(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 644 302**

(51) Int. Cl.:

C12P 19/02 (2006.01)
C12P 19/20 (2006.01)
C12P 7/10 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)
C12N 9/34 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2013** **PCT/US2013/054462**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **20.02.2014** **WO14028358**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2013** **E 13753013 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** **EP 2884853**

(54) Título: **Variantes de glucoamilasa de Trichoderma reesei resistentes a la pérdida de actividad relacionada con la oxidación y utilización de las mismas**

(30) Prioridad:

14.08.2012 US 201261683007 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2017

(73) Titular/es:

DANISCO US INC. (100.0%)
925 Page Mill Road
Palo Alto, CA 94304, US

(72) Inventor/es:

CHOW, SU YIN MARIA;
GRAYCAR, THOMAS P.;
HUITINK, JACQUELYN A.;
VROEMEN, CASPER y
WONG, DAVID L.

(74) Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 644 302 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

Variantes de glucoamilasa de *Trichoderma reesei* resistentes a la pérdida de actividad relacionada con la oxidación y utilización de las mismas

CAMPO

[0001] Las variantes de glucoamilasa de *Trichoderma reesei* (TrGA) son útiles en el procesamiento de almidón, por ejemplo, la producción de alcohol como producto final por medio de un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS). Se dan a conocer composiciones que comprenden las variantes de TrGA y métodos de utilización de las variantes de TrGA en el procesamiento de almidón.

ANTECEDENTES

[0002] Las fermentaciones industriales utilizan, mayormente, glucosa como materia prima para la producción de una multitud de proteínas, enzimas, alcoholes y otros productos químicos finales. Normalmente, la glucosa es el producto del procesamiento de almidón, que es, de manera tradicional, un proceso enzimático de dos etapas que cataliza la ruptura del almidón, que implica la licuefacción y la sacarificación. Durante la licuefacción, el almidón granular insoluble se suspende en agua, se gelatiniza con calor y se hidroliza mediante una alfa amilasa termoestable. Durante la sacarificación, las dextrinas solubles producidas en la licuefacción se hidrolizan también por medio de glucoamilasas.

[0003] Las enzimas de glucoamilasa (glucano 1,4-α-glucohidrolasas, EC 3.2.1.3) son carbohidrasas que hidrolizan almidón que actúan en exo, que catalizan la eliminación de unidades de glucosa sucesivas de los extremos no reductores de almidón o las moléculas de oligosacáridos y polisacáridos relacionadas. Las glucoamilasas pueden hidrolizar tanto los enlaces glucosídicos lineales como los ramificados del almidón (p. ej., amilosa y amilopectina). Las glucoamilasas son enzimas importantes en el mercado y se han utilizado en una amplia variedad de aplicaciones que requieren la hidrólisis del almidón. Por ejemplo, las glucoamilasas se utilizan habitualmente para producir azúcares fermentescibles a partir del sustrato de almidón licuado mediante enzimas. Los azúcares fermentescibles, por ejemplo, los azúcares de bajo peso molecular, tales como glucosa, pueden, a continuación, 1) convertirse en fructosa mediante otras enzimas (p. ej., glucosa isomerasas); 2) cristalizarse; o 3) utilizarse en fermentaciones para producir numerosos productos finales (p. ej., alcoholes, glutamato monosódico, ácido succínico, vitaminas, aminoácidos, 1,3-propanodiol y ácido láctico). La fermentación y la sacarificación pueden llevarse a cabo simultáneamente (es decir, un proceso SFS) para lograr mayor economía y eficacia.

[0004] El documento de patente WO 2011/022465 A1 describe variantes de glucoamilasas que muestran propiedades alteradas, tal como una termoestabilidad y/o actividad específica mejoradas.

[0005] El documento de patente WO 2006/002643 A2 describe variantes de alfa-amilasa de, en particular, alfa-amilasas de tipo Termamil, que muestran una alteración en al menos una de las siguientes propiedades en relación con sus alfa-amilasas originales: especificidad de sustrato, unión de sustrato, patrón de escisión de sustrato, estabilidad térmica, perfil de pH/actividad, perfil de pH/estabilidad, estabilidad en relación con la oxidación, dependencia de Ca^{2+}, actividad específica, en concreto, en aplicaciones de lavado de ropa y de lavavajillas.

[0006] Chi *et al*., Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, vol. 109(6), pp. 531-538 describe la ingeniería de una alfa amilasa truncada de cepa de *Bacillus* sp. TS-23 para la mejora simultánea de estabilidades térmicas y oxidativas.

[0007] Las glucoamilasas se llevan utilizando con éxito en aplicaciones comerciales desde hace muchos años. Adicionalmente, se han introducido diversas mutaciones en glucoamilasas fúngicas, por ejemplo, glucoamilasa de *Trichoderma reesei* (TrGA), para mejorar la estabilidad térmica y la actividad específica. *Véase,* p. ej., el documento de patente WO 2008/045489; el documento de patente WO 2009/048487; el documento de patente WO 2009/048488; y el documento de patente estadounidense n.º 8,058,033. Todavía se necesitan nuevas variantes de glucoamilasa con propiedades más convenientes.

SUMARIO

[0008] CS4, una variante de glucoamilasa *de Trichoderma reesei* (TrGA) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, se ha dado a conocer previamente en el documento de patente estadounidense n.º 8,058,033. CS4 se obtuvo mediante la introducción de cinco sustituciones (L417V, T430A, Q511H, A539R y N5631) en TrGA que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En comparación con la TrGA original, CS4 muestra propiedades mejoradas, por ejemplo, tanto una termoestabilidad mayor como una actividad específica mayor. Sin embargo, se descubrió que tanto TrGA como CS4 tienen una actividad reducida después de estar almacenadas durante mucho tiempo. En algunos casos, esta pérdida de actividad se ha atribuido, entre otros, a la oxidación del residuo de M50 de las enzimas. La sustitución del residuo de metionina en la posición 50 (M50) de CS4 por glicina (G), fenilalanina (F), lisina (K) o tirosina (Y) da lugar a variantes resistentes a la pérdida de actividad relacionada con la oxidación. Entre estas variantes, la que porta la sustitución de M50Y muestra un

rendimiento equivalente a CS4 tanto en relación con la producción del producto final de SFS como con la eficacia de la hidrólisis de DP4+. Por consiguiente, esta variante de TrGA, que abarca las sustituciones de M50Y, L417V, T430A, Q511H, A539R y N563I de SEQ ID NO: 2, sería útil, de forma ventajosa, en diversas aplicaciones de procesamiento de almidón.

[0009] En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención da a conocer una variante de glucoamilasa que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO: 2, comprendiendo la variante sustituciones de aminoácido correspondientes a las posiciones: 50, 417, 430, 511, 539 y 563 de SEQ ID NO: 2, donde la sustitución de aminoácido en la posición 50 es M50Y, G, F o K.

[0010] En algunos casos, la sustitución de aminoácido en la posición 50 es M50Y. En algunos casos, las sustituciones de aminoácido en las posiciones 417, 430, 511, 539 y 563 son: L417V, T430A, Q511H, A539R y N563I, respectivamente.

[0011] En algunos casos, la variante de glucoamilasa tiene al menos un 95 %, un 97 % o un 99 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO: 2.

[0012] En determinados casos, la variante de glucoamilasa comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

[0013] En algunos casos, la variante de glucoamilasa también comprende una o más sustituciones de aminoácido adicionales correspondientes a las posiciones: 43, 44, 61, 73, 294, 431, 503 o 535 de SEQ ID NO: 2. En concreto, las sustituciones de aminoácido pueden ser: I43Q/R, D44C/R, N61I, G73F, G294C, A431L/Q, E503A/V y/o A535R.

[0014] En determinados casos, la variante de glucoamilasa muestra un aumento de la termoestabilidad o un aumento de la actividad específica en comparación con una segunda variante de glucoamilasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 en las mismas condiciones.

[0015] En determinados casos, la variante de glucoamilasa pierde menos actividad tras la oxidación en comparación con una segunda variante de glucoamilasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 en las mismas condiciones.

[0016] En un segundo aspecto, la presente invención da a conocer una composición enzimática que comprende la variante de glucoamilasa del primer aspecto de la invención, comprendiendo también, opcionalmente, una hexoquinasa, una xilanasa, una glucosa isomerasa, una xilosa isomerasa, una fosfatasa, una fitasa, una pululanasa, una β-amilasa, una α-amilasa, una proteasa, una celulasa, una hemicelulasa, una lipasa, una cutinasa, una trehalasa, una isoamilasa, una enzima redox, una esterasa, una transferasa, una pectinasa, una liasa, una α-glucosidasa, una β-glucosidasa o una combinación de las mismas.

[0017] En un tercer aspecto, la presente invención da a conocer un método de procesamiento de almidón que comprende poner en contacto un sustrato de almidón con la variante de glucoamilasa del primer aspecto de la invención o la composición enzimática del segundo aspecto de la invención para producir una composición que comprende glucosa.

[0018] En algunos casos, el método comprende además la adición de una hexoquinasa, una xilanasa, una glucosa isomerasa, una xilosa isomerasa, una fosfatasa, una fitasa, una pululanasa, una β-amilasa, una α-amilasa, una proteasa, una celulasa, una hemicelulasa, una lipasa, una cutinasa, una trehalasa, una isoamilasa, una enzima redox, una esterasa, una transferasa, una pectinasa, una hidrolasa, una alfa-glucosidasa, una beta-glucosidasa o una combinación de las mismas al sustrato de almidón.

[0019] En algunos casos, el procesamiento de almidón comprende la sacarificación del sustrato de almidón, lo que da lugar a un jarabe con un nivel elevado de glucosa.

[0020] En algunos casos, el método comprende también la fermentación de la composición que comprende glucosa hasta obtener un producto final.

[0021] En algunos casos la sacarificación y la fermentación se llevan a cabo como un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS).

[0022] En algunos casos, el producto final es: alcohol; de forma opcional, etanol.

[0023] En algunos casos, el producto final es: ácido cítrico, ácido láctico, ácido succínico, glutamato monosódico, ácido glucónico, gluconato de sodio, gluconato cálcico, gluconato de potasio, glucono delta-lactona, eritorbato sódico, ácido graso omega 3, butanol, lisina, ácido itacónico, 1,3-propanodiol, biodiesel o isopreno.

[0024] En algunos casos, el sustrato de almidón tiene aproximadamente entre un 15 % y un 50 % de materia seca (MS).

[0025] En algunos casos, el sustrato de almidón se selecciona entre trigo, cebada, maíz, centeno, arroz, sorgo, salvado, mandioca, milo, mijo, patata, boniato, tapioca y cualquier combinación de los mismos.

[0026] En algunos casos, el sustrato de almidón comprende almidón licuado, almidón gelatinizado o almidón granular.

[0027] En algunos casos, la glucoamilasa se dosifica en un rango de entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 1,0 de unidades de glucoamilasa (GAU, por sus siglas en inglés) por gramo de materia seca de almidón (msa).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0028] Los dibujos adjuntos se incorporan a la memoria descriptiva y proporcionan ilustraciones no limitativas de diversos modos de realización. En los dibujos:

Las figuras 1A-1F representan un alineamiento ClustalW de la TrGA madura (SEQ ID NO: 2) con las glucoamilasas completas de varios miembros del agrupamiento de familias de *Trichoderma*/*Hypocrea*. Las glucoamilasas completas proceden de *Hypocrea citrine* var. *americana* (SEQ ID NO: 7; véase también SEQ ID NO: 6 del documento de patente estadounidense n.º 7,413,879); *Hypocrea vinosa* (SEQ ID NO: 8; véase también SEQ ID NO: 8 del documento de patente estadounidense n.º 7,413,879); *Trichoderma* sp. (SEQ ID NO: 9; véase también SEQ ID NO: 10 del documento de patente estadounidense n.º 7,413,879); *Hypocrea gelatinosa* (SEQ ID NO: 10; véase también SEQ ID NO: 12 del documento de patente estadounidense n.º 7,413,879); *Hypocrea orientalis* (SEQ ID NO: 11; véase también SEQ ID NO: 14 del documento estadounidense n.º 7,413,879); *Trichoderma konilangbra* (SEQ ID NO: 12; véase también SEQ ID NO: 16 del documento de patente estadounidense n.º 7,413,879); *Trichoderma* sp. (SEQ ID NO: 13; véase también SEQ ID NO: 29 del documento de patente estadounidense n.º 7,413,879); *Trichoderma harzianum* (SEQ ID NO: 14; véase también SEQ ID NO: 31 del documento de patente estadounidense n.º 7,413,879); *Trichoderma longibrachiatum* (SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 33 del documento de patente estadounidense n.º 7,413,879); *Trichoderma asperellum* (SEQ ID NO: 16; véase también SEQ ID NO: 35 del documento de patente estadounidense n.º 7,413,879); *Trichoderma strictipilis* (SEQ ID NO: 17; véase también SEQ ID NO: 37 del documento de patente estadounidense n.º 7,413,879); *Trichoderma virens* Gv29-8 (SEQ ID NO: 18; véase también el número de accesión GenBank EHK25059.1); y *Trichoderma atroviride* IMI 206040 (SEQ ID NO: 19; véase también el número de accesión GenBank EHK49034.1). Los residuos que se indican mediante un asterisco en la figura 1 son residuos de TrGA correspondientes a los residuos conservados en SEQ ID NOs: 7-19. Los residuos de aminoácidos contemplados para sustituciones están en negrita. El dominio catalítico, la región de enlace y el dominio de unión al almidón de TrGA se indican con diversas barras.

La figura 2 representa la actividad retenida de pNPG para TrGA (WT) y la variante CS4 en diversos momentos en el tiempo tras un tratamiento con peróxido de hidrógeno. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 1, a un pH 4,3.

La figura 3 representa la actividad restante para TrGA (WT) y la variante CS4 tras un tratamiento con peróxido de hidrógeno durante 7 horas. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 1. Los sustratos que se sometieron a prueba incluyen pNPG, amilopectina (AP) y fécula de patata (referencia).

La figura 4 representa el análisis de SDS-PAGE de TrGA (WT) y la variante CS tras un tratamiento con peróxido de hidrógeno. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 1.

Las figuras 5A-B representan los análisis MALDI-TOF/MS en una digestión en solución (Asp-N) para TrGA (figura 5A) y CS4 (figura 5B), con o sin tratamiento con peróxido de hidrógeno. Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en el ejemplo 2. Sólo se muestra el análisis del rango de masa de 1001-2000 Dalton, puesto que no se identificaron diferencias en otros rangos. Las flechas indican picos que muestran cambios en muestras tratadas con peróxido de hidrógeno.

Las figuras 6A-B representan el rendimiento de SFS total para TrGA y la variante CS4 con diversos grados de oxidación (0 %, 50 % y 100 %).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0029] La presente exposición se refiere a una variante de glucoamilasa que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99% con respecto a TrGA (SEQ ID NO: 2). La variante de glucoamilasa es como se define en las reivindicaciones y comprende sustituciones de aminoácido correspondientes a las posiciones: 50, 417, 430, 511, 539 y 563 de SEQ ID NO: 2, donde la sustitución de aminoácido en la posición 50 es M50Y, G, F o K. En algunos casos, las sustituciones de aminoácido en las posiciones 417, 430, 511, 539 y 563 son L417V, T430A, Q511H, A539R y N563I. La variante de glucoamilasa puede mostrar un aumento de la termoestabilidad y/o un aumento de la actividad específica en comparación con la glucoamilasa original. La variante de glucoamilasa, en comparación con una segunda variante de glucoamilasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, puede perder menos actividad tras oxidarse. La variante de glucoamilasa puede incluirse en una mezcla enzimática para diversas aplicaciones de procesamiento de almidón. Entre los ejemplos de aplicaciones

para la variante de glucoamilasa se encuentran los relacionados con un proceso de sacarificación de almidón, por ejemplo, la producción de un jarabe con un nivel elevado de glucosa y la producción de un producto final por medio de fermentación o SFS.

[0030] En algunos aspectos, los modos de realización de la presente exposición se basan en técnicas rutinarias y métodos utilizados en el campo de la ingeniería genética y la biología molecular. Los siguientes recursos incluyen descripciones de metodología general útil de acuerdo con los modos de realización: Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ª Ed., 1989); Kreigler, GENE TRANSFER AND EXPRESSION; A LABORATORY MANUAL (1990) y Ausubel *et al.*, Eds. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (1994). A menos que se definan de otra forma en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la materia a la que pertenece la presente invención. Singleton, *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2ª ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a un experto en la materia un diccionario general de muchos de los términos utilizados en la presente invención. Aunque en la práctica o en el ensayo de la presente invención se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento, se describen los métodos y los materiales representativos. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. Los encabezamientos proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o modos de realización, que se pueden tomar como referencia a la memoria en general.

1. Definiciones y abreviaturas

[0031] De conformidad con esta descripción detallada, se aplican las siguientes abreviaturas y definiciones. Obsérvese que, tal como se utilizan en el presente documento, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. En consecuencia, por ejemplo, la referencia a "una enzima" incluye una pluralidad de dichas enzimas y la referencia a "la dosis" incluye la referencia a una o más dosis y a equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la materia, etc.

[0032] A menos que se definan de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia. A continuación, se proporcionan los siguientes términos.

1.1. Definiciones

[0033] Tal como se utiliza en el presente documento, "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "polipéptido" y/o del término "proteína". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "péptido"; en algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "enzima".

[0034] Tal como se utiliza en el presente documento, "secuencia de nucleótidos" o "secuencia de ácido nucleico" se refiere a una secuencia de origen genómico, sintético o recombinante y puede ser bicatenaria o monocatenaria, en caso de que represente la cadena codificante o no codificante. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ácido nucleico" puede referirse a ADN genómico, ADNc, ADN sintético o ARN. Los residuos de un ácido nucleico pueden contener cualquiera de las modificaciones químicas normalmente conocidas y utilizadas en la técnica.

[0035] "Aislado" significa que el material está al menos sustancialmente exento de al menos otro componente con el que el material se asocia de forma natural.

[0036] "Purificado" significa que el material se encuentra en un estado relativamente puro, por ejemplo, al menos aproximadamente un 80 % puro, al menos aproximadamente un 90 % puro, al menos aproximadamente un 95 % puro, al menos aproximadamente un 98 % puro o incluso al menos aproximadamente un 99 % puro.

[0037] "Oligosacárido" se refiere a una molécula de carbohidratos compuesta por 3-20 monosacáridos.

[0038] Tal como se utiliza en el presente documento, "célula transformada" incluye células que han sido transformadas mediante la utilización de técnicas de ADN recombinante. La transformación se produce normalmente mediante la inserción de una o más secuencias de nucleótidos en una célula. La secuencia de nucleótidos insertada puede ser una secuencia de nucleótidos heteróloga, es decir, es una secuencia que puede no ser natural a la célula que se ha de transformar, tal como una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de fusión.

[0039] Un ácido nucleico está “operativamente unido” cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN que codifica un líder secretor (es decir, un péptido señal), está operativamente unido al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido. En general, “operativamente unido” significa que las secuencias de ADN que están unidas son contiguas y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura.

[0040] Tal como se utiliza en el presente documento, "almidón" se refiere a cualquier material formado por los carbohidratos de polisacárido complejos de plantas, formado por amilosa y amilopectina con la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_x$, donde "X" puede ser cualquier número. El término incluye materiales vegetales tales como granos, pastos, tubérculos y raíces, y, más concretamente, materiales obtenidos a partir de trigo, cebada, maíz, centeno, arroz, sorgo, salvado, mandioca, milo, mijo, patata, boniato y tapioca. El término "almidón" incluye almidón granular. El término "almidón granular" se refiere a almidón crudo, es decir, no cocido, por ejemplo, almidón que no se ha sometido a gelatinización.

[0041] Tal como se utiliza en el presente documento, "gelatinización de almidón" significa solubilización de una molécula de almidón para formar una suspensión viscosa.

[0042] Tal como se utiliza en el presente documento, "temperatura de gelatinización" se refiere a la temperatura más baja a la que se produce la gelatinización de un sustrato de almidón. La temperatura exacta depende del sustrato de almidón específico y también puede depender de la variedad particular y de las condiciones de crecimiento de las especies vegetales a partir de las cuales se obtiene el almidón.

[0043] "DE" o "dextrosa equivalente" es una norma común para medir la concentración de los azúcares reductores totales, que se calcula como el porcentaje de la materia seca que se ha convertido en azúcares reductores. El almidón granular no hidrolizado tiene una DE que es, aproximadamente cero (0) y la D-glucosa tiene una DE de aproximadamente 100.

[0044] Tal como se utiliza en el presente documento, "sustrato de almidón" se refiere a almidón granular o almidón licuado obtenido mediante la utilización de almidón refinado, granos enteros o granos fraccionados.

[0045] Tal como se utiliza en el presente documento, "almidón licuado" se refiere a almidón que ha pasado por un proceso de solubilización, por ejemplo, el proceso convencional de licuefacción de almidón.

[0046] Tal como se utiliza en el presente documento, "jarabe de glucosa" se refiere a una composición acuosa que contiene sólidos de glucosa. El jarabe de glucosa tendrá una DE de al menos aproximadamente 20. En algunos modos de realización, el jarabe de glucosa puede contener no más de aproximadamente un 21 % de agua y al menos aproximadamente un 25 % de azúcar reductor, calculado como dextrosa. En un modo de realización, el jarabe de glucosa puede incluir al menos aproximadamente un 90 % de D-glucosa y en otro modo de realización, el jarabe de glucosa puede incluir al menos aproximadamente un 95 % de D-glucosa. En algunos modos de realización, los términos "glucosa" y "jarabe de glucosa" se utilizan indistintamente.

[0047] "Grado de polimerización (DP, por sus siglas en inglés)" se refiere al número (n) de unidades de anhidroglucopiranosa en un determinado sacárido. Entre los ejemplos de DP1, se encuentran los monosacáridos, como la glucosa y la fructosa. Entre los ejemplos de DP2, se encuentran los disacáridos, como la maltosa y la sacarosa.

[0048] Tal como se utiliza en el presente documento, "azúcares fermentescibles" se refiere a sacáridos que pueden metabolizarse en condiciones de fermentación. Estos azúcares normalmente se refieren a glucosa, maltosa y maltotriosa (DP1, DP2 y DP3).

