGEAYHGYWQQKIYNVNSNFGTADDLK
 SLSDALHARGMYLMVDVVPNHMGYAGNGNDVDYSVFD PFDSSSYFHPYCLITDWDNLT MVQ
 DCWEGDTIVSLPDLNNTTETAVRTIWDWADLVSNYSVDGLRIDSVEEVEPDFFPGYQEAA
 GVYCVGEVDNGNPALDCPYQKYLDGVLNYP IYWQLLYAFESSGSI SNLYNMIKSVASDCS
 DPTLLGNFIEHNDNPRFASYTSDYSQAKNLSYIFLSDGIPIVYAGEEQHYSGGDVPYNRE
 ATWLSGYD TSAELYTWIATTNAIRKLAI SADS DYITYANDPIYTD SNTIAMRKGTSGSQII
 TVLSNKGSSGSSYTLT LSGSGYTSGTKLIEAYTCTSVTVDSNGDIPVPMASGLPRVLLPAS
VVDSSSLCGSGNTTTTTTAATSTSKATTSSSSSSAAATSSSCTATSTTLPITFEELVTT
TYGEEVYLSGSISQLGEWDTSDAVKLSADDTSSNPEWSVTVSLPVGTTFEYKFIKVDEGG
 SVTWESDPNREYTVPECGSGSGETVVDTWR