[0049] Tal como se utiliza en el presente documento, "contenido total de azúcar" se refiere al contenido total de azúcar presente en una composición de almidón.

[0050] Tal como se utiliza en el presente documento, "materia seca" (MS o ms) se refiere a los sólidos totales de una suspensión en un porcentaje en peso seco. El término "suspensión" se refiere a una mezcla acuosa que contiene sólidos insolubles.

[0051] Tal como se utiliza en el presente documento, "enzima de licuefacción de almidón" se refiere a una enzima que cataliza la hidrólisis o la descomposición de un polímero de almidón. Entre los ejemplos de enzimas de licuefacción de almidón, se incluyen las alfa-amilasas (EC 3.2.1.1).

[0052] "Amilasa" se refiere a una enzima que es, entre otras cosas, capaz de catalizar la degradación del almidón.

[0053] "Alfa-amilasas (EC 3.2.1.1)" se refiere a endoenzimas que escinden enlaces α-D-(1→4)O-glicosídicos en la molécula de almidón de forma aleatoria. Por el contrario, las enzimas amilolíticas que actúan en exo, tales como las beta-amilasas (EC 3.2.1.2; α-D-(1→4)-glucano maltohidrolasa) y algunas amilasas de producto específico como la alfa-amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133) escinden la molécula de almidón del extremo no reductor del sustrato. Estas enzimas también se han descrito como las que llevan a cabo exo o endohidrólisis de enlaces 1,4-α-D-glucosídicos en polisacáridos que contienen unidades de D-glucosa ligadas a 1, 4-α. Otro término utilizado para describir estas enzimas es glicogenasa. Entre los ejemplos de enzimas, se incluye alfa-1, 4-glucano 4-glucanohidrolasa.

[0054] Tal como se utiliza en el presente documento, "glucoamilasas" se refiere a la clase amiloglucosidasa de las enzimas (EC 3.2.1.3, glucoamilasa, α-1, 4-D-glucano glucohidrolasa). Son exoenzimas que liberan residuos de glucosil desde los extremos no reductores de amilosa y/o moléculas de amilopectina. Las enzimas también son capaces de hidrolizar enlaces α-1, 6 y α-1,3, pero a un ritmo mucho más lento que la hidrólisis de enlaces α-1, 4.

[0055] Tal como se utiliza en el presente documento, "actividad máxima" se refiere a la actividad enzimática medida en las condiciones más favorables, por ejemplo, a un pH óptimo. Tal como se utiliza en el presente documento, "pH óptimo" se refiere a un valor de pH en el que la enzima muestra la mayor actividad siendo otras condiciones iguales.

[0056] Tal como se utiliza en el presente documento, "prosecuencia" se refiere a la secuencia de aminoácidos entre la secuencia señal y la proteína madura que se necesita para la secreción de la proteína. La escisión de la prosecuencia dará lugar a una proteína activa madura.

[0057] La frase "forma madura" de una proteína o polipéptido se refiere a la forma funcional final de la proteína o polipéptido derivada de su precursor. Por ejemplo, una forma madura de una glucoamilasa tiene su péptido señal escindido. Puede producirse una forma madura de una glucoamilasa a partir de su huésped nativo, por ejemplo, mediante expresión endógena. De forma alternativa, puede producirse una forma madura de una glucoamilasa a partir de un huésped no nativo, por ejemplo, mediante expresión exógena. Una glucoamilasa expresada de forma exógena, si bien mantiene la actividad de glucoamilasa, puede tener un patrón de glicosilación distinto en comparación con la homóloga expresada de forma endógena.

[0058] El término "original" o "secuencia original" se refiere a una secuencia que es nativa o de origen natural en una célula huésped.

[0059] El término "agrupamiento de familias de *Trichoderma* / *Hypocrea*" se refiere a un miembro de la familia Hypocreaceae que incluye diversos anamorfos como *Trichoderma* y *Gliocladium* del orden *Hypocreales*, *Phylum Ascomycota*. *Véase* capítulo 12, Alexopoulos, C.J., *et al.*, en INTRODUCTION MYCOLOGY 4ª edición, John Wiley & Sons, NY 1996.

[0060] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "variante" se utiliza en referencia a glucoamilasas que tienen algún grado de identidad de secuencia de aminoácidos en relación con una secuencia de glucoamilasa original. Una variante es similar a una secuencia original, pero tiene al menos una sustitución, deleción o inserción en su secuencia de aminoácidos que hace que tenga una secuencia diferente de una glucoamilasa original. En algunos casos, las variantes se han manipulado y/o modificado para incluir al menos una sustitución, deleción o inserción en su secuencia de aminoácidos que haga que tengan una secuencia diferente de una original. De manera adicional, una variante de glucoamilasa puede conservar las características funcionales de la glucoamilasa original, por ejemplo, mantener una actividad de glucoamilasa que es al menos aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 60 %, aproximadamente un 70 %, aproximadamente un 80 % o aproximadamente un 90 % de la que tiene la glucoamilasa original.

[0061] Los términos "termoestable" y "termoestabilidad", con referencia a una enzima, se refieren a la capacidad de la enzima para retener la actividad tras una exposición a una temperatura elevada. La termoestabilidad de una enzima, tal como una enzima amilasa, puede medirse por medio de su semivida ($t_{1/2}$) dada en minutos, horas o días, durante la cual la mitad de la actividad enzimática se pierde en condiciones definidas. La semivida puede calcularse mediante la medición de la actividad residual de α-amilasa tras una exposición (es decir, una provocación) a una temperatura elevada.

[0062] Tal como se utiliza en el presente documento, "hidrólisis de almidón" se refiere a la escisión de enlaces glucosídicos con la adición de moléculas de agua.

[0063] Tal como se utiliza en el presente documento, "no cocido" se refiere a un proceso de conversión de un sustrato de almidón granular, por ejemplo, almidón crudo, en azúcares fermentescibles sin el proceso convencional de licuefacción de almidón a alta temperatura.

[0064] Tal como se utiliza en el presente documento, "producto final" o "producto final deseado" se refiere a una molécula o compuesto en los que se convierte un sustrato de almidón, por medio de una enzima y/o un microorganismo.

[0065] Tal como se utiliza en el presente documento, "poner en contacto" o "mezclar" se refieren a la colocación de la(s) respectiva(s) enzima(s) lo suficientemente cerca del respectivo sustrato para posibilitar que la(s) enzima(s) convierta(n) el sustrato en el producto final. Los expertos en la materia reconocerán que mezclar soluciones de la enzima con los respectivos sustratos puede afectar a la puesta en contacto o mezcla.

[0066] "Porcentaje de identidad de secuencia" significa que una variante tiene al menos un determinado porcentaje de residuos de aminoácidos idéntico a una secuencia de referencia, cuando se alinea mediante la

utilización del algoritmo CLUSTAL W con los parámetros por defecto. Véase Thompson *et al.* (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-4680. Los parámetros por defecto para el algoritmo CLUSTAL W son los siguientes:

Gap opening penalty [penalización por apertura de hueco]:	10.0
Gap extension penalty [penalización por extensión de hueco]:	0.05
Protein weight matrix [matriz de peso de proteína]:	BLOSUM series
DNA weight matrix [matriz de peso de ADN]:	IUB
Delay divergent sequences % [% de retraso de secuencias divergentes]:	40
Gap separation distance [distancia de separación de hueco]:	8
DNA transitions weight [peso de transiciones de ADN]:	0.50
List hydrophilic residues [listar residuos hidrofílicos]:	GPSNDQEKR
Use negative matrix [usar matriz negativa]:	OFF
Toggle Residue specific penalties [alternar penalizaciones específicas por residuos]:	ON
Toggle hydrophilic penalties [alternar penalizaciones hidrofílicas]:	ON
Toggle end gap separation penalty [alternar penalización por separación de extremo de hueco]	OFF.

[0067] Las deleciones se cuentan como residuos no idénticos, en comparación con una secuencia de referencia. Se incluyen las deleciones que se produzcan en cualquier terminal. Por ejemplo, una variante con cinco deleciones de aminoácido del extremo C-terminal del polipéptido de TrGA maduro de SEQ ID NO: 2 tendría un porcentaje de identidad de secuencia de un 99 % (594/599 residuos idénticos × 100, redondeado al número entero más próximo) en relación con el polipéptido maduro. Una variante de este tipo sería abarcada por una variante que tenga "al menos un 99 % de identidad de secuencia" con respecto a un polipéptido de TrGA maduro.

[0068] La frase "sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)" se refiere a un proceso en la producción de productos bioquímicos en el que un organismo microbiano, tal como un microorganismo etanológeno y al menos una enzima, tal como la variante de glucoamilasa que se contempla actualmente, están presentes durante la misma etapa del proceso. SFS incluye la hidrólisis simultánea de sustratos de almidón (granular, tratados a una temperatura por debajo de la gelatinización, licuados o solubilizados) a sacáridos, incluida la glucosa, y la fermentación de los sacáridos en alcohol u otro producto bioquímico o biomaterial en el mismo recipiente en el que tiene lugar la reacción.

[0069] El término "bebida fermentada" se refiere a cualquier bebida producida mediante un método que comprende un proceso de fermentación, tal como una fermentación microbiana, por ejemplo, una fermentación bacteriana y/o de levadura.

[0070] "Cerveza" es un ejemplo de una bebida fermentada de este tipo y el término "cerveza" pretende comprender cualquier mosto fermentado producido mediante la fermentación/destilación de un material vegetal que contiene almidón. A menudo, la cerveza se produce exclusivamente a partir de malta o adjunto, o cualquier combinación de malta y adjunto. Entre los ejemplos de cervezas, se incluyen: cerveza de pura malta, cerveza elaborada de acuerdo con la Ley de la pureza, IPA, rubia, cerveza amarga, Happoshu (segunda cerveza), tercera cerveza, cerveza seca, bebida afín a la cerveza, cerveza ligera, cerveza de bajo contenido alcohólico, cerveza baja en calorías, *porter*, *bock*, cerveza negra, licor de malta, cerveza sin alcohol, licor de malta sin alcohol y similares, pero también bebidas a base de malta y cereales alternativas, tales como bebidas a base de malta con sabor a fruta, por ejemplo, con sabor a cítrico, tales como limón, naranja, lima o bebidas a base de malta con sabor a baya, bebidas a base de malta con sabor a licor, por ejemplo, licor de malta con sabor a vodka, ron o tequila o bebidas a base de malta con sabor a café, tal como licor a base de malta con sabor a cafeína y similares.

[0071] El término "malta" se refiere a cualquier grano de cereal malteado, tales como la cebada o el trigo malteados.

[0072] El término "adjunto" se refiere a cualquier material vegetal que contiene almidón y/o azúcar que no sea malta, tal como la malta de cebada o trigo. Entre los ejemplos de adjuntos, se incluye la sémola de maíz común, la sémola de maíz refinada, la levadura de cerveza molida, el arroz, el sorgo, el almidón de maíz refinado, la cebada, el almidón de cebada, la cebada descascarillada, el trigo, el almidón de trigo, el cereal torrefacto, los copos de cereal, el centeno, la avena, la patata, la tapioca, la mandioca y jarabes, tales como el jarabe de maíz, el jarabe de caña de azúcar, el jarabe de azúcar invertido, jarabes de cebada y/o de trigo y similares.

[0073] El término "masa de malta" se refiere a una suspensión acuosa de cualquier material vegetal que contiene almidón y/o azúcar, tal como malta molida, por ejemplo, que comprende malta de cebada triturada, cebada triturada y/u otro adjunto o una combinación de los mismos, que se mezcla con agua más adelante para separarse en mosto y bagazos.

[0074] El término "mosto" se refiere a la escorrentía de licor sin fermentar tras la extracción de la malta molida durante la maceración.

1.2. Abreviaturas

[0075] Se aplican las siguientes abreviaturas, a menos que se indique lo contrario:

ABTS	Ácido 2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) sal de diamonio
AkAA	Alfa-amilasa de *Aspergillus kawachii*
AmyE	Alfa-amilasa de *Bacillus subtilis*
AmyL	Alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis*
AmyR	Amilasa SPEZYME® XTRA
AmyS	Alfa-amilasa de *Geobacillus stearothermophilus*
AnGA	Glucoamilasa de *Aspergillus niger*
BAA	Alfa-amilasa bacteriana
ADNc	ADN complementario
CHCA	ácido α-ciano-4- hidroxicinámico
DE	dextrosa equivalente
DI	destilado, desionizado
ADN	ácido desoxirribonucleico
DPn	grado de polimerización con n subunidades
MS o ms	materia seca
DTT	ditiotreitol
EC	comisión enzimática para la clasificación de enzimas
ESI/MS	Ionización por *electrospray*/espectrometría de masas
FA	ácido fórmico
g	gramo
GAU	unidades de glucoamilasa
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
IAA	iodoacetamida
kg	kilogramo
LC/MS	Ionización por *electrospray*/espectrometría de masas
MALDI-TOF	Desorción ionización láser asistida por matriz - tiempo de vuelo
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
MRM	Monitoreo de reacciones múltiples
TM	tonelada métrica
MtP	placa de microtitulación

PM	peso molecular
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica
nm	nanómetro
DO	densidad óptica
RCP	reacción en cadena de polimerasa
PEG	polietilenglicol
IR	índice de rendimiento
ppm	partes por millón
ARN	ácido ribonucleico
OI	ósmosis inversa
FI	fase invertida
rpm	revoluciones por minuto
SFS	sacarificación y fermentación simultáneas
ATC	ácido tricloroacético
TrGA	glucoamilasa de *Trichoderma reesei*
p/v	peso/volumen
p/p	peso/peso
wt	tipo salvaje
µL o µl	microlitro

2. Enzimas en el procesamiento de almidón

2.1. Glucoamilasa de *Trichoderma reesei* (TrGA) y sus variantes

[0076] En el mercado, las glucoamilasas son enzimas muy importantes y se han utilizado en una amplia variedad de aplicaciones que requieren la hidrólisis de almidón (p. ej., para producir glucosa y otros monosacáridos a partir de almidón). Las glucoamilasas se utilizan para producir edulcorantes de maíz ricos en fructosa, que comprenden más del 50 % del mercado de edulcorantes en Estados Unidos. En general, las glucoamilasas pueden utilizarse y se utilizan habitualmente con alfa-amilasas en procesos de hidrolización de almidón para hidrolizar almidón a dextrinas y, a continuación, a glucosa. A continuación, la glucosa puede convertirse en fructosa por medio de otras enzimas (p. ej., glucosa isomerasas); cristalizarse; o utilizarse en fermentaciones para producir numerosos productos finales (p. ej., ácidos orgánicos, aminoácidos, biocombustibles y otros productos bioquímicos, incluidos, pero sin carácter limitativo, etanol, ácido cítrico, ácido láctico, ácido succínico, glutamato monosódico, ácido glucónico, gluconato de sodio, gluconato cálcico, gluconato de potasio, ácido itacónico y otros ácidos carboxílicos, glucono delta-lactona, eritorbato sódico, lisina, ácido graso omega 3, butanol, isopreno, 1,3-propanodiol y biodiesel).

[0077] Las glucoamilasas son producidas mediante numerosas cepas de bacterias, hongos, levaduras y plantas. Muchas glucoamilasas fúngicas se producen de manera extracelular por medio de los huéspedes, por ejemplo, a partir de cepas de *Aspergillus* (Svensson *et al.*, Carlsberg Res. Commun. 48: 529-544 (1983); Boel *et al.*, EMBO J. 3: 1097-1102 (1984); Hayashida *et al.*, Agric. Biol. Chem. 53: 923-929 (1989); documento de patente estadounidense n.º 5,024,941; documento de patente estadounidense n.º 4,794,175 y documento de patente WO 1988/09795); *Talaromyces* (documento de patente estadounidense n.º 4,247,637; documento de patente estadounidense n.º 6,255,084; y documento de patente estadounidense n.º 6,620,924); *Rhizopus* (Ashikari *et al.*, Agric. Biol. Chem. 50: 957-964 (1986); Ashikari *et al.*, App. Microbic. Biotech. 32: 129-133 (1989) y documento de patente estadounidense n.º 4,863,864); *Humicola* (documento de patente WO 2005/052148 y documento de patente estadounidense n.º 4,618,579); y *Mucor* (Houghton-Larsen *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 62: 210-217 (2003)). Muchos de los genes que codifican estas enzimas se han clonado y expresado en células de levadura, fúngicas y/o bacterianas.

[0078] Las glucoamilasas fúngicas consisten en tantos como tres dominios estructurales distintos: un dominio catalítico que se conserva de forma estructural en todas las glucoamilasas, por lo general, seguido por una

región de enlace que está conectada a un dominio de unión al almidón. La glucoamilasa de *Trichoderma reesei* QM6a (ATCC, número de accesión 13631) (TrGA) se ha conocido y caracterizado. TrGA comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, que se describe en el documento de patente estadounidense n.º 7,413,879, por ejemplo. La secuencia de ADNc que codifica la TrGA de *Trichoderma reesei* QM6a se presenta como SEQ ID NO: 4. La TrGA nativa comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, que incluye (1) un péptido señal que contiene 20 residuos de aminoácidos (SEQ ID NO: 3, posiciones 1 a 20 de SEQ ID NO: 1) y (2) una prosecuencia que contiene 13 residuos de aminoácidos (posiciones 21-33 de SEQ ID NO: 1). La escisión del péptido señal y la prosecuencia da lugar a la TrGA madura que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Como se muestra en la figura 1, el dominio catalítico de TrGA incluye los residuos 1-453 de SEQ ID NO: 2, el dominio de enlace de TrGA abarca los residuos 454-490 de SEQ ID NO: 2 y el dominio de unión al almidón de TrGA abarca los residuos 491-599 de SEQ ID NO: 2.

[0079] La estructura de TrGA se determinó a una resolución de 1,8 ángstroms. Véase el documento de patente WO 2009/048488 y el documento de patente WO 2009/048487. Mediante la utilización de las coordenadas determinadas, la estructura se alineó con las coordenadas del dominio catalítico de la glucoamilasa de cepa de *Aspergillus awamori* X100, que se determinó previamente (Aleshin, A.E., Hoffman, C. Firsov, L.M., y Honzatko, R.B. Refined crystal structures of glucoamylase from Aspergillus awamori var. X100. J. Mol. Biol. 238: 575-591 (1994)). Véase ídem. Las estructuras de los dominios catalíticos de estas dos glucoamilasas se traslapan muy cerca y es posible identificar residuos equivalentes a partir de esta superposición estructural. Véase ídem. También se cree que todas las glucoamilasas comparten la estructura básica. *Véase ídem.*

[0080] Según se publica en el documento de patente estadounidense n.º 8,058,033, una o más sustituciones de aminoácido en las siguientes posiciones de TrGA (SEQ ID NO: 2) pueden dar lugar a variantes que tienen una termoestabilidad mejorada y/o una actividad específica mejorada: 4, 5, 12, 24, 29, 43, 44, 45, 46, 47, 49, 51, 61, 70, 73, 75, 76, 94, 100, 108, 114, 116, 119, 122, 124, 125, 137, 143, 146, 148, 169, 171, 172, 175, 178, 180, 181, 208, 211, 228, 242, 243, 245, 292, 294, 297, 309, 310, 313, 314, 315, 316, 317, 321, 340, 341, 350, 353, 356, 363, 368, 369, 375, 376, 395, 398, 401, 408, 409, 412, 415, 417, 418, 421, 430, 431, 433, 436, 451, 503, 511, 535, 539 y/o 563. Las sustituciones pueden ser, por ejemplo: D4L/E/R/S/C/A/Q/W, F5C/M/N/R/S/T/V/W, I12L/R, D24E/L/Y/T, F29L/I/D/C/S/V/W, I43F/R/D/Y/S/Q, D44E/H/K/S/N/Y/F/R/C, Y47W, Y49N, N61D/I/L/Q/V/W, Q70R/K/M/P/G/L/F, G73F/C/L/W, Q75R/K/A, R76L/M/K/T/P, P94L, D100W/I/Q/M/P/A/N, N119P/T/Y/D/E, N146S/G/C/H/E/D/T/W/L/F/M, Q148V/Y/H/A/C/D/G/M/R/S/T, Y169D/F, Q172C/A/D/R/E/F/H/V/L/M/N/S/T/V, F 175H/A/G/R/S/T/C/W/Y, W 178A/C/D/E/F/G/H/K/N/R/S/T/V/Y, E180A/C/G/H/I/L/N/P/Q/R/S/T/V/Y/, V181E/C/D/G/H/I/P/T/Y/S/L/K/F/A, Q208L/A/C/E/N/F/H/T, S211C/R/E/A/Y/W/M/H/L/I/R/Q/T, E243S/R/N/M/Y/A/L, R245A/E/M/I/P/V, I292D/H/P/R/T/N/V/F/L, G294C/D/E/T/Q/I/A, K297F/L/P/T/M/D/N/Q/A/Y/H/S/R/W, R309A/C/G/H/I/N/P/Q/S/T/W/Y/L, Y310E/G/L/P/S/W/R/Q, D313Q, V314A/R/N/D/C/E/Q/G/H/I/L/K/M/F/P/S/T/W/Y, Y315F, Y316Q/R, N317T/H, K340D/T, K341F/D/P/V/G/S, T350S/E/A/N, Q356H/D/E, T363L/R/C/H/W, S368W/D/F/L, S369F, N376Q/T/H/S/V, Y395Q/R/S, A398S/I/T, S401C/V, R408S, N409W/T/K, T412A/H/K/G, L417A/D/E/F/G/I/K/Q/R/S/T/V/W/Y, T430A/E/F/G/H/I/K/M/N/Q/R/V, A431C/E/H/I/L/M/Q/R/S/W/Y, R433H/Q, I436A/T, S451M/T/H, E503A/C/D/H/S/V/W, Q511C/G/H/I/K/T/V, A535E/F/G/K/L/N/P/R/S/T/V/W/Y, A539E/H/M/R/S/W y/o N563/A/C/E/I/K/L/Q/T/V. Entre las posiciones anteriores, las posiciones 43, 44, 61, 73, 294, 417, 430, 431, 503, 511, 535, 539 y 563 parecen más atractivas, puesto que la mayoría de ellas se identificaron mediante cribado en un huésped de *Trichoderma reesei*. Una de las variantes de TrGA publicadas en el documento de patente estadounidense n.º 8,058,033 es CS4 (L417V + T430A + Q511H + A539R + N563I). CS4 muestra tanto una termoestabilidad mejorada (con un IR de 1,95 en comparación con TrGA) como una actividad específica mejorada (con un IR de al menos 1,21 en comparación con TrGA).

[0081] Las variantes de glucoamilasa que se contemplan actualmente pueden tener una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos un 90 %, un 91 %, un 92 %, un 93 %, un 94 %, un 95 %, un 96 %, un 97 %, un 98 % o un 99 % con respecto a TrGA (SEQ ID NO: 2). La variante de glucoamilasa que se contempla comprende sustituciones de aminoácido correspondientes a las posiciones: 50, 417, 430, 511, 539 y 563 de SEQ ID NO: 2 o posiciones correspondientes en una glucoamilasa original. La sustitución de aminoácido en la posición 50 es M50Y, G, F o K, mientras que las sustituciones de aminoácido en las posiciones 417, 430, 511, 539 y 563 son L417V, T430A, Q511H, A539R y N563I. La variante de glucoamilasa puede mostrar un aumento de la termoestabilidad y/ una mejora de la actividad específica en comparación con la glucoamilasa original. La variante de glucoamilasa puede perder menos actividad tras la oxidación en comparación con una segunda variante de glucoamilasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 en las mismas condiciones.

[0082] En la figura 1, se muestra un alineamiento ClustalW de la TrGA madura (SEQ ID NO: 2) con las glucoamilasas completas de varios miembros del agrupamiento de familias de *Trichoderma*/*Hypocrea*. Estas glucoamilasas completas incluyen las que proceden de

Hypocrea citrine var. *Americana* (SEQ ID NO: 7);
Hypocrea vinosa (SEQ ID NO: 8);
Trichoderma sp. (SEQ ID NO: 9);
Hypocrea gelatinosa (SEQ ID NO: 10);

Hypocrea orientalis (SEQ ID NO: 11);
Trichoderma konilangbra (SEQ ID NO: 12);
Trichoderma sp. (SEQ ID NO: 13);
Trichoderma harzianum (SEQ ID NO: 14);
Trichoderma longibrachiatum (SEQ ID NO: 15);
Trichoderma asperellum (SEQ ID NO: 16);
Trichoderma strictipilis (SEQ ID NO: 17);
Trichoderma virens Gv29-8 (SEQ ID NO: 18); y
Trichoderma atroviride IMI 206040 (SEQ ID NO: 19);

cada una de las cuales tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con respecto a SEQ ID NO: 2. Los alineamientos que se muestran en la figura 1 y las relaciones estructurales establecidas a partir de las estructuras cristalinas de TrGA y glucoamilasa de *A. Awamori*, por ejemplo, pueden guiar la construcción de las variantes de glucoamilasa contempladas actualmente. Entre las variantes de glucoamilasas, se incluyen, pero sin carácter limitativo, aquellas con una modificación de aminoácido seleccionada entre una sustitución, inserción o deleción de un aminoácido correspondiente en SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 y/o 19, además de las sustituciones contempladas en las posiciones 50, 417, 430, 511, 539 y 563 de SEQ ID NO: 2 o posiciones correspondientes en una glucoamilasa original. La correspondencia entre posiciones en TrGA y glucoamilasas de SEQ ID NO: 7-19 se determina con referencia al alineamiento que se muestra en la figura 1. Las variantes de glucoamilasa contempladas también pueden incluir, pero sin carácter limitativo, aquellas con 1, 2, 3, 4, 5 o 6 modificaciones de aminoácido seleccionadas de forma aleatoria. Las modificaciones de aminoácido pueden realizarse mediante la utilización de metodologías conocidas, tal como la mutagénesis oligo-dirigida.

2.2. Producción de glucoamilasa

[0083] Las variantes de glucoamilasa contempladas pueden producirse mediante la utilización de tecnología de ADN recombinante en diversas células huésped. En algunos modos de realización, las células huésped se seleccionan entre células bacterianas, fúngicas, vegetales y de levadura. El término "célula huésped" incluye tanto las células, como la progenie de las células y los protoplastos creados a partir de las células que se utilizan para producir una variante de glucoamilasa de acuerdo con la exposición. En algunos modos de realización, las células huésped son células fúngicas y normalmente células huésped fúngicas filamentosas. El término "hongos filamentosos" se refiere a todas las formas filamentosas de la subdivisión *Eumycotina* (véase Alexopoulos, C. J. (1962), INTRODUCTORY MYCOLOGY, Wiley, Nueva York). Estos hongos se caracterizan por un micelio vegetativo con una pared celular compuesta por quitina, celulosa y otros polisacáridos complejos. Los hongos filamentosos de la presente exposición son distintos de las levaduras en términos morfológicos, fisiológicos y genéticos. El crecimiento vegetativo de los hongos filamentosos se produce mediante elongación hifal y el catabolismo de carbono es obligatoriamente aerobio. En los modos de realización de la presente exposición, la célula original fúngica filamentosa puede ser una célula de una especie, pero sin carácter limitativo, de *Trichoderma,* (p. ej.*, Trichoderma reesei,* el morfo asexual de *Hypocrea jecorina,* clasificado anteriormente como *T. longibrachiatum, Trichoderma viride, Trichoderma koningii, Trichoderma harzianum*) (Sheir-Neirs *et al*., (1984) Appl. Microbiol. Biotechnol 20:46-53; ATCC No. 56765 y ATCC No. 26921); *Penicillium* sp., *Humicola* sp. (p. ej.*, H. insolens, H. lanuginosa* y *H. grisea*)*; Chrysosporium* sp. (p. ej.*, C. lucknowense*), *Gliocladium* sp., *Aspergillus* sp. (p. ej., *A. oryzae, A. niger, A sojae, A. japonicus, A. nidulans* y *A. awamori*) (Ward *et al*., (1993) Appl. Microbiol. Biotechnol. 39:738-743 y Goedegebuur *et al*., (2002) Genet 41:89-98), *Fusarium* sp. (p. ej.*, F. roseum, F. graminum, F. cerealis, F. oxysporuim* y *F. venenatum), Neurospora* sp. (*N. crass*), *Hypocrea* sp., *Mucor* sp. (*M. miehei*), *Rhizopus* sp. y *Emericella* sp. (véase también Innis *et al*., (1985) Sci. 228:21-26). El término "*Trichoderma*" o "*Trichoderma* sp." o "*Trichoderma* spp." se refiere a cualquier género fúngico clasificado anteriormente o actualmente como *Trichoderma.* En otros modos de realización, la célula huésped será una célula huésped creada genéticamente donde los genes nativos han sido inactivados, por ejemplo, mediante deleción en las células fúngicas. En los casos en los que se desee obtener una célula huésped fúngica que tenga uno o más genes inactivados, pueden utilizarse métodos conocidos (p. ej., los métodos expuestos en los documentos de patente estadounidense con n.º 5,246,853 y 5,475,101 y en el documento de patente WO 1992/06209). La inactivación del gen puede conseguirse mediante deleción completa o parcial, mediante inactivación insercional o mediante cualquier otro medio que convierta a un gen en no funcional para su fin previsto (de manera que se evite que el gen exprese una proteína funcional). En algunos modos de realización, cuando la célula huésped es una célula de *Trichoderma* y, en particular, una célula huésped de *T. reesei*, los genes *cbh*1*, cbh*2, *egl*1 y *egl*2 pueden inactivarse y/o normalmente delecionarse. Normalmente, las células huésped de *Trichoderma reesei* que tienen proteínas con deleción cuádruple se establecen y se describen en el documento de patente estadounidense n.º 5,847,276 y el documento de patente WO 2005/001036. En otros modos de realización, la célula huésped es una cepa carente de proteasa o proteasa negativa.

[0084] Para producir las variantes de glucoamilasa contempladas mediante la utilización de la tecnología de ADN recombinante, un constructo de ADN que comprende ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de la glucoamilasa indicada puede construirse y transferirse, por ejemplo, a una célula huésped de *Trichoderma reesei.* El vector puede ser cualquier vector que, cuando se introduce en una célula huésped de *Trichoderma reesei*, puede integrarse en el genoma de la célula huésped y puede replicarse. Se hace referencia al catálogo

de cepas del Fungal Genetics Stock Center (FGSC, <www.fgsc.net>) para la consulta de una lista de vectores. En Sambrook *et al.*, (1989) *supra*, y Ausubel (1987) *supra*, y van den Hondel *et al.* (1991) en Bennett y Lasure (Eds.), MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press pp. 396 428 y el documento de patente estadounidense con n.º 5,874,276, se proporcionan más ejemplos de vectores de expresión y/o integración adecuados. El ácido nucleico que codifica la glucoamilasa puede estar operativamente unido a un promotor adecuado, que muestra actividad transcripcional en la célula huésped de *Trichoderma reesei*. El promotor puede derivarse de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula huésped. Entre los ejemplos no limitativos adecuados de promotores, se incluyen *cbh1, cbh2, egl1* y *egl2.* En un modo de realización, el promotor puede ser un promotor de *T. reesei* nativo. Normalmente, el promotor puede ser *cbh1* de *T. reesei,* que es un promotor inducible y se ha depositado en GenBank con el número de accesión D86235. Un "promotor inducible" puede referirse a un promotor que es activo según la normativa medioambiental o de desarrollo. En otro modo de realización, el promotor puede ser uno que sea heterólogo a la célula huésped de *T. reesei*. Otros ejemplos de promotores útiles incluyen los promotores de genes de glucoamilasa de *A. awamori* y *A. niger* (véase, p. ej., Nunberg *et al.*, (1984) Mol. Cell Biol. 4:2306-2315 y Boel *et al.*, (1984) EMBO J. 3:1581-1585). Además, pueden utilizarse los promotores del gen de *T. reesei xlnl* y del gen de celobiohidrolasa 1 (*cbh1*) (EP 137280).

[0085] En algunos modos de realización, la secuencia codificadora de glucoamilasa puede estar operativamente unida a una secuencia señal. La secuencia señal puede ser el péptido señal nativo de la glucoamilasa (SEQ ID NO: 3, que representa los residuos 1-20 de SEQ ID NO: 1; la TrGA completa nativa, por ejemplo). De forma alternativa, la secuencia señal puede tener al menos un 90 % o al menos un 95 % de identidad de secuencia con respecto a la secuencia señal nativa. En modos de realización adicionales, una secuencia señal y una secuencia promotora que comprenden un constructo de ADN o vector que se introduce en la célula huésped de *T. reesei*, se obtienen de la misma fuente. Por ejemplo, en algunos modos de realización, la secuencia señal puede ser la secuencia señal de *cbhl* que está operativamente unida a un promotor de *cbhl*.

[0086] En algunos modos de realización, el vector de expresión también puede incluir una secuencia de terminación. En un modo de realización, la secuencia de terminación y la secuencia promotora pueden obtenerse de la misma fuente. En otro modo de realización, la secuencia de terminación puede ser homóloga a la célula huésped. Una secuencia terminadora particularmente adecuada puede ser *cbh1* obtenida de *T. reesei.* Otros ejemplos de terminadores fúngicos incluyen el terminador del gen de glucoamilasa de *A. niger* o *A. awamori*.

[0087] En algunos modos de realización, un vector de expresión puede incluir un marcador de selección. Entre los ejemplos de marcadores de selección representativos, se incluyen los que confieren resistencia antimicrobiana (p. ej., higromicina y pleomicina). Los marcadores selectivos nutricionales también se utilizan en la presente invención, incluidos los marcadores conocidos en la técnica como *amdS, argB* y *pyr4.* En la técnica, se conocen marcadores útiles en sistemas vectores para la transformación de *Trichoderma* (véase, p. ej., Finkelstein, capítulo 6 en BIOTECHNOLOGY OF FILAMENTOUS FUNGI, Finkelstein *et al.* Eds. Butterworth-Heinemann, Boston, Massachusetts (1992), Cap. 6.; y Kinghorn *et al.* (1992) APPLIED MOLECULAR GENETICS OF FILAMENTOUS FUNGI, Blackie Academic and Professional, Chapman and Hall, Londres). En un modo de realización representativo, el marcador selectivo puede ser el gen *amdS*, que codifica la enzima acetamidasa, lo que permite que las células transformadas crezcan en acetamida como fuente de nitrógeno. La utilización del gen *amdS* de *A. nidulans* como marcador selectivo se describe, por ejemplo, en Kelley *et al.*, (1985) EMBO J. 4:475-479 y Penttila *et al.*, (1987) Gene 61:155-164.

[0088] Un vector de expresión que comprende un constructo de ADN con un polinucleótido que codifica la glucoamilasa puede ser cualquier vector que sea capaz de replicarse de manera autónoma en un organismo huésped fúngico determinado o de integrarse en el ADN del huésped. En algunos modos de realización, el vector de expresión puede ser un plásmido. En modos de realización habituales, también se contemplan dos tipos de vectores de expresión para obtener la expresión de genes.

[0089] El primer vector de expresión puede comprender secuencias de ADN en las que tanto el promotor, como la región codificadora de glucoamilasa y el terminador se originan del gen que se ha de expresar. En algunos modos de realización, el truncamiento de genes puede obtenerse mediante la deleción de secuencias de ADN no deseadas (p. ej., ADN que codifica dominios no deseados) para dejar el dominio que se va a expresar bajo el control de sus propias secuencias reguladoras de transcripción y traducción.

[0090] El segundo tipo de vector de expresión puede ensamblarse previamente y contiene secuencias requeridas para la transcripción a alto nivel y un marcador de selección. En algunos modos de realización, la región codificadora para el gen de glucoamilasa o parte del mismo se puede insertar en este vector de expresión de propósito general, de manera que esté bajo el control de transcripción de las secuencias de promotor y terminador del constructo de expresión. En algunos modos de realización, los genes o parte de los mismos pueden insertarse en dirección 3' de un promotor fuerte, tal como el promotor fuerte *cbh1*.

[0091] En la técnica, se conocen métodos utilizados para ligar el constructo de ADN que comprende un polinucleótido que codifica la glucoamilasa, un promotor, un terminador y otras secuencias y para insertarlos en

un vector adecuado. La unión se consigue, por lo general, mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, los enlaces de oligonucleótidos sintéticos se utilizan de conformidad con la práctica convencional (véase, Sambrook (1989) *supra* y Bennett y Lasure, MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press, San Diego (1991) pp 70-76.). De forma adicional, los vectores pueden construirse mediante la utilización de técnicas de recombinación conocidas (p. ej., la tecnología Gateway de Invitrogen Life Technologies).

[0092] La introducción de un vector o constructo de ADN en una célula huésped incluye técnicas tales como la transformación; electroporación; microinyección nuclear; transducción; transfección, (p. ej., transfección mediante lipofección y mediante DEAE dextrina); incubación con precipitado de ADN-fosfato de calcio; bombardeo a alta velocidad con microproyectiles revestidos de ADN; y fusión de protoplastos. En la técnica, se conocen técnicas de transformación generales (véase, p. ej., 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 los documentos de patente estadounidenses con n.º 6,022,725; 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).

[0093] En algunos modos de realización, los transformantes genéticamente estables pueden construirse con sistemas vectores, por medio de los cuales el ácido nucleico que codifica glucoamilasa se integra de manera estable en un cromosoma de cepa huésped. A continuación, los transformantes pueden purificarse mediante técnicas conocidas.

[0094] En un ejemplo no limitativo, se diferencian transformantes estables que incluyen un marcador *amdS* de transformantes inestables por su índice de crecimiento más rápido y la formación de colonias circulares con un contorno liso en vez de irregular en el medio de cultivo sólido que contiene acetamida. De manera adicional, en algunos casos se puede realizar una prueba adicional de estabilidad mediante el crecimiento de los transformantes en un medio sólido no selectivo (es decir, un medio que carece de acetamida), la recogida de esporas de este medio de cultivo y la determinación del porcentaje de estas esporas que germinan posteriormente y crecen en un medio selectivo que contiene acetamida. De forma alternativa, pueden utilizarse otros métodos conocidos en la técnica para seleccionar transformantes.

[0095] La absorción de ADN en la cepa huésped de *Trichoderma* sp. depende de la concentración de ion calcio. Por lo general, pueden utilizarse entre aproximadamente 10 mM de $CaCl_2$ y 50 mM de $CaCl_2$ en una solución de absorción. Además de necesitarse el ion calcio en la solución de absorción, otros compuestos que se incluyen generalmente son un sistema tampón, tal como un tampón TE (10 Mm de Tris, pH 7,4; 1 mM de EDTA) o 10 mM de tampón MOPS, pH 6,0 (ácido morfolinopropanosulfónico) y polietilenglicol (PEG). Se cree que el polietilenglicol actúa para fusionar las membranas celulares, lo que permite que se distribuya el contenido del medio en el citoplasma de la cepa de *Trichoderma* sp. y el ADN plasmídico se transfiere al núcleo. Esta fusión deja frecuentemente múltiples copias del ADN plasmídico integradas en el cromosoma huésped.

[0096] Normalmente, en la transformación se utiliza una suspensión que contiene los protoplastos o células de *Trichoderma sp.* que han sido sometidos a un tratamiento de permeabilidad a una densidad de 10^5 a 10^7/mL, normalmente, 2×10^6/mL. Se mezcla un volumen de 100 µL de estos protoplastos o células en una solución adecuada (p. ej., 1,2 M de sorbitol; 50 mM de $CaCl_2$) con el ADN deseado. En general, se puede añadir una concentración elevada de PEG a la solución de absorción. Se puede añadir entre 0,1 y 1 volumen de PEG 4000 al 25 % a la suspensión de protoplastos. También es habitual añadir aproximadamente 0,25 volúmenes a la suspensión de protoplastos. También se pueden añadir aditivos, tales como dimetilsulfóxido, heparina, espermidina, cloruro de potasio y similares, a la solución de absorción y ayudar en la transformación. Se dispone de procedimientos similares para otras células huésped fúngicas. Véanse, por ejemplo, los documentos de patente estadounidense con n.º 6,022,725 y 6,268,328.

[0097] Por lo general, a continuación, la mezcla puede incubarse a continuación a aproximadamente 0 °C durante un periodo de entre 10 y 30 minutos. A continuación, se añade más PEG a la mezcla para mejorar más la absorción de la secuencia de ADN o del gen deseado. El PEG 4000 al 25 % puede añadirse generalmente en volúmenes de 5 a 15 veces el volumen de la mezcla de transformación; no obstante, pueden ser adecuados volúmenes mayores o menores. El PEG 4000 al 25 % puede ser normalmente aproximadamente 10 veces el volumen de la mezcla de transformación. A continuación, después de añadir el PEG, la mezcla de transformación puede incubarse a temperatura ambiente o en hielo antes de la adición de una solución de sorbitol y $CaCl_2$. A continuación, la suspensión de protoplastos puede añadirse de manera adicional a alícuotas fundidas de un medio de crecimiento. Este medio de crecimiento permite el crecimiento de transformantes únicamente.

[0098] Generalmente, las células se cultivan en un medio estándar que contiene sales fisiológicas y nutrientes, (véase, p. ej., 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). En los presentes modos de realización, también se pueden utilizar medios habituales preparados en el mercado (p. ej., caldo de extracto de malta (YM, por sus siglas en inglés), caldo de Luria Bertani (LB) y caldo de dextrosa Sabouraud (SD, por sus siglas en inglés).

[0099] Las condiciones de cultivo también son estándar (p. ej., los cultivos se incuban a aproximadamente 28 °C en un medio adecuado en cultivos de agitación o fermentadores hasta que se alcancen los niveles de expresión de glucoamilasa deseados). Después de establecer crecimiento fúngico, las células se exponen a condiciones efectivas para provocar o permitir la expresión de la glucoamilasa. En los casos en que la secuencia que codifica glucoamilasa está bajo el control de un promotor inducible, el agente inductor, (p. ej., un azúcar, sal de metal o antibiótico) puede añadirse al medio en una concentración efectiva para inducir la expresión de glucoamilasa.

[0100] En general, la glucoamilasa producida en cultivo celular puede secretarse en el medio y se puede purificar o aislar, por ejemplo, eliminando los componentes no deseados del medio de cultivo celular. En algunos casos, la glucoamilasa puede producirse de forma intracelular, de modo que se requiere la recuperación de un lisado celular. En tales casos, la enzima puede purificarse de las células en las que se produjo mediante la utilización de técnicas que los expertos en la materia emplean de forma rutinaria. Entre los ejemplos de estas técnicas, se incluyen, pero sin carácter limitativo, cromatografía de afinidad (Tilbeurgh *et a*l., (1984) FEBS Lett. 16: 215), métodos cromatográficos de intercambio iónico (Goyal *et al*., (1991) Biores. Technol. 36: 37; Fliess *et al*., (1983) Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17: 314; Bhikhabhai *et al*, (1984) J. Appl. Biochem. 6: 336; y Ellouz *et al*., (1987) Chromatography 396: 307), incluido el intercambio iónico mediante la utilización de materiales con alta resolución (Medve *et al*., (1998) J. Chromatography A 808: 153), cromatografía de interacción hidrofóbica (véase Tomaz y Queiroz, (1999) J. Chromatography A 865: 123; separación de dos fases (véase Brumbauer, *et al*., (1999) Bioseparation 7: 287); precipitación etanólica; HPLC en fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio de cationes como DEAE, cromatoenfoque, SDS-PAGE, precipitación con sulfato amónico y filtración por gel (p. ej., Sephadex G-75).

2.3. Otras enzimas

[0101] En modos de realización de la presente exposición, puede(n) incluirse otra(s) enzima(s) en una composición enzimática que comprende la variante de glucoamilasa contemplada. De forma adicional, puede(n) añadirse otra(s) enzima(s) a la variante de glucoamilasa contemplada en el procesamiento de almidón, por ejemplo, durante la sacarificación y/o la fermentación. Estas enzimas complementarias pueden incluir otra glucoamilasa, hexoquinasa, xilanasa, glucosa isomerasa, xilosa isomerasa, fosfatasa, fitasa, pululanasa, β-amilasas, α-amilasa, proteasa, celulasa, hemicelulasa, lipasa, cutinasa, trehalasa, isoamilasa, enzima redox, esterasa, transferasa, pectinasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, liasa u otras hidrolasas. Véase, por ejemplo, el documento de patente WO 2009/099783. Los expertos en la materia conocen bien los métodos para obtener y/o utilizar las enzimas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, la variante de glucoamilasa contemplada y otra(s) enzima(s) pueden coexpresarse, mezclarse o añadirse por separado en una aplicación. La variante de glucoamilasa contemplada también puede trabajar de manera sinérgica con enzimas vegetales que se producen de forma endógena o se crean genéticamente. De manera adicional, la variante de glucoamilasa contemplada puede trabajar de forma sinérgica con enzimas endógenas, creadas, secretadas o no secretadas de un huésped que produce el producto final deseado (p. ej., ácidos orgánicos, aminoácidos, biocombustibles y otros productos bioquímicos, incluidos, pero sin carácter limitativo, etanol, ácido cítrico, ácido láctico, ácido succínico, glutamato monosódico, ácido glucónico, gluconato de sodio, gluconato cálcico, gluconato de potasio, ácido itacónico y otros ácidos carboxílicos, glucono delta-lactona, eritorbato sódico, lisina, ácido graso omega 3, butanol, isopreno, 1,3-propanodiol y biodiesel). Además, las células huésped que expresan la variante de glucoamilasa contemplada pueden producir productos bioquímicos además de las enzimas utilizadas para digerir las diversas materias primas. Dichas células huésped puede ser útiles para procesos de fermentación o de sacarificación y fermentación simultáneas para reducir o eliminar la necesidad de añadir enzimas.

2.4. Alfa-amilasas

[0102] Las alfa-amilasas constituyen un grupo de enzimas presentes en microorganismos y tejidos de animales y plantas. Son capaces de hidrolizar enlaces alfa-1,4-glucosídicos de glucógeno, almidón, polisacáridos relacionados y algunos oligosacáridos. Aunque todas las alfa-amilasas poseen la misma función catalítica, sus secuencias de aminoácidos varían en gran medida. La identidad de secuencia entre diferentes amilasas puede ser prácticamente inexistente, por ejemplo, por debajo de un 25 %. A pesar de la variación considerable de la secuencia de aminoácidos, las alfa-amilasas comparten un esquema topológico global común que se ha identificado después de que se hayan determinado las estructuras tridimensionales de alfa-amilasas de diferentes especies. La estructura tridimensional común revela tres dominios: (1) un barril "TIM" conocido como dominio A, (2) una región de bucle largo conocida como dominio B, que se inserta dentro del dominio A, y (3) una región cercana al extremo C-terminal conocida como dominio C, que contiene una estructura beta característica con un motivo de clave griega.

[0103] Las alfa-amilasas que se suelen utilizar para aplicaciones industriales incluyen un grupo de alfa-amilasas homólogas producidas por *Bacillus* spp., incluidas *Bacillus licheniformis, Geobacillus stearothermophilus*

(anteriormente conocida como *Bacillus stearothermophilus*), *Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus* sp. NCIB 12289, *Bacillus* sp. NCIB 12512, *Bacillus* sp. NCIB 12513 y *Bacillus* sp. DSM 9375, que se describen en detalle en el documento de patente estadounidense n.º 6,440,716 y el documento de patente WO 1995/26397. Las alfa-amilasas útiles también incluyen AmyE, una amilasa de *Bacillus subtilis,* así como alfa amilasas fúngicas obtenidas a partir de cepas fúngicas filamentosas como *Aspergillus* (p. ej., *A. niger, A. clavatus, A. kawachi* y *A. oryzae*); *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp., *Lactobacilli* sp. y *Streptomuces* sp.

2.5. Beta-amilasas

[0104] Las β-amilasas (EC 3.2.1.2) son amilasas maltogénicas que actúan en exo, que catalizan la hidrólisis de enlaces 1,4-α-glucosídicos en amilopectina y polímeros de glucosa relacionados, de manera que se libera maltosa. Las β-amilasas se han aislado de diversas plantas y microorganismos. Véase Fogarty *et al.* (1979) en PROGRESS IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, Vol. 15, pp. 112-115. Estas β-amilasas tienen temperaturas óptimas en el rango de 40 °C a 65 °C y pH óptimo en el rango de aproximadamente entre 4,5 y aproximadamente 7,0. Entre las β-amilasas contempladas, se incluyen, pero sin carácter limitativo, β-amilasas de cebada SPEZYME® BBA 1500, SPEZYME® DBA, Optimalt™ME, Optimalt™ BBA (Danisco US Inc.); y Novozym™WBA (Novozymes A/S).

3. Procesamiento de almidón

3.1. Sustratos de almidón y materias primas

[0105] Los expertos en la materia conocen bien los métodos disponibles que pueden utilizarse para preparar sustratos de almidón para su utilización en los procesos expuestos en el presente documento. Por ejemplo, un sustrato de almidón útil puede obtenerse a partir de tubérculos, raíces, tallos, legumbres, cereales o grano entero. Más específicamente, el almidón granular proviene de plantas que producen grandes cantidades de almidón. Por ejemplo, el almidón granular puede obtenerse a partir de maíz, trigo, cebada, centeno, milo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, judía, plátano o patatas. El maíz contiene aproximadamente un 60-68 % de almidón; la cebada contiene aproximadamente un 55-65 % de almidón; el mijo contiene aproximadamente un 75-80 % de almidón; el trigo contiene aproximadamente un 60-65 % de almidón; y el arroz pulido contiene aproximadamente un 70-72 % de almidón. Los sustratos de almidón que se contemplan específicamente son el almidón de maíz, el almidón de trigo, el almidón de centeno, el almidón de sorgo, el almidón de mandioca, el almidón de milo, el almidón de mijo, el almidón de arroz, el almidón de salvado, la fécula de patata, el almidón de boniato, el almidón de tapioca y el almidón de cebada. El almidón de un grano puede estar molido o entero e incluye sólidos de maíz, tales como granos, salvado y/o mazorcas. El almidón puede ser almidón crudo muy refinado o materia prima de procesos de refinado de almidón. En el mercado, también se dispone de diversos almidones. Por ejemplo, Cerestar, Sigma y Katayama Chemical Industry Co. (Japón) disponen de almidón de maíz; Sigma dispone de almidón de trigo; Wako Pure Chemical Industry Co. (Japón) dispone de almidón de boniato y Nakaari Pharmaceutical Co. (Japón) dispone de fécula de patata.

3.2. Molienda

[0106] El sustrato de almidón puede ser un almidón crudo de grano entero molido, que contiene fracciones sin almidón, por ejemplo, residuos de germen y fibras. La molienda puede comprender bien la molienda en húmedo o la molienda en seco. En la molienda en húmedo, el grano entero puede ponerse en remojo en agua o en ácido diluido para separar el grano en sus componentes, por ejemplo, almidón, proteína, germen, aceite, fibras de grano. La molienda en húmedo separa de forma eficiente el germen y la harina (es decir, gránulos de almidón y proteínas) y puede ser especialmente adecuada para la producción de jarabes. En la molienda en seco, se muelen los granos enteros hasta obtener un polvo fino y se procesan sin fraccionar el grano en sus componentes. Por lo tanto, el grano molido en seco comprenderá cantidades considerables de compuestos de carbohidratos sin almidón, además de almidón. La mayoría del etanol proviene de molienda en seco. De forma alternativa, el almidón que ha de procesarse puede ser de una calidad de almidón refinado alta, por ejemplo, al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 97 % o al menos aproximadamente un 99,5 % puro.

3.3. Gelatinización y licuefacción

[0107] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "licuefacción" o "licuar" significa un proceso mediante el cual el almidón se convierte en dextrinas de cadena más corta menos viscosas y solubles. Este proceso implica la gelatinización de almidón simultáneamente con o seguido de la adición de alfa-amilasas. También pueden añadirse, de forma opcional, enzimas inductoras de licuefacción adicionales, por ejemplo, una fitasa.

[0108] En algunos modos de realización, el sustrato de almidón preparado como se ha descrito anteriormente puede suspenderse en agua. La suspensión de almidón puede contener almidón como porcentaje en peso de materia seca de aproximadamente un 10-55 %, aproximadamente un 20-45 %, aproximadamente un 30-45 %, aproximadamente un 30-40 % o aproximadamente un 30-35 %. Para optimizar la estabilidad y la actividad de las

alfa-amilasas, el pH de la suspensión puede ajustarse al pH óptimo para las alfa-amilasas. Las alfa-amilasas que permanecen en la suspensión después de la licuefacción pueden desactivarse bajando el pH en una etapa de reacción posterior o mediante la eliminación del calcio de la suspensión.

[0109] La suspensión de almidón más las alfa-amilasas puede bombearse de forma continua por medio de una *jet cooker* (caldera de inyección de vapor), que puede calentarse mediante vapor desde aproximadamente 85 °C hasta aproximadamente 105 °C. La gelatinización se produce muy rápidamente en estas condiciones y la actividad enzimática, junto con los esfuerzos de cizalla considerables, activa la hidrólisis del sustrato de almidón. El tiempo de permanencia en la *jet cooker* puede ser muy breve. El almidón parcialmente gelatinizado puede pasar por una serie de tubos de retención que se mantienen a aproximadamente 85-105 ºC y retenerse durante aproximadamente 5 min para completar el proceso de gelatinización. Estos depósitos pueden contener deflectores para evitar la retromezcla. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "licuefacción secundaria" se refiere a la etapa de licuefacción posterior a la licuefacción primaria, cuando se deja enfriar la suspensión hasta alcanzar la temperatura ambiente. Esta etapa de enfriamiento puede durar entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 180 minutos, por ejemplo, aproximadamente 90 y 120 minutos. El grano molido y licuado también se conoce como masa.

3.4. Sacarificación

[0110] Después de la licuefacción, la masa también puede hidrolizarse por medio de la sacarificación para producir azúcares fermentescibles que pueden utilizarse fácilmente en las aplicaciones posteriores. La sacarificación de los presentes modos de realización puede llevarse a cabo mediante la adición de una variante de glucoamilasa, como se ha descrito anteriormente. La variante de glucoamilasa puede dosificarse en el rango de aproximadamente 0,1 a 2,0 GAU/g ms, de aproximadamente 0,2 a 1,0 GAU/g ms, de aproximadamente 0,2 a 0,5 GAU/g ms o de aproximadamente 0,325 GAU/g ms. La sacarificación puede llevarse a cabo a entre aproximadamente 30 ºC y aproximadamente 60 °C o aproximadamente 40 ºC y aproximadamente 60 °C.

[0111] Una etapa de sacarificación completa puede, normalmente, variar entre 24 y 96 horas, 24 y 72 horas o 24 y 48 horas. En algunos modos de realización, la etapa de sacarificación y la etapa de fermentación se combinan y el proceso se denomina sacarificación y fermentación simultáneas (SFS).

[0112] En algunos modos de realización, puede eliminarse la etapa de cocción o exposición del almidón que contiene sustrato a temperaturas superiores a la temperatura de gelatinización del almidón en el sustrato. Estos procesos de fermentación pueden incluir la molienda de un grano de cereal o grano fraccionado y la combinación del grano de cereal molido con líquido para formar una suspensión que, a continuación, se mezcla en un único recipiente con la variante de glucoamilasa que se contempla actualmente y, opcionalmente, otras enzimas, tales como, pero sin carácter limitativo, alfa-amilasas, otras glucoamilasas y enzimas que tienen actividad de hidrólisis o actividad potenciadora de almidón granular y levadura para producir etanol y otros productos derivados o producir otro producto bioquímico mediante la utilización de levadura u otros huéspedes de producción. Por ejemplo, existen enzimas o proteínas que parecen potenciar la actividad de celulasas en la celulosa (p. ej., mediante la oxidación de celulosa). En algunos casos, la levadura u otros huéspedes de producción también pueden producir la glucoamilasa y/u otras enzimas. Véase, por ejemplo, el documento de patente estadounidense n.º 4,514,496, el documento de patente WO 2004/081193 y el documento de patente WO 2004/080923.

3.5. Fermentación

[0113] En algunos modos de realización de la presente exposición, los azúcares fermentescibles pueden someterse a condiciones de fermentación continua o por lotes. Una fermentación por lotes clásica es un sistema cerrado, donde la composición del medio se establece al principio de la fermentación y no se somete a alteraciones artificiales durante la fermentación. Por lo tanto, al principio de la fermentación el medio puede inocularse con el/los organismo(s) deseado(s). En este método, se puede permitir que se produzca la fermentación sin la adición de ningún componente en el sistema. Normalmente, una fermentación por lotes se clasifica como un "lote" con respecto a la adición de la fuente de carbono y se suelen llevar a cabo intentos en los factores controladores tales como la concentración de oxígeno y pH. Las composiciones de biomasa y metabolito del sistema de lotes cambian constantemente hasta el momento en que se detiene la fermentación. Dentro de los cultivos de lotes, las células pasan de una fase de latencia estática a una fase logarítmica de crecimiento elevado y, finalmente, a una fase estacionaria en la que el índice de crecimiento disminuye o se detiene. Si no se tratan, las células en la fase estacionaria finalmente mueren. En general, las células en fase logarítmica son responsables de la mayor parte de producción del producto final.

[0114] Una variación en el sistema de lotes estándar consiste en el sistema de "fermentación por lote alimentado", que puede utilizarse en algunos modos de realización de la presente exposición. En esta variación de un sistema de lotes habitual, el sustrato puede añadirse en pequeñas cantidades a medida que progresa la fermentación. Los sistemas por lote alimentado son particularmente útiles cuando la represión catabólica es capaz de inhibir el metabolismo de las células y en los casos en los que es deseable tener cantidades limitadas de sustrato en el medio. La medición de la concentración de sustrato actual en los sistemas por lote alimentado

puede resultar difícil y, por lo tanto, se calcula sobre la base de los cambios de factores mensurables tales como el pH, el oxígeno disuelto y la presión parcial de gases residuales, tales como el CO_2. En la técnica, se conoce tanto la fermentación por lotes como la fermentación por lote alimentado.

[0115] Por otro lado, la fermentación continua es un sistema abierto en el que puede añadirse un medio de fermentación definido de manera continua a un biorreactor y una cantidad similar de medio condicionado puede eliminarse simultáneamente para su procesamiento. Por lo general, la fermentación continua mantiene los cultivos a una densidad elevada constante en la que las células se encuentran, fundamentalmente, en crecimiento de fase logarítmica. La fermentación continua permite la modulación de un factor o cualquier número de factores que afectan el crecimiento celular y/o la concentración de producto final. Por ejemplo, en un modo de realización, un nutriente limitativo, tal como la fuente de carbono o fuente de nitrógeno, puede mantenerse a una velocidad fija, mientras que todos los demás parámetros se moderan. En otros sistemas, puede alterarse de forma continua un número de factores que afectan el crecimiento, mientras que la concentración de células, medida mediante la turbidez de los medios, puede mantenerse constante. Los sistemas continuos se esfuerzan por mantener las condiciones de crecimiento de estado constantes. Por lo tanto, la pérdida de células producida por el drenaje del medio debe equilibrarse con respecto al índice de crecimiento celular en la fermentación. En la técnica de la microbiología industrial, se conocen métodos de modulación de nutrientes y factores de crecimiento para procesos de fermentación continuos, así como técnicas para maximizar la velocidad de la formación del producto.

[0116] En otros modos de realización, mediante la utilización de microorganismos de fermentación como se conoce en la técnica, el producto final de fermentación puede incluir sin carácter limitativo alcohol, productos intermedios de ácido ascórbico (p. ej., gluconato; ácido 2-ceto-L-gulónico; 5-ceto-gluconato; y 2,5-dicetogluconato); 1,3-propanodiol; aminoácidos aromáticos (p. ej., tirosina, fenilalanina y triptófano); ácidos orgánicos (p. ej., lactato, piruvato, succinato, isocitrato y oxaloacetato); aminoácidos (p. ej., serina y glicina); antibióticos; antimicrobianos; enzimas; vitaminas y hormonas. Véase, por ejemplo, el documento de patente WO 2008/086811 (fermentación de metanol, etanol, propanol y butanol); el documento de patente WO 2003/066816, los documentos de patente estadounidense 5,254,467 y 6,303,352 (fermentación de 1,3-propanodiol); los documentos de patente estadounidense RE 37,393, 6,265,190 y 6,596,521 (fermentación de ácido succínico); el documento de patente estadounidense n.º 5,464,760, el documento de patente WO 2003/095659, Mercier *et al.*, J. Chem. Tech. Biotechnol. 55: 111-121, Zhang and Cheryan, Biotechnol. Lett. 13: 733-738 (1991), Linko and Javanainen, Enzyme Microb. Technol. 19: 118-123 (1996), and Tsai and Moon, Appl. Biochem. Biotechnol. 70-72: 417-428 (1998) (fermentación de ácido láctico); los documentos de patente estadounidense 7,320,882, 7,332,309, 7,666,634 y Zhang *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 77: 355-366 (2007) (fermentación de diversos aminoácidos). La lista mencionada anteriormente contiene únicamente ejemplos y un experto en la materia será consciente de un número de microorganismos de fermentación que pueden utilizarse de manera adecuada para obtener un producto final deseado.

3.6. Sacarificación y fermentación simultáneas (SFS)

[0117] Durante la SFS, se añaden las enzimas hidrolizantes junto con el productor del producto final, que es normalmente un microorganismo. Las enzimas liberan azúcares de peso molecular menor, es decir, azúcares fermentescibles DP1-3, a partir del sustrato de almidón, mientras que el microorganismo, de manera simultánea, utiliza los azúcares fermentescibles para el crecimiento y la producción del producto final. Normalmente, se seleccionan las condiciones de fermentación que proporcionan una temperatura y un pH óptimos para estimular la mejor cinética del crecimiento de la cepa de célula huésped del productor y las condiciones catalíticas para las enzimas producidas por el cultivo. Véase, por ejemplo, Doran *et al.*, Biotechnol. Progress 9: 533-538 (1993).

[0118] En otros modos de realización, mediante la utilización de los microorganismos de fermentación adecuados, como se conoce en la técnica, para producir el producir el producto final deseado, los expertos en la materia son capaces de ajustar las condiciones de SFS, por ejemplo, la temperatura, la composición de nutrientes, las condiciones de luz, la disponibilidad de oxígeno, etc.

4. Composiciones que comprenden las variantes de glucoamilasa y la utilización de las mismas

[0119] Las variantes de glucoamilasa que se contemplan en el presente documento pueden utilizarse en composiciones enzimáticas, incluidas, pero sin carácter limitativo, composiciones de hidrólisis y sacarificación de almidón, composiciones detergentes y de limpieza (p. ej., detergentes para ropa, detergentes lavavajillas y composiciones de limpieza de superficies duras), composiciones de fermentación de alcohol y en composiciones de pienso para animales, por ejemplo. Además, estas glucoamilasas pueden utilizarse en aplicaciones de cocción, tales como producción de panes y pasteles, destilación, sanidad, textil, procesos de transformación de residuos medioambientales, procesamiento de biopulpeo y aplicaciones de transformación de biomasa.

[0120] En algunos modos de realización, una composición enzimática que comprende una glucoamilasa contemplada en el presente documento se utilizará, de forma opcional, en combinación con cualquiera o en cualquier combinación con las siguientes enzimas: hexoquinasas, xilanasas, glucosa isomerasas, xilosa isomerasas, otras isomerasas, fosfatasas, fitasas, pululanasas, β-amilasas, α-amilasas, trehalasas, proteasas,

celulasas, hemicelulasas, lipasas, cutinasas, isoamilasas, enzimas redox, esterasas, transferasas, pectinasas, alfa-glucosidasas, beta-glucosidasas, liasas, otras glucoamilasas y otras hidrolasas.

[0121] En algunos modos de realización, la composición enzimática incluirá una alfa amilasa, tales como alfa amilasas fúngicas (p. ej., *Aspergillus sp.*) o alfa amilasas bacterianas (p. ej., *Bacillus sp.* tal como *B. stearothermophilus, B. amyloliquefaciens, B. subtilis* y *B. licheniformis*) y variantes e híbridos de las mismas. En algunos modos de realización, la alfa amilasa es una alfa amilasa ácida estable. En algunos modos de realización, la alfa-amilasa es alfa amilasa de *Aspergillus kawachi* (AkAA), véase el documento de patente estadounidense n.º 7,037,704. Se conocen alfa-amilasas disponibles en el mercado cuya utilización se contempla en las composiciones de la exposición, e incluyen GZYME G997, SPEZYME FRED, SPEZYME XTRA (Danisco US, Inc, Genencor Division), TERMAMYL 120-L y SUPRA (Novozymes, Biotech.).

[0122] En algunos modos de realización, la composición enzimática incluirá una proteasa de ácido fúngico. En otro modo de realización, la proteasa de ácido fúngico se obtiene a partir de una *Trichoderma sp* y puede ser cualquiera de las proteasas expuestas en el documento de patente US 2006/0154353, publicado el 13 de julio de 2006. En otro modo de realización, la composición enzimática incluirá una fitasa de *Buttiauxella* spp. (p. ej., BP-17, véanse también las variantes expuestas en el documento de publicación de patente PCT WO 2006/043178).

[0123] En otros modos de realización, las glucoamilasas que se contemplan en el presente documento pueden combinarse con otras glucoamilasas. En algunos modos de realización, dichas glucoamilasas se combinarán con una o más glucoamilasas derivadas de otras cepas de *Trichoderma* o variantes de *Monascus kaoliang,* o de *Aspergillus* o variantes de las mismas, tales como *A. oryzae, A. niger, A. kawachi, A. fumigatus, A. terreus* y *A. awamori*; glucoamilasas derivadas de cepas de *Humicola* o variantes de las mismas; glucoamilasas derivadas de cepas de *Talaromyces* o variantes de las mismas, tales como *T. emersonii;* glucoamilasas derivadas de cepas de *Athelia,* tales como *A. rolfsii*; o glucoamilasas derivadas de cepas de *Penicillium,* tales como *P. chrysogenum,* por ejemplo.

[0124] En concreto, las glucoamilasas contempladas en el presente documento pueden utilizarse para procesos de conversión de almidón y, en concreto, en la producción de dextrosa para jarabes de fructosa, azúcares especiales y en alcohol y en la producción de (p. ej., ácidos orgánicos, aminoácidos, biocombustibles y otros productos bioquímicos) otros productos finales a partir de la fermentación de sustratos que contienen almidón (p. ej., G.M.A. van Beynum *et al*., Eds. (1985) STARCH CONVERSION TECHNOLOGY, Marcel Dekker Inc. NY; véase también el documento de patente estadounidense n.º 8,178,326). Las dextrinas producidas mediante la utilización de composiciones de variante de glucoamilasa de la exposición pueden dar lugar a producciones de glucosa de al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 % y al menos un 95 %. La producción de alcohol a partir de la fermentación de sustratos de almidón mediante la utilización de glucoamilasas contempladas en el presente documento puede incluir la producción de alcohol carburante o alcohol potable.

[0125] En algunos modos de realización, las variantes de glucoamilasa contempladas en el presente documento se utilizarán en la hidrólisis de almidón de diversos sustratos vegetales, que se utilizan para la producción de alcohol. En algunos modos de realización, los sustratos vegetales incluirán maíz, trigo, cebada, centeno, milo, arroz, caña de azúcar, patatas y combinaciones de los mismos. En algunos modos de realización, el sustrato vegetal será material vegetal fraccionado, por ejemplo, un grano de cereal, tal como maíz, que se fracciona en componentes como fibra, germen, proteína y almidón (endospermo) (documento de patente estadounidense n.º 6,254,914 y documento de patente estadounidense n.º 6,899,910). En THE ALCOHOL TEXTBOOK, A REFERENCE FOR THE BEVERAGE, FUEL AND INDUSTRIAL ALCOHOL INDUSTRIES, 3ª Ed., Eds. K.A. Jacques *et al*., 1999, Nottingham University Press, RU, se describen métodos de fermentaciones de alcohol. En determinados modos de realización, el alcohol será etanol. En concreto, los procesos de producción de fermentación de alcohol se caracterizan como procesos de molienda en húmedo o de molienda en seco. En algunos modos de realización, la glucoamilasa puede utilizarse en un proceso de fermentación de molienda en húmedo y en otros modos de realización la glucoamilasa se utilizará en un proceso de molienda en seco.

[0126] La molienda de granos en seco implica un número de etapas básicas, que generalmente incluyen: molienda, cocción, licuefacción, sacarificación, fermentación y separación de líquido y sólidos para producir alcohol y otros productos derivados. El material vegetal y, en concreto, los granos de cereales enteros, tales como maíz, trigo o centeno, se muelen. En algunos casos, el grano puede, en primer lugar, fraccionarse en componentes. El material vegetal molido puede triturarse para obtener una partícula gruesa o fina. El material vegetal molido puede mezclarse con líquido (p. ej., agua y/o vinaza) en un depósito de suspensión. La suspensión se somete a temperaturas elevadas (p. ej., entre 90 °C y 105 °C o superiores) en una cocina de chorro junto con enzimas de licuefacción (p. ej., alfa amilasas) para solubilizar e hidrolizar el almidón del grano a dextrinas. La mezcla puede enfriarse y también tratarse con enzimas sacarificantes, tales como glucoamilasas abarcadas por la presente exposición, para producir glucosa. A continuación, la masa de malta que contiene glucosa puede fermentarse durante entre aproximadamente 24 y 120 horas en presencia de microorganismos de fermentación, tales como microorganismos de producción de etanol y, en particular, levadura (*Saccharomyces spp*). Los sólidos de la masa de malta se separan de la fase líquida y se obtiene alcohol, tal como etanol y productos derivados útiles, tales como residuos desecados.

[0127] La variante de glucoamilasa contemplada puede ser un componente de una composición de destilación utilizado en un proceso de destilación, es decir, la producción de una bebida a base de malta fermentada. Los carbohidratos no fermentables forman la mayoría de los sólidos disueltos de la cerveza final. Este residuo permanece debido a la incapacidad de las amilasas de malta para hidrolizar los enlaces alfa-1,6 del almidón. Los carbohidratos no fermentables aportan aproximadamente 50 calorías por 12 onzas (0,354 litros) de cerveza. La variante de glucoamilasa, en combinación con una glucoamilasa y, opcionalmente, una pululanasa y/o isoamilasa, ayuda en la conversión del almidón en dextrinas y azúcares fermentescibles, lo que reduce los carbohidratos residuales no fermentables de la cerveza final.

[0128] Las principales materias primas utilizadas en la fabricación de estas bebidas son agua, lúpulo y malta. Además, adjuntos como la sémola de maíz común, la sémola de maíz refinada, la levadura de cerveza molida, el arroz, el sorgo, el almidón de maíz refinado, la cebada, el almidón de cebada, la cebada descascarillada, el trigo, el almidón de trigo, el cereal torrefacto, los copos de cereal, el centeno, la avena, la patata, la tapioca y jarabes, tales como el jarabe de maíz, el jarabe de caña de azúcar, el jarabe de azúcar invertido, jarabes de cebada y/o de trigo y similares pueden utilizarse como fuente de almidón.

[0129] Por una serie de razones, la malta, que se produce principalmente a partir de determinadas variedades de cebada, tiene el mayor efecto en el carácter y calidad globales de la cerveza. En primer lugar, la malta es el agente aromatizante principal de la cerveza. En segundo lugar, la malta proporciona la mayor parte de los azúcares fermentescibles. En tercer lugar, la malta aporta las proteínas, que contribuirán al carácter del cuerpo y la espuma de la cerveza. En cuarto lugar, la malta proporciona la actividad enzimática necesaria durante la maceración. El lúpulo también contribuye de forma significativa a la calidad de la cerveza, incluido su aroma. En concreto, el lúpulo (o los constituyentes de lúpulo) añade sustancias amargas deseables a la cerveza. Además, el lúpulo actúa como precipitante de proteínas, establece conservantes y ayuda en la formación y la estabilización de la espuma.

[0130] Los granos, tales como la cebada, la avena, el trigo, así como los componentes vegetales, tales como el maíz, el lúpulo y el arroz, también se utilizan para la destilación, tanto en la industria como en la destilación casera. Los componentes utilizados en la destilación pueden no maltearse o pueden maltearse, es decir, germinarse parcialmente, lo que da lugar a un incremento de la concentración de enzimas, incluida la α-amilasa. Para que la destilación se realice con éxito, se necesitan concentraciones adecuadas de actividad enzimática de α-amilasa para garantizar las concentraciones adecuadas de azúcares para la fermentación. La variante de glucoamilasa contemplada, puede añadirse en consecuencia a los componentes utilizados para la destilación, sola o en combinación con otra(s) α-amilasa(s).

[0131] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "materia madre" significa granos y componentes vegetales que se machacan o rompen. Por ejemplo, la cebada utilizada en la producción de cerveza es un grano que se ha molido o machacado bruscamente para obtener una consistencia adecuada para producir una masa de malta para la fermentación. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "materia madre" incluye cualquiera de los tipos de plantas y granos anteriormente mencionados machacados o molidos bruscamente. Los métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse para determinar las concentraciones de actividad de α-amilasa tanto en las harinas como en la materia madre.

[0132] En la técnica, se conocen procesos para la fabricación de cerveza. Véase, p. ej., Wolfgang kunze (2004) "Technology Brewing and Malting," Research and Teaching Institute of Brewing, Berlín (VLB), 3ª edición. En resumen, el proceso conlleva: (a) la preparación de una masa de malta, (b) el filtrado de la masa de malta para preparar un mosto y (c) la fermentación del mosto para obtener una bebida fermentada, como la cerveza. Normalmente, la malta molida o machacada se mezcla con agua y se mantiene durante un periodo de tiempo en temperaturas controladas para permitir que las enzimas presentes en la malta transformen el almidón presente en la malta en azúcares fermentescibles. A continuación, la masa de malta se transfiere a un filtro de masa de malta en el que el líquido se separa del residuo de grano. Este líquido dulce se denomina "mosto" y el residuo de grano restante se denomina "bagazo". La masa de malta se somete normalmente a una extracción, lo que conlleva la adición de agua a la masa de malta con el fin de recuperar el extracto soluble residual del bagazo. A continuación, el mosto se hierve enérgicamente para esterilizar el mosto y ayudar a desarrollar el color, el sabor y el olor. El lúpulo se añade en algún momento durante la ebullición. El mosto se enfría y se transfiere a un fermentador.

[0133] A continuación, se pone el mosto en contacto con levadura en un fermentador. El fermentador puede refrigerarse para detener la fermentación. La levadura flocula y se elimina. Finalmente, la cerveza se enfría y se almacena durante un periodo de tiempo, durante el cual la cerveza se clarifica y se desarrolla su sabor, y cualquier material que pueda afectar al aspecto, los sabores y/o la vida útil de almacenamiento de la cerveza se asienta. La cerveza contiene normalmente entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 10 % v/v de alcohol, aunque puede obtenerse cerveza con un contenido de alcohol mayor, por ejemplo, un 18 % v/v. Antes del embalaje, la cerveza puede carbonatarse y, de forma opcional, filtrarse y pasteurizarse.

[0134] La composición de destilación que comprende la variante de glucoamilasa contemplada, en combinación con otra glucoamilasa y, opcionalmente, una alfa amilasa, una pululanasa y/o isoamilasa, puede añadirse a la masa de malta de la etapa (a) citada, es decir, durante la preparación de la masa de malta. De manera alternativa o adicional, la composición de destilación puede añadirse a la masa de malta de la etapa (b) citada, es decir, durante el filtrado de la masa de malta. De manera alternativa o adicional, la composición de destilación puede añadirse al mosto de la etapa (c) citada, es decir, durante la fermentación del mosto.

[0135] Una bebida fermentada, como una cerveza, puede producirse mediante uno de los métodos anteriores. La bebida fermentada puede ser una cerveza, tal como cerveza de pura malta, cerveza elaborada de acuerdo con la Ley de la pureza, IPA, rubia, cerveza amarga, Happoshu (segunda cerveza), tercera cerveza, cerveza seca, bebida afín a la cerveza, cerveza ligera, cerveza de bajo contenido alcohólico, cerveza baja en calorías, *porter*, *bock*, cerveza negra, licor de malta, cerveza sin alcohol, licor de malta sin alcohol y similares, pero también bebidas a base de malta y cereales alternativas, tales como bebidas a base de malta con sabor a fruta, por ejemplo, con sabor a cítrico, tales como limón, naranja, lima o bebidas a base de malta con sabor a baya, bebidas a base de malta con sabor a licor, por ejemplo, licor de malta con sabor a vodka, ron o tequila o bebidas a base de malta con sabor a café, tal como licor a base de malta con sabor a cafeína y similares.

[0136] En algunos modos de realización, la exposición se refiere a un método de sacarificación de una solución de almidón líquida, que comprende una etapa de sacarificación enzimática mediante la utilización de una o más glucoamilasas contempladas en el presente documento.

[0137] La presente exposición también da a conocer una composición o formulación de pienso para animales que comprende al menos una glucoamilasa contemplada en el presente documento. En el documento de patente WO 2003/049550, por ejemplo, se dan a conocer métodos de utilización de una enzima de glucoamilasa en la producción de piensos que comprenden almidón. En resumen, la glucoamilasa puede mezclarse con un pienso que comprende almidón. La glucoamilasa es capaz de degradar el almidón resistente para que el animal lo utilice, ya sea *in vitro* o *in vivo.* Otros objetos y ventajas de la presente exposición resultan evidentes a partir de la presente memoria.

5. Métodos utilizados en los ejemplos

[0138] Los siguientes materiales, ensayos y métodos se utilizan en los ejemplos que se proporcionan a continuación:

Método de HPLC para medir la composición sacárida, la producción de etanol y la reducción de DP4+

[0139] La composición de los productos de reacción de oligosacáridos se midió mediante un sistema de HPLC (Beckman System Gold 32 Karat Fullerton, California). El sistema, mantenido a 50 °C, se equipó con una columna H de monosacáridos Rezex 8 u8 % y un detector de índice de refracción (RI, por sus siglas en inglés) (ERC-7515A, Anspec Company, Inc.). Se aplicó ácido sulfúrico diluido (0,01 N) como fase móvil a un caudal de 0,6 ml/min. Se inyectaron 20 µl de solución al 4,0 % de la mezcla de reacción a la columna. La columna separa sacáridos a partir de sus pesos moleculares. La distribución de los sacáridos y la cantidad de cada sacárido se determinaron a partir de patrones ejecutados anteriormente.

[0140] Para determinar la producción de etanol y la reducción de DP4+, se descongelaron muestras puntuales a 4 ºC y se centrifugaron durante 2 min a 15 000 rpm. Se mezclaron 100 µL de los sobrenadantes de las muestras en tubos de microcentrifugación individuales con 10 µL de ácido sulfúrico 1,1 N y se incubaron 5 min a temperatura ambiente. Se añadió 1 mL de agua a cada tubo y se centrifugaron los tubos durante 1 min a 15 000 rpm. Se filtraron 200 µL en una placa HPLC. La placa se analizó en un HPLC de Agilent mediante la utilización de una columna Rezex Fast Fruit RFQ con 8 min de elución. Se prepararon curvas de calibración para los componentes anteriores mediante la utilización de un etanol combustible de Supelco (Sigma Cat. 48468-U). Se determinó la concentración (g/L) de DP1, DP2, DP4+, glicerol, ácido acético, ácido láctico y etanol mediante la utilización del *software* ChemStation. La producción de etanol se convirtió al porcentaje v/v de la mezcla de reacción.

Ensayo de actividad de glucoamilasa pNPG

[0141] Soluciones reactivas: Tampón NaAc (200 mM de tampón de acetato de sodio, pH 4,5); sustrato (50 mM de p-nitrofenil-α-D-glucopiranosida (Sigma N-1377) en tampón NaAc (0,3 g/20 ml)) y solución de interrupción (tampón 800 mM de glicina-NaOH, pH 10). Se colocaron 30 µl de sobrenadante de enzima filtrado en una placa de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos. Se añadieron 50 µl de tampón NaAc y 120 µl de sustrato a cada pocillo y se incubaron durante 30 minutos a 50 ºC (incubador/agitador HT iEMS de Thermolab systems). Se terminó la reacción mediante la adición de 100 µl de solución de interrupción. Se midió la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro microplaca (Molecular Devices Spectramax 384 plus) y se calculó la actividad mediante la utilización de un coeficiente de extinción molar de 0,011 µM/cm.

Ensayo de actividad de amilopectina

[0142] Reactivos: ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) sal de diamonio (Sigma #A1888); Peroxidasa tipo VI de rábano rusticano (Sigma #P8375) preparada como 2500 U/mL solución; glucosa oxidasa (Genencor OxyGO HP L5000); solución de cloruro de calcio (100 mM en agua desionizada); tampón de acetato de sodio (1 M, pH 4,3); agua desionizada que contiene 0,005 % v/v de Tween 80 (polisorbato 80); y amilopectina de fécula de patata (Fluka/Sigma #10118).

[0143] El cóctel reactivo HRP-ABTS (que contiene 63 mg de ABTS, 92 µl de HRP (peroxidasa de rábano rusticano) (2500 U/mL), 107 µl de OxyGO, 230 µl de $CaCl_2$ (100 mM), 1,15 mL de tampón de acetato de sodio, 9,42 mL de agua/Tween) se preparó el mismo día del ensayo, se almacenó refrigerado y se protegió de la luz.

[0144] Sustrato: se preparó una solución de amilopectina al 2 % p/p hasta que la amilopectina mezclada de forma líquida en agua/0,005 % tween hirviera. La solución de sustrato de amilopectina se dejó enfriar a temperatura ambiente antes de su utilización.

[0145] En una cubeta donde se lleva a cabo la reacción, se incubaron 110 µl de cóctel reactivo HRP-ABTS durante 120 segundos a 30 ºC. Se añadieron 5 µl de muestra de enzima diluida, se mezclaron y se incubaron durante 60 segundos. Se añadieron 115 µl de solución de sustrato de amilopectina, se mezclaron y se incubaron durante 60 segundos. Se midió la absorbancia a 405 nm a intervalos de 30 segundos durante 300 segundos.

[0146] En el ensayo de amilopectina, se miden las GAU como la capacidad de la enzima para catalizar la hidrólisis de amilopectina para liberar glucosa. La glucosa liberada se convierte en cantidades estequiométricas de ácido glucónico y peróxido de hidrógeno mediante glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno oxida ABTS (catalizado por HRP) para dar un color verde que se mide espectrofotométricamente a 405 nm. La cantidad de color verde es proporcional a la actividad de la glucoamilasa.

Ensayo de referencia de almidón

[0147] Este ensayo se basa en una hidrólisis de 60 minutos de un sustrato de almidón soluble (fécula de patata) a un pH de 4,2 a 60 ºC. Los azúcares reductores resultantes se determinan mediante el método de Luff-Schoorl y se calculan como glucosa. El método de Luff-Schoorl es un método de reducción de cobre mediante el empleo de la solución de Fehling. La reducción de cobre se determina de forma indirecta mediante valoración yodométrica de la sal de cobre no reducida restante después de la oxidación de azúcar. Una unidad de glucoamilasa (GAU, por sus siglas en inglés) es la cantidad de enzima que es capaz de liberar un gramo de azúcar reductor como glucosa por hora en las condiciones del ensayo.

Determinación de unidades de actividad de glucoamilasa (GAU)

[0148] Las unidades de actividad de glucoamilasa (GAU) se determinaron a partir de la capacidad de una enzima glucoamilasa para catalizar la hidrólisis de *p*-nitrofenil-alfa-D-glucopiranosida (pNPG) a glucosa y p-nitrofenol. Con un pH alcalino, el *p*-nitrofenol forma un color amarillo que se mide espectrofotométricamente a 405 nm. La cantidad de *p*-nitrofenol liberado se relaciona con la actividad de glucoamilasa.

Determinación de la concentración de proteínas

[0149] La concentración de proteínas en una muestra se determinó mediante la utilización de reactivo colorante Bradford QuickStart™ (Bio-Rad, California, EE. UU.). Por ejemplo, una muestra de 10 µL de las enzimas se combinó con 200 µL de reactivo colorante Bradford QuickStart™. Tras una mezcla concienzuda, se incubó la mezcla de reacción durante al menos 10 minutos a temperatura ambiente. Se extrajeron las burbujas de aire y se midió la densidad óptica (DO) a 595 nm. A continuación, se calculó la concentración de proteínas mediante la utilización de una curva patrón generada a partir de cantidades conocidas de albúmina de suero bovino.

Determinación de la concentración de glucosa

[0150] Se determinó la concentración de glucosa en una mezcla de reacción de sacarificación con el ensayo de ABTS. Se colocaron las muestras o patrones de glucosa en 5 µL en pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (MTP, por sus siglas en inglés). Las reacciones se iniciaron con la adición de 95 µL del reactivo con 2,74 mg/ml de ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) sal de diamonio (ABTS) (Sigma P1888), 0,1 U/ml de peroxidasa de rábano rusticano de tipo VI (Sigma P8375) y 1 U/ml de glucosa oxidasa (Sigma G7141). La $DO_{405\ nm}$ se monitorizó de inmediato a un intervalo de 9 segundos durante 300 segundos mediante la utilización de un espectrofotómetro microplaca (Molecular Devices Spectramax). Puesto que la velocidad del aumento de la DO_{405nm} es proporcional a la concentración de glucosa, la concentración de glucosa de la muestra se determinó mediante la comparación con el patrón de glucosa y se estableció como mg/ml.

EJEMPLOS

[0151] Los siguientes ejemplos se proporcionan con el objetivo de demostrar e ilustrar en mayor profundidad determinados modos de realización y aspectos representativos de la presente exposición y no han de interpretarse como limitativos del alcance de esta.

Ejemplo 1: Efecto de la oxidación en TrGA y la variante CS4

[0152] Según estudios de estabilidad de formulación, las mezclas de producto de TrGA pierden un 15-20 % de actividad de glucoamilasa después de 1 mes de almacenamiento a 37 ºC (datos no mostrados). Al mismo tiempo, se observó un descenso considerable de la actividad de pNPG (~50 %) en muestras mantenidas a 4 ºC durante varios meses (datos no mostrados). También se observó una pérdida de actividad similar en las mezclas enzimáticas con la variante de TrGA CS4 (variante de TrGA con L417V, T430A, Q511H, A539R y N563I de SEQ ID NO: 2). El mecanismo de pérdida de actividad en estas muestras no estaba claro. Entre diversas hipótesis plausibles, se investigó la oxidación de proteínas como mecanismo de pérdida de actividad. Con este objetivo, se utilizó un tratamiento de enzima purificada con peróxido de hidrógeno para caracterizar las consecuencias funcionales y estructurales de la oxidación de aminoácidos tras la actividad enzimática. En estudios anteriores sobre la serina proteasa subtilisina, se ha utilizado con éxito un enfoque similar. Véase Estell *et al.*, (1985) J. Biol. Chem. 260: 6518-6521; véase también Bott *et al.*, (1988) J. Biol. Chem. 263: 7895-7906.

[0153] Se llevaron a cabo experimentos para determinar (1) si el tratamiento con peróxido de hidrógeno es el responsable de la pérdida de actividad de pNPG y de la actividad de la amilopectina para TrGA (tipo salvaje) y la variante CS4, así como (2) si esta pérdida de actividad se debe a un deterioro de las proteínas o a un cambio de la actividad específica debido a la oxidación.

[0154] Materiales: CS4 48 purificada (+/- 5) mg/mL; TrGA 44 de tipo salvaje purificada (+/- 6) mg/mL; acetato de sodio 0,1 M a pH 4,3; peróxido de hidrógeno al 50 %; catalasa Oxy-Gone (para inactivar el peróxido de hidrógeno); y columnas de cromatografía desechables Econo-pac 10 DG (BioRad).

Procedimiento:

[0155]
1) Diluir catalasa Oxy-Gone 10 veces con agua destilada;
2) Diluir cada cada muestra de enzima 1:10 con acetato de sodio 0,1 M, pH 4,3;

0,6 mL de TrGA purificada en 5,4 mL de acetato de sodio 0,1 M, pH 4,3
0,6 mL de CS4 purificada en 5,4 mL de acetato de sodio 0,1 M, pH 4,3

3) dividir lo anterior en 2 fracciones y añadir peróxido de hidrógeno a una fracción y agua a la otra;

Por 3 mL de fracción	90 µl de peróxido de hidrógeno al 50 % (concentración final de 0,5 M)
Por 3 mL de fracción	90 µl de agua MilliQ (control)

4) Incubar estas 4 mezclas a temperatura ambiente y tomar alícuotas de 90 µl en diferentes momentos;
5) En cada momento (los tiempos pueden variar), añadir 10 µl de catalasa diluida a 90 µl de la mezcla a las muestras que contienen peróxido de hidrógeno o añadir 10 µl de agua MilliQ a las muestras control
6) Diluir las muestras de enzima en una placa de dilución no vinculante (Corning® 3605 de poliestireno blanca de fondo redondo);

Fila A: 80 µl de muestra de enzima
Filas B-D: diluciones 1:2 en serie mediante la utilización de acetato de sodio 0,1 M, pH 4,3
Incluir 2 blancos de agua y controles de catalasa

7) Transferir las muestras diluidas a una placa de ensayo y determinar la actividad enzimática residual con el ensayo de placa de pNPG;
8) Después de que las muestras oxidadas hayan perdido un 70-80 % de su actividad, continuar con las etapas 9-15 para eliminar el peróxido de hidrógeno del material restante para realizar más ensayos;
9) Obtener una columna de cromatografía Econo-pac;
10) Equilibrar la columna con 20 mL de tampón de acetato de sodio 0,1 M, pH 4,3;
11) Dejar que el tampón se desplace hasta el gel;
12) Añadir 3 mL de mezcla de muestra;
13) Dejar que la muestra se desplace hasta el gel;
14) Añadir 3 mL de tampón de pH 4,3; y
15) Recoger todos los 3 mL de muestra en un tubo marcado. Como se muestra en la figura 2, el tratamiento de TrGA (WT) y la variante CS4 con peróxido de hidrógeno 0,5 M a temperatura ambiente durante 7 horas dio lugar a un descenso de entre un 70 % y un 80 % de la actividad de pNPG. Sin embargo, las formas oxidadas de TrGA y la variante CS4 mostraron distintos cambios de actividad al utilizar amilopectina (AP) como sustrato. Como se indica en la tabla 1 a continuación, la TrGA tratada con peróxido de hidrógeno retuvo toda su actividad, mientras que la CS4 tratada con peróxido de hidrógeno perdió aproximadamente el 22 % de su actividad.

Tabla 1. Comparación de pérdida de actividad entre TrGA y CS4 mediante la utilización de diversos sustratos.

Muestra	Actividad de pNPG (7 horas) GAU/g	% de actividad de pNPG (7 horas)	Actividad de AP (7 horas) GAU/g	% de actividad de AP (7 horas)
TrGA + agua	14	100 %	49,2	100 %
TrGA + H_2O_2 0,5 M	3,66	26 %	51,2	104 %
CS4 + agua	8,46	100 %	80,55	100 %
CS4 + H_2O_2 0,5 M	1,85	22 %	62,85	78 %

Los datos también se muestran en la figura 3, en la que se muestra una reducción de la actividad de referencia de almidón (mediante la utilización de fécula de patata como sustrato) de aproximadamente un 20-30 %, tanto para la TrGA como para la CS4 tratadas con peróxido de hidrógeno.

[0156] El análisis de gel SDS-PAGE (figura 4) muestra que las glucoamilasas tratadas con peróxido de hidrógeno (tanto TrGA como CS4) permanecieron intactas, con o sin la presencia de Endoglicosidasa H (Endo H). A partir de estos resultados, parece ser que un cambio en la actividad específica de la glucoamilasa, en lugar de la degradación de proteínas, puede ser el responsable de la pérdida de actividad relacionada con la oxidación observada.

Ejemplo 2: mapeo de oxidación de proteínas basado en MS

[0157] Para caracterizar todavía más la pérdida de actividad observada debido al tratamiento con peróxido de hidrógeno, especialmente el perfil distinto de CS4, se llevó a cabo un análisis de espectometría de masas (MS, por sus siglas en inglés). Todas las muestras de glucoamilasa se precipitaron con TCA al 10 % seguido de la reacción de reducción con 20 mM de DTT a 50 ºC durante 15-20 min. La reacción de alquilación también se llevó a cabo con 55 mM de iodoacetamida (IAA). La reacción de alquilación se llevó a cabo en la oscuridad durante 45 min a temperatura ambiente. La digestión proteolítica se llevó a cabo mediante incubación con la proteasa Asp-N en 25 mM de bicarbonato de amonio durante la noche a 37 °C (la ratio de Asp-N en relación con TrGA o CS4 se ajustó a 1:20 en peso). Todas las digestiones de proteínas se analizaron mediante MALDI-TOF/MS y LC-MS/MS para el estudio de MRM.

[0158] Para el análisis MALDI-TOF/MS, se prepararon las muestras desalinizadas mediante la cristalización conjunta de volúmenes iguales (1 µL) de la muestra con CHCA (ácido α-ciano-4-hidroxicinámico, saturado en acetonitrilo al 70 % con ácido fórmico al 0,1 %) mediante la utilización del método de gota seca. Se obtuvieron espectros de masas de péptidos mediante la utilización de un espectrómetro de masas Voyager DE-STR MALDI-TOF (Applied Biosystems, Foster City, California, EE. UU.). La configuración instrumental para el rango 700-2500 m/z era la siguiente: modo de funcionamiento reflector, modo de extracción retrasado, polaridad positiva, tensión de aceleración de 20 kV, tensión de rejilla de un 68 % y tiempo de demora de extracción de 175 nanosegundos. Para cada espectro, se tomaron 300 disparos de láser y se utilizó la mezcla de calibración 1 (Sigma, Saint Louis, Misuri) como calibrador externo.

[0159] Para el análisis MRM/MS, se analizaron todas las muestras digeridas mediante ESI LC/MS/MS en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo/trampa de iones (TSQ Quantum Access, Thermo Scientific). La muestra digerida se ejecutó, en primer lugar, mediante LC-MS/MS (modo dependiente de datos) con el fin de determinar y seleccionar los péptidos dirigidos sin oxidar y oxidados) para el estudio de MRM posterior. Además, se utilizó el *software* para flujos de trabajo MRM (*software* Pinpoint™, Thermo Scientific) para predecir los péptidos candidatos y elegir diversos iones de fragmento para el diseño de ensayo de MRM, para construir un método de instrumento y un archivo de secuencia, así como para el procesamiento de datos cuantitativo. Se alcanzó la detección de alta confianza de los péptidos dirigidos mediante la utilización del alineamiento del tiempo de diversos iones de fragmento específicos (b o y) de cada péptido. El instrumento se configuró para circular a través de cada conjunto de transición de MRM (normalmente 3 iones de fragmento primarios/péptido dirigido) en un método determinado, para un tiempo de ciclo total de 60 ms.

[0160] El método de MRM se configuró de la manera siguiente:

Q1: 0,7 AAM

Q3: 0,7 AAM

Presión del gas de colisión: 1,2 mTorr

Energía de colisión: 35-45 V

Tiempos de permanencia: 20 ms

[0161] La HPLC para el TSQ Quantum Access se configuró de la manera siguiente:

Bomba: Bomba MS Thermo Scientific Surveyor™ con muestreador automático

Columna: Vydac RP-C18 (2,1 mm × 150 mm)

Caudal: 200 µL/min

Tampón A: FA al 0,1 % en agua DI

Tampón B: FA al 0,1% en acetonitrilo

Gradiente: B al 0 % hasta B al 70 % en 50 min

Inyección de muestra: 20 µL

[0162] En las figuras 5A y 5B, se muestra el análisis MALDI-TOF/MS (rango de masas de 1001-2000 Dalton) en la digestión en solución (Asp-N) tanto para TrGA como para CS4, con o sin tratamiento con peróxido de hidrógeno. La metionina 50 (M 50) se identificó como el único sitio de oxidación de proteínas en la trGA y CS4 tratadas con peróxido de hidrógeno (datos no mostrados para otros rangos de masas). El tratamiento mediante peróxido de hidrógeno 0,5 M dio lugar a una oxidación del 100 % para M50 tanto en TrGA como en CS4. Otros dos péptidos (picos 1/3 y 2/4, como indican las flechas en las figuras 5A-B) se confirmaron como las formas carboxiladas y carbamidometiladas del mismo péptido de TrGA (46-53) (datos no mostrados). Probablemente, estas modificaciones peptídicas fueron provocadas por la cantidad excesiva de iodoacetamida (IAA) utilizada en la reducción de proteínas y reacciones de alquilación antes de la digestión proteolítica.

Ejemplo 3: Caracterización del rendimiento de la aplicación para la oxidación de M50

[0163] El efecto de la oxidación de M50 tanto en TrGA como en CS4 se caracterizó además en los procesos de SFS. La SFS se llevó a cabo de la siguiente manera:

1) Incubar el producto de licuefacción a 70 ºC hasta la completa descongelación, normalmente 4-5 horas;
2) Pesar la cantidad adecuada de producto de licuefacción y añadir urea sólida a 600 ppm;
3) Ajustar el pH del producto de licuefacción a 4,8 mediante la utilización de ácido sulfúrico 6 N y/o hidróxido amónico al 28 %;
4) Añadir 0,1 % p/p de levadura seca al lote de producto de licuefacción;
5) Añadir una cantidad adecuada (índice de actividad 1:6 GA:AA) de AkAA al lote de producto de licuefacción;
6) Mezclar bien con un batidor;
7) Pesar 100 g +/- 0,2 g de producto de licuefacción en matraces de Erlenmeyer de 125 ml marcadas individualmente en réplicas de dos;
8) Añadir una cantidad adecuada de glucoamilasa a un matraz adecuado;
9) Añadir una barra agitadora y un anillo de peso rojo a cada matraz y cubrir con papel de aluminio;
10) Incubar en el baño de agua con mezcla a 320 rpm durante 55 horas a 32 °C;
11) Se toman muestras puntuales de ~1 ml a aproximadamente t=0, 6, 18, 25, 43 y 55 horas y se almacenan congeladas;
12) Cada conjunto de muestra puntual se descongela a 4 °C y se centrifuga durante 2 minutos a 15 000 rpm;
13) En tubos de microcentrifugación marcados individualmente, mezclar 100 µl de muestra de sobrenadante con 10 µl de ácido sulfúrico 1,1 N e incubar 5 minutos a temperatura ambiente;
14) Añadir 1 ml de agua a cada tubo y centrifugar durante 1 minuto a 15 000 rpm;
15) Se cargan 200 µl de cada muestra en tubos HPLC y se analizan en la HPLC mediante la utilización de una columna Aminex HPX-87H;
16) Se determina la concentración (% p/v) de DP1, DP2, DP3+, glicerol, ácido acético, ácido láctico y etanol mediante la utilización del *software* Waters Empower; y

17) Se preparan curvas de calibración para los componentes anteriores mediante la utilización de un patrón de etanol combustible de Supelco (Sigma Cat# 48468-U).

[0164] Para un producto de licuefacción de 35 % de materia seca, se dosificó TrGA de tipo salvaje a 0,325 GAU/g ms (1 × dosis), se dosificó CS4 a 0,016 mg/g de producto de licuefacción o 0,045 mg/g ms (0,7 × dosis) y se dosificó AkAA a 1,95 SSU/G ms. En los experimentos de SFS anteriores, se utilizó TrGA o CS4 con un 0 % de oxidación, un 50 % de oxidación (mediante mezcla de cantidades iguales de la enzima con un 0 % y un 100 % de oxidación) y un 100 % de oxidación. Las concentraciones de DP3+ se midieron a través del volumen nulo, cuya reducción se interpreta normalmente como reflejo del rendimiento de la sacarificación del producto de licuefacción. Los datos se presentan en las figuras 6A y 6B.

[0165] En combinación con los resultados que se muestran en el ejemplo 1, se observó que las propiedades funcionales de la TrGA oxidada y la CS4 oxidada eran considerablemente diferentes. La hidrólisis de pNPG y la actividad en el ensayo de referencia de almidón disminuyeron tras la oxidación de M50 para ambas enzimas (la actividad de pNPG disminuyó mucho más). La TrGA oxidada retuvo la actividad completa en la amilopectina, mientras que la oxidación de CS4 dio lugar a una disminución mensurable de la actividad en la amilopectina. El efecto de la oxidación en el rendimiento de SFS también fue bastante diferente en las dos enzimas. La producción del etanol, el índice inicial de DP1 y las concentraciones finales de DP2 y DP3+ fueron similares para la TrGA nativa y oxidada (figura 6A). Por el contrario, la CS4 mostró pérdidas significativas en la producción de etanol y concentraciones diana menores para el índice inicial de DP1, el DP2 final y el DP3+ final después de la oxidación (figura 6B). Según la estructura cristalina de TrGA determinada, M50 y dos de las cinco sustituciones en CS4, L417V y A539R se encuentran, probablemente, cerca del sitio activo de la enzima. La oxidación puede desestabilizar la unión de sustrato, el estado de transición o ambos. Sin embargo, sigue sin conocerse el motivo por el que el efecto de la oxidación en el rendimiento de SFS es diferente para TrGA y CS4.

Ejemplo 4: Construcción y caracterización de variantes CS4 M50

[0166] A partir de los ejemplos anteriores, parece que los productos comerciales que contienen CS4 son susceptibles a la pérdida del rendimiento de SFS debido a la oxidación. Mediante la supervisión cuidadosa de la actividad de pNPG del producto se puede, posiblemente, identificar los lotes de producción que tienen una posible oxidación. De forma alternativa, la oxidación puede supervisarse mediante espectrometría de masas. La sustitución de M50 por un aminoácido no oxidable, sin embargo, podría constituir una solución a largo plazo a este problema.

[0167] Una búsqueda BLAST de la base de datos de proteínas del NCBI mediante la utilización de la secuencia de TrGA indicó que (1) M50 no se conserva completamente y que (2) la treonina y la histidina se encuentran en este sitio en secuencias homólogas (datos no mostrados). Se llevó a cabo un cribado de genoteca de evaluación del sitio de las diecinueve sustituciones para evaluar las variantes de TrGA que son resistentes a la pérdida de actividad relacionada con la oxidación y que mantienen al mismo tiempo las ventajas del aumento de la eficacia de rendimiento mostradas por CS4. Tras un cribado preliminar (datos no mostrados), las variantes en las que se sustituye M50 en CS4 por glicina (G), fenilalanina (F), lisina (K) o tirosina (Y) se sometieron a una caracterización adicional con respecto a la pérdida de actividad relacionada con la oxidación. Como se muestra en la tabla 2, las variantes que portan la sustitución M50G, M50Y o M50F, tras un tratamiento con peróxido de hidrógeno, mantuvieron la actividad de pNPG durante 285 minutos, y mostraron solamente una pérdida de actividad máxima de aproximadamente un 10-11 %. Cuando se incubaron en agua, estas variantes mostraron una pérdida de actividad máxima de aproximadamente un 6-7 %.

Tabla 2. Caracterización de la actividad de pNPG de las variantes M50 CS4

	Tiempo (minutos)				
% de actividad	**0**	**65**	**155**	**225**	**285**
Tratadas con peróxido de hidrógeno 0,5 M					
M50G	100 %	116 %	103 %	100 %	96 %
M50Y	100 %	104 %	95 %	90 %	89 %
M50F	100 %	105 %	111 %	90 %	90 %
Control (en agua)					
M50G	100 %	99 %	95 %	94 %	93 %

Control (en agua)					
M50Y	100 %	100 %	98 %	106 %	94 %
M50F	100 %	103 %	100 %	99 %	97 %

[0168] Después de la evaluación de la sensibilidad a la oxidación, se sometió a estas variantes a una evaluación de rendimiento en el proceso SFS llevado a cabo de la manera siguiente:

1) Incubar el producto de licuefacción congelado a 4 ºC durante la noche; a continuación, incubar a 60 ºC durante 2 horas seguido de incubación a 32 ºC durante 30 minutos;
2) Pesar el producto de licuefacción de maíz y añadir urea a una concentración final de 600 ppm;
3) Ajustar el pH del producto de licuefacción a 4,8 mediante la utilización de ácido sulfúrico 6 N y/o hidróxido amónico al 28 %;
4) Añadir 0,1 % p/p de levadura seca activa al lote de producto de licuefacción;
5) Mezclar bien con un agitador superior durante 30 minutos a temperatura ambiente;
6) Pesar 100 g +/- 0,2 g de producto de licuefacción en matraces de Erlenmeyer de 125 ml marcadas individualmente en réplicas de dos;
7) Añadir volumen adecuado de glucoamilasa a cada matraz (la glucoamilasa de dosifica como fracción de la dosis de TrGA a 0,325 GAU/g de materia seca; la CS4 o la variante adicional se dosifica a 0,7 × de la dosis de proteína de tipo salvaje, aproximadamente 0,015 mg de proteínas / g de producto de licuefacción);
8) Añadir volumen adecuado de AkAA a cada matraz (la AkAA se dosifica como fracción de la actividad de AkAA a 1,95 SSU/g de materia seca);
9) Mezclar y detener cada matraz con un tapón de espuma;
10) Incubar en una incubadora vertical a 32 ºC con mezcla a 200 rpm durante 55 horas; y
11) Se recogen muestras puntuales de aproximadamente 1 ml a t=0, 4, 12, 16, 24, 30, 40, 44 y 55 horas en las fermentaciones; las muestras se almacenan congeladas y se someten a análisis, como se indica anteriormente.

[0169] En la tabla 3, se muestran las producciones de etanol para cada una de las 4 variantes. Si bien las variantes M50G y M50F produjeron concentraciones de etanol al final de la fermentación equivalentes a las concentraciones producidas en presencia de CS4, sus índices de producción de etanol fueron considerablemente más lentos que los de CS4, con una producción de etanol hasta un 14 % más lenta que CS4 en las primeras 18 horas de fermentación. Tanto la variante M50Y como la M50K mostraron índices de producción de etanol equivalentes a CS4. Sin embargo, la variante M50K oxidada produjo un 7 % menos de etanol al final de la fermentación.

Tabla 3. Producción de etanol en SFS para diversas variantes CS4 M50.

Muestra	**Índice inicial de etanol (% p/v/hora)**	**Control**	**IR**	**% de diferencia**	**Producción final de etanol (%)**	**Control**	**IR**	**% de diferencia**
Lote de producto de licuefacción #1								
CS4	0,65	0,65	1,00	0 %	14,84	14,84	1,00	0 %
M50G	0,56	0,65	0,86	-14 %	15,48	14,84	1,04	4 %
M50F	0,57	0,65	0,87	-13 %	14,46	14,84	0,97	-3 %
M50Y	0,68	0,65	1,05	5 %	14,79	14,84	1,00	0 %
Lote de producto de licuefacción #2								
CS4	0,21	0,21	1,00	0 %	14,03	14,03	1,00	0 %
M50K oxidada	0,20	0,21	0,96	-4 %	13,00	14,03	0,93	-7 %
M50K sin oxidar	0,21	0,21	0,97	-3 %	14,08	14,03	1,00	0 %

[0170] La hidrólisis de DP4+ también se evaluó en SFS para cada una de las variantes M50 (tabla 4). Las concentraciones de DP4+ se midieron a través del volumen nulo, cuya reducción se interpreta normalmente como reflejo del rendimiento de la sacarificación del producto de licuefacción. Tal como se observa en la

producción de etanol, las variantes M50G y M50F hidrolizaron mucho más lentamente el DP4+ con producciones sistemáticamente superiores a lo largo de la fermentación que CS4. La variante M50G también tuvo una producción mucho mayor de DP4+ al final de la fermentación que cualquiera de las otras variantes, con un mantenimiento de un 66 % más de DP4+ que CS4. Por el contrario, tanto M50Y como M50K mostraron una hidrólisis equivalente o mejorada de DP4+ en comparación con CS4.

Tabla 4. Hidrólisis de DP4+ durante SFS para diversas variantes CS4 M50

Muestra	**Índice inicial de DP4+ (% p/v/hora)**	**Control**	**IR**	**% de diferencia**	**DP4+ final (% p/v)**	**Control**	**IR**	**% de diferencia**
Lote de producto de licuefacción #1								
CS4	5,35	5,35	1,00	0 %	1,76	1,76	1,00	0 %
M50G	4,89	5,35	0,91	-9 %	2,92	1,76	1,66	66 %
M50F	5,32	5,35	0,99	-1 %	1,89	1,76	1,08	8 %
M50Y	5,46	5,35	1,02	2 %	1,90	1,76	1,08	8 %
Lote de producto de licuefacción #2								
CS4	3,26	3,26	1,00	0 %	1,95	1,95	1,00	0 %
M50K oxidada	3,24	3,26	0,99	-1 %	2,31	1,95	1,19	19 %
M50K sin oxidar	3,27	3,26	1,00	0 %	2,09	1,95	1,07	7 %

[0171] Dados los datos anteriores, la variante CS4 M50Y mostró un rendimiento equivalente a CS4 tanto en las producciones de etanol y en la hidrólisis de DP4+, así como una sensibilidad a la oxidación mínima. Si bien la variante M50K también mostró un rendimiento equivalente a CS4 en su estado nativo, M50K oxidado mostró una producción de etanol considerablemente reducida, así como una hidrólisis de DP4+ menos eficiente. En consecuencia, se seleccionó la variante CS4 M50Y para una evaluación adicional mediante la utilización del lote de producto de licuefacción #2. En la tabla 5, se resumen los resultados.

Tabla 5. Evaluación de rendimiento SFS para la variante CS4 M50.

Muestra	**Índice inicial de etanol (% p/v/hora)**	**Control**	**IR**	**% de diferencia**	**Producción final de etanol (%)**	**Control**	**IR**	**% de diferencia**
CS4	0,90	0,90	1,00	0 %	16,08	16,08	1,00	0 %
M50Y	0,78	0,90	0,87	-13 %	16,01	16,08	1,00	0 %
Muestra	**Índice inicial de DP4+ (% p/v/hora)**	**Control**	**IR**	**% de diferencia**	**DP4+ final (% p/v)**	**Control**	**IR**	**% de diferencia**
CS4	1,21	1,21	1,00	0 %	0,82	0,82	1,00	0 %
M50Y	1,30	1,21	1,07	7 %	1,23	0,82	1,50	50 %

Como se muestra en la tabla 5, la variante CS4 M50Y mostró un rendimiento equivalente a CS4 tanto para la producción de etanol como para la hidrólisis de DP4+. Si bien la variante M50Y produjo un 50 % de DP4+ al final de la fermentación, el valor obtenido de 1,23 % p/v se situó muy por debajo de las producciones de DP4+ finales de la variante CS4 M50G o de la variante CS4 M50K oxidada. En consecuencia, la variante CS4 M50Y que posee la SEQ ID NO: 6 de aminoácido puede ser útil para sustituir TrGA y CS4 en productos comerciales para obtener una vida útil mayor, por ejemplo.

LISTA DE SECUENCIAS

[0172]

SEQ ID NO: 1 (TrGA completa, con péptido señal y prosecuencia)

MHVLSTAVLLGSVAVQKVLGRPGSSGLSDVTKRSVDDFISTETPIALNNLLCNVGPDGCRAF
GTSAGAVIASPSTIDPDYYYMWTRDSALVFKNLIDRFTETYDAGLQRRIEQYITAQVTLQGL
SNPSGSLADGSGLGEPKFELTLKPFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQSTVSN
VIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDLWEEVNGSSFFTVANQHRALVEGATLAATLGQSGSAYSS
VAPQVLCFLQRFWVSSGGYVDSNINTNEGRTGKDVNSVLTSIHTFDPNLGCDAGTFQPCSDK
ALSNLKVVVDSFRSIYGVNKGIPAGAAVAIGRYAEDVYYNGNPWYLATFAAAEQLYDAIYVW
KKTGSITVTATSLAFFQELVPGVTAGTYSSSSSTFTNIINAVSTYADGFLSEAAKYVPADGS
LAEQFDRNSGTPLSALHLTWSYASFLTATARRAGIVPPSWANSSASTIPSTCSGASVVGSYS
RPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPYTPLPCATPTSVAVTFHELVSTQFGQTVKVAGNAAALGNW
STSAAVALDAVNYADNHPLWIGTVNLEAGDVVEYKYINVGQDGSVTWESDPNHTYTVPAVAC
VTQVVKEDTWQS

SEQ ID NO: 2 (TrGA madura, sin péptido señal y prosecuencia)

SVDDFISTETPIALNNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVIASPSTIDPDYYYMWTRDSALVFKNL
IDRFTETYDAGLQRRIEQYITAQVTLQGLSNPSGSLADGSGLGEPKFELTLKPFTGNWGRPQ
RDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQSTVSNVIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDLWEEVNGSSF
FTVANQHRALVEGATLAATLGQSGSAYSSVAPQVLCFLQRFWVSSGGYVDSNINTNEGRTGK
DVNSVLTSIHTFDPNLGCDAGTFQPCSDKALSNLKVVVDSFRSIYGVNKGIPAGAAVAIGRY
AEDVYYNGNPWYLATFAAAEQLYDAIYVWKKTGSITVTATSLAFFQELVPGVTAGTYSSSSS
TFTNIINAVSTYADGFLSEAAKYVPADGSLAEQFDRNSGTPLSALHLTWSYASFLTATARRA
GIVPPSWANSSASTIPSTCSGASVVGSYSRPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPYTPLPCATPTS
VAVTFHELVSTQFGQTVKVAGNAAALGNWSTSAAVALDAVNYADNHPLWIGTVNLEAGDVVE
YKYINVGQDGSVTWESDPNHTYTVPAVACVTQVVKEDTWQS

SEQ ID NO: 3 (péptido señal de TrGA de tipo salvaje)

MHVLSTAVLLGSVAVQKVLG

SEQ ID NO: 4 (ADNc de TrGA de tipo salvaje)

```
atgcacgtcc tgtcgactgc ggtgctgctc ggctccgttg ccgttcaaaa ggtcctggga      60
agaccaggat caagcggtct gtccgacgtc accaagaggt ctgttgacga cttcatcagc     120
accgagacgc ctattgcact gaacaatctt ctttgcaatg ttggtcctga tggatgccgt     180
gcattcggca catcagctgg tgcggtgatt gcatctccca gcacaattga cccggactac     240
tattacatgt ggacgcgaga tagcgctctt gtcttcaaga acctcatcga ccgcttcacc     300
gaaacgtacg atgcgggcct gcagcgccgc atcgagcagt acattactgc ccaggtcact     360
ctccagggcc tctctaaccc ctcgggctcc ctcgcggacg gctctggtct cggcgagccc     420
aagtttgagt tgaccctgaa gcctttcacc ggcaactggg gtcgaccgca gcgggatggc     480
ccagctctgc gagccattgc cttgattgga tactcaaagt ggctcatcaa caacaactat     540
cagtcgactg tgtccaacgt catctggcct attgtgcgca acgacctcaa ctatgttgcc     600
cagtactgga accaaaccgg ctttgacctc tgggaagaag tcaatgggag ctcattcttt     660
actgttgcca accagcaccg agcacttgtc gagggcgcca ctcttgctgc cactcttggc     720
cagtcgggaa gcgcttattc atctgttgct ccccaggttt tgtgctttct ccaacgattc     780
tgggtgtcgt ctggtggata cgtcgactcc aacatcaaca ccaacgaggg caggactggc     840
aaggatgtca actccgtcct gacttccatc cacaccttcg atcccaacct tggctgtgac     900
gcaggcacct tccagccatg cagtgacaaa gcgctctcca acctcaaggt tgttgtcgac     960
tccttccgct ccatctacgg cgtgaacaag ggcattcctg ccggtgctgc cgtcgccatt    1020
ggccggtatg cagaggatgt gtactacaac ggcaaccctt ggtatcttgc tacatttgct    1080
gctgccgagc agctgtacga tgccatctac gtctggaaga agacgggctc catcacggtg    1140
accgccacct ccctggcctt cttccaggag cttgttcctg gcgtgacggc cgggacctac    1200
```

```
tccagcagct cttcgacctt taccaacatc atcaacgccg tctcgacata cgccgatggc    1260
ttcctcagcg aggctgccaa gtacgtcccc gccgacggtt cgctggccga gcagtttgac    1320
cgcaacagcg gcactccgct gtctgcgctt cacctgacgt ggtcgtacgc ctcgttcttg    1380
acagccacgg cccgtcgggc tggcatcgtg ccccccctcgt gggccaacag cagcgctagc    1440
acgatcccct cgacgtgctc cggcgcgtcc gtggtcggat cctactcgcg tcccaccgcc    1500
acgtcattcc ctccgtcgca gacgcccaag cctggcgtgc cttccggtac tccctacacg    1560
cccctgccct gcgcgacccc aacctccgtg gccgtcacct tccacgagct cgtgtcgaca    1620
cagtttggcc agacggtcaa ggtggcgggc aacgccgcgg ccctgggcaa ctggagcacg    1680
agcgccgccg tggctctgga cgccgtcaac tatgccgata accacccccct gtggattggg    1740
acggtcaacc tcgaggctgg agacgtcgtg gagtacaagt acatcaatgt gggccaagat    1800
ggctccgtga cctgggagag tgatcccaac cacacttaca cggttcctgc ggtggcttgt    1860
gtgacgcagg ttgtcaagga ggacacctgg cagtcgtaa                           1899
```

SEQ ID NO: 5 (variante CS4 de TrGA madura)

SVDDFISTETPIALNNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVIASPSTIDPDYYYMWTRDSALVFKNL
IDRFTETYDAGLQRRIEQYITAQVTLQGLSNPSGSLADGSGLGEPKFELTLKPFTGNWGRPQ
RDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQSTVSNVIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDLWEEVNGSSF
FTVANQHRALVEGATLAATLGQSGSAYSSVAPQVLCFLQRFWVSSGGYVDSNINTNEGRTGK
DVNSVLTSIHTFDPNLGCDAGTFQPCSDKALSNLKVVVDSFRSIYGVNKGIPAGAAVAIGRY
AEDVYYNGNPWYLATFAAAEQLYDAIYVWKKTGSITVTATSLAFFQELVPGVTAGTYSSSSS
TFTNIINAVSTYADGFLSEAAKYVPADGSLAEQFDRNSGTPLSA**V**HLTWSYASFLTA**A**ARRA
GIVPPSWANSSASTIPSTCSGASVVGSYSRPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPYTPLPCATPTS
VAVTFHELVSTQFG**H**TVKVAGNAAALGNWSTSAAVALDAVNY**R**DNHPLWIGTVNLEAGDVVE
YKYI**I**VGQDGSVTWESDPNHTYTVPAVACVTQVVKEDTWQS

SEQ ID NO: 6 (variante CS4 con M50Y de TrGA madura)

SVDDFISTETPIALNNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVIASPSTIDPDYYY**Y**WTRDSALVFKNL
IDRFTETYDAGLQRRIEQYITAQVTLQGLSNPSGSLADGSGLGEPKFELTLKPFTGNWGRPQ
RDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQSTVSNVIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDLWEEVNGSSF
FTVANQHRALVEGATLAATLGQSGSAYSSVAPQVLCFLQRFWVSSGGYVDSNINTNEGRTGK
DVNSVLTSIHTFDPNLGCDAGTFQPCSDKALSNLKVVVDSFRSIYGVNKGIPAGAAVAIGRY
AEDVYYNGNPWYLATFAAAEQLYDAIYVWKKTGSITVTATSLAFFQELVPGVTAGTYSSSSS
TFTNIINAVSTYADGFLSEAAKYVPADGSLAEQFDRNSGTPLSA**V**HLTWSYASFLTA**A**ARRA
GIVPPSWANSSASTIPSTCSGASVVGSYSRPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPYTPLPCATPTS
VAVTFHELVSTQFG**H**TVKVAGNAAALGNWSTSAAVALDAVNY**R**DNHPLWIGTVNLEAGDVVE
YKYI**I**VGQDGSVTWESDPNHTYTVPAVACVTQVVKEDTWQS

SEQ ID NO: 7 (GA completa de *Hypocrea citrine* var. *americana*; SQN6 del documento US7413879)

MHVLSTAVLLGLVAVQKVLGRPGLNGVPDVTKRSVDDFISNESPIALNNLLCNVGPDGCRAFGASAGTVA
ASPSTTDPDYYYMWTRDSALIFKTVVDRFTQNYDASLQKRIEQYIAAQATLQGISNPSGSLADGSGLGEP
KFELTLNQFTGHWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLIDNNYQSTVSDIIWPILRNDLNYVAQYWNQTGFDL
WEEVEGSSFFTVANQHRALVEGATLAAILGQSGSSYSAVAPQILCFLQKFWVSSGGYVNSNINSDINRTG
KDANSLLASIHTFDPSIGCDPATFQPCSDKALSNLKSVVDSFRSIYGVNQGISAGSAVAIGRYSEDVYFN
GNPWYLATFAAAEQLYDSLYVWKQTGSITVTAIPLAFFQELVPGVAAGTYLSSQSTFTSIVNAVSAYADG
FLNEAAKYVPSDGSLAEQFDKNNGTPLSAVHLTWSYASFLTATARRAGSVPPSWANSNATSIPTACSGTS
VVGSYSSPTATSFPPSQTPKVGKPTGTPFTPIPCATPTSVAVTFHELPTTQFGQTIKLAGSAEALGNWST
GAAVGLDAANYASNHPLWFGTLNLQAGDVIEYKYINVGKDGSVTWESDPNHTYTVPAVACVTEVVKEDTW
QS

SEQ ID NO: 8 (GA completa de *Hypocrea vinosa*; SQN8 del documento US7413879)

MHVLSTAVLLGSVAVQKVLGRPGSNGLSGVTKRSVDDFINTQTPIALNNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVI

ASPSTTDPDYYYMWTRDSALVFKNIVDRFTQQYDAGLQRRIEQYISAQVTLQGISNPSGSLSDGSGLGEP
KFELTLSQFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQSTVSNIIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDL
WEEVNGSSFFTVANQHRALVEGATLAATLGQSGSTYSSVAPQILCFLQRFWVSGGYIDSNINTNEGRTGK
DANSLLASIHTFDPSLGCDASTFQPCSDKALSNLKVVVDSFRSIYGVNKGIPAGSAVAIGRYPEDVYFNG
NPWYLATFAAAEQLYDSVYVWKKTGSITVTSTSSAFFQELVPGVAAGTYSSSQSTFTSIINAISTYADGF
LSEAAKYVPADGSLAEQFDRNTGTPLSAVHLTWSYASFLTAAARRAGVVPPSWASSGANTVPSSCSGASV
VGSYSRPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPFTPIPCATPTSVAVTFHELATTQFGQTIKVAGSAPELGNWSTS
AAIALDAVNYATNHPLWIGSVNLEAGDVIEYKYINVGQDGSVTWESDPNHTYTVPAVACVTEVVKEDTWQ
S

SEQ ID NO: 9 (GA completa de *Trichoderma* sp; SQN10 del documento US7413879)

MHVLSTAVLLGSVAVQKVLGRPGSSGLYDVTKRSVDDFISTETPIALNNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVI
ASPSTTDPDYYYMWTRDSALVFKNLVDRFTEEYDAGLQRRIEQYITAQVTLQGLTNPSGSLSDGSGLGEP
KFELTLQPFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYAKWLINNNYQSTVSSVIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDL
WEEVDGSSFFTVANQHRALVEGATLVATLGQSGDTYSSVAPQVLCFLQRFWVSSGGYIDSNINTNEGRTG
KDANSILTSIHTFDPNLGCDAGTFQPCSDKALSNLKVVVDSFRSIYSLNKGIPAGAAVAIGRYPEDVYFN
GNPWYLATFAAAEQLYDAVYVWKETGSITVTATSLAFFQELVPGVTAGTYSSSSSSTFTTIINAVSTYAD
GFLSEAAKYVPADGSLAEQFDRNNGTALSARHLTWSYASFLTATARRAGVVPPSWANSSASTIPSTCSGA
SVVGSYSRPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPYTPLPCATPTSVAVTFHELVSTQFGQTVKVAGSAQALGNWS
TSAAVALDAVNYADNHPLWIGTVNLEAGDVVEYKYINVGQDGSVTWESDPNHTYTVPAVACVTQVVKEDT
WQS

SEQ ID NO: 10 (GA completa de *Hypocrea gelatinosa*; SQN12 del documento US7413879)

MHVLSTAVLLGSVAVQKVLGRPGSNGLSGVTKRSVDDFINTQTPIALNNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVI
ASPSTTDPDYYYMWTRDSALVFKNIVDRFTQQYDAGLQRRIEQYISAQVTLQGPSNPSGSLSDGSGLGEP
KFELTLSQFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQSTVSSIIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDL
WEEVNGSSFFTVANQHRALVEGATLAATLGQSGSTYSSVAPQILCFLQRFWVSGGYIDSNINSNDGRTGK
DANSLLASIHTFDPSLGCDASTFQPCSDKALSNLKVVVDSFRSIYGVNKGISAGSAVAIGRYPEDVYFNG
NPWYLATFAAAEQLYDSVYVWKKTGSITVTSTSLAFFQELVPGVAAGTYSSSQSTFTSIVNAVSTYADGF
LSEAAKYVPADGSLAEQFDRNTGTPLSAVHLTWSYASFFTAAARRSGVVPPSWASSGANSIPATCSGASV
VGSYSSPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPFTPLPCATPTSVAVTFHELATTQFGQNIKVAGSAPELGNWSTS
AAIALDAVNYATNHPLWIGSVNLEAGDVIEYKYINVGQDGSVTWESDPNHTYTVPAVACVTEVVKEDTWQ
S

SEQ ID NO: It (GA completa de *Hypocrea orientals*; SQN14 del documento US7413879)

MHVLSTAVLLGSVAVQKVLGRPGSSGLSDVTKRSVDDFISTETPIALNNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVI
ASPSTIDPDYYYMWTRDSALVFKNLVDRFTETYDAGLQRRIEQYITAQVTLQGLSNPSGSLTDGSGLGEP
KFELTLQPFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQSTVSNVIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDL
WEEVKGSSFFTIANQHRALVEGATLAATLGQSGSTYSSVAPQILCFLQRFWVSSGGYVDSNINTNEGRTG
KDVNSILTSIHTLDPNLGCDAGTFQPCSDKALSNLKVVVDSFRSIYGVNKGIPAGAAVAIGRYAEDVYFN
GNPWYLATFAAAEQLYDAVYVWKKTGSITVTATSLAFFQELVPGVAAGTYASSSSTFTNIINAVSTYADG
FLSEAAKYVPADGSLAEQFDRNSGTPLSALHLTWSYASFLTATARRAGIVPPSWANSSASTIPSTCSGAS
VVGSYSRPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPYTPLPCATPTSVAVTFHELVSTQLGQTVKVAGNAPALGNWST
SAAVALDAVNYADNHPLWIGTVDLEAGDVVEYKYINVGQDGSVTWESDPNHTYTVPAVACVTQVVKEDTW
QS

SEQ ID NO: 12 (GA completa de *Trichoderma konilangbra*; SQN16 del documento US7413879)

MHVLSTAVLLGSVAVQKVLGRPGSSGLSDVTKRSVDDFISTQTPIALNNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVI
ASPSTTDPDYYYMWTRDSALVFKNLVDRFTETYDAGLQRRIEQYIAAQVTLQGLTNPSGSLSDGSGLGEP
KFELTLKPFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQSTVSSLIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDL
WEEVNGSSFFTTANQHRALVEGATLAATLSQPASTYSSVAPQILCFLQRYWVSSGGYVDSNINTNEGRTG
KDANSILAAIHTFDPNLGRDAGTFQPCSDKALSNLKVVVDSFRSIYGVNKGIPAGAAAAVGRYPEDVYFN
GNPWYLATFAAAEQLYDAIYVWKKTGSITVTAISLAFFQELVPGVAAGTYSSSQSTFTNIINAVSTYADG
FISEAAKYVPADGSLAEQFDRNNGTPLSALHLTWSYASFLTATARRAGIVPPSWANSSASSIPSTCSGAS
VVGSYSRPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPYTPLPCATPASVAVTFHELVSTQLGQTVKVAGSAPALGNWST
SAAVALDAVNYADNHPLWIGSVELEAGDVVEYKYINVGQDGSVTWESDPNHTYTVPAVACVTQVVKEDTW
QS

SEQ ID NO: 13 (GA completa de *Trichoderma* sp; SQN29 del documento US7413879)

MHVLSTAVLLGSVAVQKVLGRPGASDITKRAVTDFINSETPIALNNLICNVGPDGCRAFGTSIGAVVASP
STTDPDYFYMWTRDSALVFKTLVDRFTQKYDAGLQRRIEQYIAAQVTLQGISNPSGSLSDGSGLGEPKFE
LTLSQFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLISNNYQSTVSNIIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDLWEE
VNGSSFFAVANQHRALVEGATLATTLGQSGSSYSTVAPQILCFLQKFWSPSGYVISNINSNDGRTGKDSN
SILTSIHTFDPSIGCDAATFQPCSDKALSNLKVYVDSFRSIYGVNSGIPAGTAVAVGRYPEDVYFNGNPW
YLSTFAVAEQLYDALYVWKKTGSITVTSTSLAFFQELVPSVTAGTYASSSSTFTSIVNAVSTYADGFVSE
AAKYVPSDGSLSEQFDKNTGTPLSAVHLTWSYASFLTATTRRAGIVPPSWISSGANTVPSSCSGTTVAGS
YSSPTATSFPPSQTPKTAATGTSFTPIACATPTSVAVTFHELATTVPGQTIKVVGNAQALGNWSTSAGVA
LNAVNCASNHPLWIGPVNLKAGDVVEYKYINVGSDGSVTWEADPNHTYTVPAVACVTAVVKEDTWQS

SEQ ID NO: 14 (GA completa de *Trichoderma harzianum*; SQN31 del documento US7413879)

MHVLSTAVLLGSVAVQKVLGRPGSNGLSGVTKRSVDDSINTQTPIALNNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVI
ASPSTTDPDYYYMWTRDSALVFKNIVDRFTEQYDAGLQRRIEQYISAQVTLQGISNPSGSLSDGSGLGEP
KFELTLSQFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQSTVSNIIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDL
WEEVNGSSFFTVANQHRALVEGATLAATLGQSGSTYSSVAPQILCFLQRFWVSGGYIDSNINTNEGRTGK
DANSLLASIHTFDPSLGCDASTFQPCSDKALSNLKVVVDSFRSIYSVNKGIPAGAAVAVGRYPEDVYFNG
NPWYLATFAAAEQLYDSVYVWKKTGSITVTSTSLAFFQELVPGVAAGTYSSSQSTFTSIINAVSTYADGF
LSEAAKYVPADGSLAEQFDRNTGTPLSAVHLTWSYASFLTAAARRAGVVPPSWASSGANSVPSSCSGASV
VGSYSRPTATSFPPSQTPKPGAPSGAPFTPIPCATPASVAVTFHELATTQFGQTIKVAGSAPELGNWSTS
AAIALDAVNYATNHPLWIGSVNLEAGDVIEYKYISVGQDGSVTWESDPNHTYTVPAVACVTEVVKEDTWQ
S

SEQ ID NO: 15 (GA completa de *Trichoderma longibrachiatum*; SQN33 del documento US7413879)

MHVLSTAVLLGSVAVQKVLGRPGSSGLSDVTKRSVDDFISTETPIALNNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVI
ASPSTIDPDYYYMWTRDSALVFKNLVDRFTETYDAGLQRRIEQYITAQVTLQGLSNPSGSLTDGSGLGEP
KFELTLKPFTGNWGRPQRDGPALRAVALIGYSKWLINNNYQSTVSNVIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDL
WEEVNGSSFFTMANQHRALVEGATLAATLGQSGSTYSSVAPQILCFLQRFWVSSGGYVDSNINTNEGRTG
KDVNSVLTSIHTFDPNLGCDAATFQPCSDKALSNLKVVVDSFRSIYGVNKGIPAGAAVAIGRYAEDVYFN
GNPWYLATFAAAEQLYDAIYVWKKTGSITVTATSLAFFQELVPGVAAGTYASSSSTFTNIINAVSTYADG
FLSEAAKYVPADGSLAEQFDRNSGTPLSALHLTWSYASFLTATARRAGIVPPSWANSSASTIPSTCSGAS
VVGSYSRPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPYTPLPCATPTSVAVTFHELVSTQFGQTVKVAGNAPALGNWSA
SAAVALDAINYADNHPLWIGTVDLEAGDVVEYKYINVGQDGSVTWESDPNHTYTVPAVACVTQVVKEDTW
QS

SEQ ID NO: 16 (GA completa de *Trichoderma asperellum*; SQN35 del documento US7413879)

MHVLSTAVLLGSVAVQKVLGRPGSNGLSGVTKRSVDDFINTQTPIALNNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVI
ASPSTTDPDYYYMWTRDSALVFKNIVDRFTQQYDAGLQRRIEQYISAQVTLQGISNPSGSLSDGSGLGEP
KFELTLSQFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQSTVSNIIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDL
WEEVNGSSFFTVANQHRALVEGATLAATLGQSGSTYSSVAPQILCFLQRFWVSGGYIDSNINTNEGRTGK
DANSLLASIHTFDPSLGCDASTFQPCSDKALSNLKVVVDSFRSIYGVNKGIPAGSAVAIGRYPEDVYFNG
NPWYLATFAAAEQLYDSVYVWKKTGSITVTSTSLAFFQELVPGVAAGTYSSSQSTFTSIINAVSTYADGF
LSEAAKYVPADGSLAEQFDRNTGTPLSAVHLTWSYASFLTAAARRAGVVPPSWASSGANSVPSSCSGASV
VGSYSRPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPFTPIPCATPTSVAVTFHELATTQFGQTIKVAGSAPELGNWSTS
AAIALDAVNYATNHPLWIGSVSLEAGDVIEYKYINVGQDGSVTWESDPNHTYTVPAVACVTEVVKEDTWQ
S

SEQ ID NO: 17 (GA completa de *Trichoderma strictipilis*; SQN37 del documento US7413879)

MHVLSTAVLLGSVAVQKVLGRPGSSGLSDITKRSVDDFISTQTPIALNNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVI
ASPSTTDPDYYYMWTRDSALVFKNLVDRFTETYDAGLQRRIEQYITAQVTLQGLTNPSGSLADGSGLGEP
KFELTLSPFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQSTVSNVIWPIVRNDLSYAAQYWNQTGFDL
WEEVSGSSFFTVANQHRALVEGATLAATLGQSGSTYSSVAPQILCFLQRFWVSSGGYVDSNINTNEGRTG
KDVNSILTSIHTFDPNLGCDAGTFQPCSDKALSNFKVVVDSFRSIYGVNNGIPAGAAVAIGRYPEDVYFN
GNPWYLATFAAAEQLYDAIYVWKKTGSITVTAISLAFFQELVPGVTAGTYSSSQSTFTNIINAASTYADG

FVTEAAKYVPTDGSLAEQFDRNNGTPLSALHLTWSYASFLTASARRAGVVPPSWANSSASSISSTCSGAS
VVGSYSSPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPYTPLPCATPTSVAVTFHELVSTQFGQTVKAAGSAPALGNWST
SAAVGLDAVNYADNHPLWIGTVELEAGDVVEYKYINVGQDGSVTWESDPNHTYTVPAVACVTEVVKEDTW
QS

SEQ ID NO: 18 (GA completa de *Trichoderma virens* Gv29-8; EHK25059.1)

MHVLSTAVLLGSVAVQKVLGRPGSNGLSDITKRSVDSFISAETPIALNNLLCNVGPDGCRAFGTSAGAVI
ASPSTVDPDYYYMWTRDSALVFKNIVDRFTQKYDAGLQRRIEQYISAQVTLQGISNPSGSLSDGSGLGEP
KFELTLNQFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLINNNYQSTVSSVIWPIVKNDLNYVAQYWNQTGFDL
WEEVNGSSFFTVANQHRALVEGATLATTLGQSGSTYSSVAPQILCFLQRFWVSGSYIDSNINVNEGRTGK
DANSLLASIHTFDPSLGCDASTFQPCSDKALSNLKVVVDSFRSIYGVNSGISASSAVAIGRYPEDVYFNG
NPWYLATFAAAEQLYDALYVWKQAGSITVTSTSLAFFQQLVPGVAAGTYSSSQSTYTSIINAVSAYADGF
MNEAAKYVPADGSLAEQFDKNSGTPLSAVHLTWSYASFLTAADRRAGIVPSSWASSGANTVPSSCSGASV
VGSYSRPTATSFPPSQTPKPGVPSGTPFTPIPCATPTSVAVTFHELATTQFGQTIKVVGSVPELGNWSTN
AAVALNAVNYASNHPLWLGSINLAAGEVVQYKYINVGSDGSVTWESDPNHTYTVPAVACVTQVVKEDTWQ
S

SEQ ID NO: 19 (GA completa de *Trichoderma atroviride* IMI 206040; EHK49034.1)

MHVLSTAVLLGSVAVQKVLGRPGASDITKRAVTDFINSETPIALNNLICNVGPDGCRAFGTSIGAVVASP
STTDPDYFYMWTRDSALVFKTLVDRFTQNYDAGLQRRIEQYIAAQVTLQGISNPSGSLSDGSGLGEPKFE
LTLSQFTGNWGRPQRDGPALRAIALIGYSKWLISNNYQSTVSNIIWPIVRNDLNYVAQYWNQTGFDLWEE
VNGSSFFTVANQHRALVEGATLATTLGQSGSSYSTVAPQILCFLQKFWSPSGYVISNINSNDGRTGKDSN
SILTSIHTFDPSIGCDAATFQPCSDKALSNLKVYVDSFRSIYGVNSGIPAGTAVAVGRYPEDVYFNGNPW
YLSTFAVAEQLYDALYVWKKTGSITVTSTSLAFFQELVPSVTAGTYASSSSTFTSIVNAVSTYADGFVSE
AAKYVPSDGSLSEQFDKNTGTPLSAVHLTWSYASFLTATARRAGIVPPSWISSGANTVPSSCSGTTVAGS
YSSPTATSFPPSQTPKTAATGTSFTPIACATPTSVAVTFHELATTVPGQTIKVVGNAQALGNWSTSAGVA
LNAVNYASNHPLWIGPVNLKAGDVVEYKYINVGSDGSVTWEADPNHTYTVPAVACVTAVVKEDTWQS

REIVINDICACIONES

1. Variante de glucoamilasa que tiene al menos un 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, comprendiendo la variante sustituciones de aminoácido correspondientes a las posiciones: 50, 417, 430, 511, 539 y 563 de SEQ ID NO: 2, donde la sustitución de aminoácido en la posición 50 es M50Y, G, F o K.

2. Variante de glucoamilasa según la reivindicación 1, donde la sustitución de aminoácido en la posición 50 es M50Y, y/o donde las sustituciones de aminoácido en las posiciones 417, 430, 511, 539 y 563 son: L417V, T430A, Q511H, A539R y N563I, respectivamente.

3. Variante de glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde la variante de glucoamilasa tiene al menos un 95 %, un 97 % o un 99 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2.

4. Variante de glucoamilasa según la reivindicación 1, donde la variante de glucoamilasa comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

5. Variante de glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que también comprende una o más sustituciones de aminoácido adicionales correspondientes a las posiciones: 43, 44, 61, 73, 294, 431, 503 o 535 de SEQ ID NO: 2, opcionalmente donde las sustituciones de aminoácido son: I43Q/R, D44C/R, N61I, G73F, G294C, A431L/Q, E503A/V y/o A535R.

6. Variante de glucoamilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la variante de glucoamilasa:

(a) muestra una termoestabilidad aumentada o actividad específica aumentada; y/o
(b) pierde menos actividad después de la oxidación;

en comparación con una segunda variante de glucoamilasa que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 en las mismas condiciones.

7. Composición enzimática que comprende la variante de glucoamilasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, comprendiendo también, opcionalmente, una hexoquinasa, una xilanasa, una glucosa isomerasa, una xilosa isomerasa, una fosfatasa, una fitasa, una pululanasa, una β-amilasa, una α-amilasa, una proteasa, una celulasa, una hemicelulasa, una lipasa, una cutinasa, una trehalasa, una isoamilasa, una enzima redox, una esterasa, una transferasa, una pectinasa, una liasa, una α-glucosidasa, una β-glucosidasa o una combinación de las mismas.

8. Método de procesamiento de almidón que comprende poner en contacto un sustrato de almidón con la variante de glucoamilasa de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, o la composición enzimática de la reivindicación 7, para producir una composición que comprende glucosa.

9. Método según la reivindicación 8, que comprende además la adición de una hexoquinasa, una xilanasa, una glucosa isomerasa, una xilosa isomerasa, una fosfatasa, una fitasa, una pululanasa, una β-amilasa, una α-amilasa, una proteasa, una celulasa, una hemicelulasa, una lipasa, una cutinasa, una trehalasa, una isoamilasa, una enzima redox, una esterasa, una transferasa, una pectinasa, una hidrolasa, una alfa-glucosidasa, una beta-glucosidasa o una combinación de las mismas al sustrato de almidón.

10. Método según la reivindicación 8 o la reivindicación 9, donde el procesamiento de almidón comprende la sacarificación del sustrato de almidón, lo que da lugar a un jarabe con un nivel elevado de glucosa.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, que comprende además la fermentación de la composición que comprende glucosa hasta obtener un producto final.

12. Método según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, donde la sacarificación y la fermentación se llevan a cabo como un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SFS).

13. Método según la reivindicación 11 o la reivindicación 12, donde el producto final es:

(a) alcohol, opcionalmente etanol; o
(b) ácido cítrico, ácido láctico, ácido succínico, glutamato monosódico, ácido glucónico, gluconato de sodio, gluconato cálcico, gluconato de potasio, glucono delta-lactona, eritorbato sódico, ácido graso omega 3, butanol, lisina, ácido itacónico, 1,3-propanodiol, biodiesel o isopreno.

14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8-13, donde el sustrato de almidón:

(a) tiene aproximadamente entre un 15 % y un 50 % de materia seca (MS); y/o
(b) se selecciona entre trigo, cebada, maíz, centeno, arroz, sorgo, salvado, mandioca, milo, mijo, patata, boniato, tapioca y cualquier combinación de los mismos; y/o

(c) comprende almidón licuado, almidón gelatinizado o almidón granular.

15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 8-14, donde la glucoamilasa se dosifica en un rango de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1,0 unidad de glucoamilasa (GAU) por gramo de materia seca de almidón (msa).

FIG. 1A

```
SEQ ID NO 2     -------------------- -------------SVDDFIS TETPIALNNLLCNVGPDGCR 27
SEQ ID NO 7     MHVLSTAVLLGLVAVQKVLG RPGLNGVPDVTKRSVDDFIS NESPIALNNLLCNVGPDGCR 60
SEQ ID NO 8     MHVLSTAVLLGSVAVQKVLG RPGSNGLSGVTKRSVDDFIN TQTPIALNNLLCNVGPDGCR 60
SEQ ID NO 9     MHVLSTAVLLGSVAVQKVLG RPGSSGLYDVTKRSVDDFIS TETPIALNNLLCNVGPDGCR 60
SEQ ID NO 10    MHVLSTAVLLGSVAVQKVLG RPGSNGLSGVTKRSVDDFIN TQTPIALNNLLCNVGPDGCR 60
SEQ ID NO 11    MHVLSTAVLLGSVAVQKVLG RPGSSGLSDVTKRSVDDFIS TETPIALNNLLCNVGPDGCR 60
SEQ ID NO 12    MHVLSTAVLLGSVAVQKVLG RPGSSGLSDVTKRSVDDFIS TQTPIALNNLLCNVGPDGCR 60
SEQ ID NO 13    MHVLSTAVLLGSVAVQKVLG RPGAS---DITKRAVTDFIN SETPIALNNLICNVGPDGCR 57
SEQ ID NO 14    MHVLSTAVLLGSVAVQKVLG RPGSNGLSGVTKRSVDDSIN TQTPIALNNLLCNVGPDGCR 60
SEQ ID NO 15    MHVLSTAVLLGSVAVQKVLG RPGSSGLSDVTKRSVDDFIS TETPIALNNLLCNVGPDGCR 60
SEQ ID NO 16    MHVLSTAVLLGSVAVQKVLG RPGSNGLSGVTKRSVDDFIN TQTPIALNNLLCNVGPDGCR 60
SEQ ID NO 17    MHVLSTAVLLGSVAVQKVLG RPGSSGLSDITKRSVDDFIS TQTPIALNNLLCNVGPDGCR 60
SEQ ID NO 18    MHVLSTAVLLGSVAVQKVLG RPGSNGLSDITKRSVDSFIS AETPIALNNLLCNVGPDGCR 60
SEQ ID NO 19    MHVLSTAVLLGSVAVQKVLG RPGAS---DITKRAVTDFIN SETPIALNNLICNVGPDGCR 57
                                                *   *     ******* *********

SEQ ID NO 2     AFGTSAGAVIASPSTIDPDY YYMWTRDSALVFKNLIDRFT ETYDAGLQRRIEQYITAQVT 87
SEQ ID NO 7     AFGASAGTVAASPSTTDPDY YYMWTRDSALIFKTVVDRFT QNYDASLQKRIEQYIAAQAT 120
SEQ ID NO 8     AFGTSAGAVIASPSTTDPDY YYMWTRDSALVFKNIVDRFT QQYDAGLQRRIEQYISAQVT 120
SEQ ID NO 9     AFGTSAGAVIASPSTTDPDY YYMWTRDSALVFKNLVDRFT EEYDAGLQRRIEQYITAQVT 120
SEQ ID NO 10    AFGTSAGAVIASPSTTDPDY YYMWTRDSALVFKNIVDRFT QQYDAGLQRRIEQYISAQVT 120
SEQ ID NO 11    AFGTSAGAVIASPSTIDPDY YYMWTRDSALVFKNLVDRFT ETYDAGLQRRIEQYITAQVT 120
SEQ ID NO 12    AFGTSAGAVIASPSTTDPDY YYMWTRDSALVFKNLVDRFT ETYDAGLQRRIEQYIAAQVT 120
SEQ ID NO 13    AFGTSIGAVVASPSTTDPDY FYMWTRDSALVFKTLVDRFT QKYDAGLQRRIEQYIAAQVT 117
SEQ ID NO 14    AFGTSAGAVIASPSTTDPDY YYMWTRDSALVFKNIVDRFT EQYDAGLQRRIEQYISAQVT 120
SEQ ID NO 15    AFGTSAGAVIASPSTIDPDY YYMWTRDSALVFKNLVDRFT ETYDAGLQRRIEQYITAQVT 120
SEQ ID NO 16    AFGTSAGAVIASPSTTDPDY YYMWTRDSALVFKNIVDRFT QQYDAGLQRRIEQYISAQVT 120
SEQ ID NO 17    AFGTSAGAVIASPSTTDPDY YYMWTRDSALVFKNLVDRFT ETYDAGLQRRIEQYITAQVT 120
SEQ ID NO 18    AFGTSAGAVIASPSTVDPDY YYMWTRDSALVFKNIVDRFT QKYDAGLQRRIEQYISAQVT 120
SEQ ID NO 19    AFGTSIGAVVASPSTTDPDY FYMWTRDSALVFKTLVDRFT QNYDAGLQRRIEQYIAAQVT 117
                *** * * * ***** ****  ********** **   ****   *** ** ****** ** *
```

FIG. 1B

```
SEQ ID NO 2     LQGLSNPSGSLADGSGLGEP KFELTLKPFTGNWGRPQRDG PALRAIALIGYSKWLINNNY 147
SEQ ID NO 7     LQGISNPSGSLADGSGLGEP KFELTLNQFTGHWGRPQRDG PALRAIALIGYSKWLIDNNY 180
SEQ ID NO 8     LQGISNPSGSLSDGSGLGEP KFELTLSQFTGNWGRPQRDG PALRAIALIGYSKWLINNNY 180
SEQ ID NO 9     LQGLTNPSGSLSDGSGLGEP KFELTLQPFTGNWGRPQRDG PALRAIALIGYAKWLINNNY 180
SEQ ID NO 10    LQGPSNPSGSLSDGSGLGEP KFELTLSQFTGNWGRPQRDG PALRAIALIGYSKWLINNNY 180
SEQ ID NO 11    LQGLSNPSGSLTDGSGLGEP KFELTLQPFTGNWGRPQRDG PALRAIALIGYSKWLINNNY 180
SEQ ID NO 12    LQGLTNPSGSLSDGSGLGEP KFELTLKPFTGNWGRPQRDG PALRAIALIGYSKWLINNNY 180
SEQ ID NO 13    LQGISNPSGSLSDGSGLGEP KFELTLSQFTGNWGRPQRDG PALRAIALIGYSKWLISNNY 177
SEQ ID NO 14    LQGISNPSGSLSDGSGLGEP KFELTLSQFTGNWGRPQRDG PALRAIALIGYSKWLINNNY 180
SEQ ID NO 15    LQGLSNPSGSLTDGSGLGEP KFELTLKPFTGNWGRPQRDG PALRAVALIGYSKWLINNNY 180
SEQ ID NO 16    LQGISNPSGSLSDGSGLGEP KFELTLSQFTGNWGRPQRDG PALRAIALIGYSKWLINNNY 180
SEQ ID NO 17    LQGLTNPSGSLADGSGLGEP KFELTLSPFTGNWGRPQRDG PALRAIALIGYSKWLINNNY 180
SEQ ID NO 18    LQGISNPSGSLSDGSGLGEP KFELTLNQFTGNWGRPQRDG PALRAIALIGYSKWLINNNY 180
SEQ ID NO 19    LQGISNPSGSLSDGSGLGEP KFELTLSQFTGNWGRPQRDG PALRAIALIGYSKWLISNNY 177
                ***  ****** ******** ******  *** ******** ***** ***** **** ***

SEQ ID NO 2     QSTVSNVIWPIVRNDLNYVA QYWNQTGFDLWEEVNGSSFF TVANQHRALVEGATLAATLG 207
SEQ ID NO 7     QSTVSDIIWPILRNDLNYVA QYWNQTGFDLWEEVEGSSFF TVANQHRALVEGATLAAILG 240
SEQ ID NO 8     QSTVSNIIWPIVRNDLNYVA QYWNQTGFDLWEEVNGSSFF TVANQHRALVEGATLAATLG 240
SEQ ID NO 9     QSTVSSVIWPIVRNDLNYVA QYWNQTGFDLWEEVDGSSFF TVANQHRALVEGATLVATLG 240
SEQ ID NO 10    QSTVSSIIWPIVRNDLNYVA QYWNQTGFDLWEEVNGSSFF TVANQHRALVEGATLAATLG 240
SEQ ID NO 11    QSTVSNVIWPIVRNDLNYVA QYWNQTGFDLWEEVKGSSFF TIANQHRALVEGATLAATLG 240
SEQ ID NO 12    QSTVSSLIWPIVRNDLNYVA QYWNQTGFDLWEEVNGSSFF TTANQHRALVEGATLAATLS 240
SEQ ID NO 13    QSTVSNIIWPIVRNDLNYVA QYWNQTGFDLWEEVNGSSFF AVANQHRALVEGATLATTLG 237
SEQ ID NO 14    QSTVSNIIWPIVRNDLNYVA QYWNQTGFDLWEEVNGSSFF TVANQHRALVEGATLAATLG 240
SEQ ID NO 15    QSTVSNVIWPIVRNDLNYVA QYWNQTGFDLWEEVNGSSFF TMANQHRALVEGATLAATLG 240
SEQ ID NO 16    QSTVSNIIWPIVRNDLNYVA QYWNQTGFDLWEEVNGSSFF TVANQHRALVEGATLAATLG 240
SEQ ID NO 17    QSTVSNVIWPIVRNDLSYAA QYWNQTGFDLWEEVSGSSFF TVANQHRALVEGATLAATLG 240
SEQ ID NO 18    QSTVSSVIWPIVKNDLNYVA QYWNQTGFDLWEEVNGSSFF TVANQHRALVEGATLATTLG 240
SEQ ID NO 19    QSTVSNIIWPIVRNDLNYVA QYWNQTGFDLWEEVNGSSFF TVANQHRALVEGATLATTLG 237
                *****  ****  *** * * ************** *****   *************   *
```

FIG. 1C

```
SEQ ID NO 2     QSGSAYSSVAPQVLCFLQRF WVSSGGYVDSNINTNEGRTG KDVNSVLTSIHTFDPNLGCD 267
SEQ ID NO 7     QSGSSYSAVAPQILCFLQKF WVSSGGYVNSNINSDINRTG KDANSLLASIHTFDPSIGCD 300
SEQ ID NO 8     QSGSTYSSVAPQILCFLQRF WVS-GGYIDSNINTNEGRTG KDANSLLASIHTFDPSLGCD 299
SEQ ID NO 9     QSGDTYSSVAPQVLCFLQRF WVSSGGYIDSNINTNEGRTG KDANSILTSIHTFDPNLGCD 300
SEQ ID NO 10    QSGSTYSSVAPQILCFLQRF WVS-GGYIDSNINSNDGRTG KDANSLLASIHTFDPSLGCD 299
SEQ ID NO 11    QSGSTYSSVAPQILCFLQRF WVSSGGYVDSNINTNEGRTG KDVNSILTSIHTLDPNLGCD 300
SEQ ID NO 12    QPASTYSSVAPQILCFLQRY WVSSGGYVDSNINTNEGRTG KDANSILAAIHTFDPNLGRD 300
SEQ ID NO 13    QSGSSYSTVAPQILCFLQKF WSP-SGYVISNINSNDGRTG KDSNSILTSIHTFDPSIGCD 296
SEQ ID NO 14    QSGSTYSSVAPQILCFLQRF WVS-GGYIDSNINTNEGRTG KDANSLLASIHTFDPSLGCD 299
SEQ ID NO 15    QSGSTYSSVAPQILCFLQRF WVSSGGYVDSNINTNEGRTG KDVNSVLTSIHTFDPNLGCD 300
SEQ ID NO 16    QSGSTYSSVAPQILCFLQRF WVS-GGYIDSNINTNEGRTG KDANSLLASIHTFDPSLGCD 299
SEQ ID NO 17    QSGSTYSSVAPQILCFLQRF WVSSGGYVDSNINTNEGRTG KDVNSILTSIHTFDPNLGCD 300
SEQ ID NO 18    QSGSTYSSVAPQILCFLQRF WVS-GSYIDSNINVNEGRTG KDANSLLASIHTFDPSLGCD 299
SEQ ID NO 19    QSGSSYSTVAPQILCFLQKF WSP-SGYVISNINSNDGRTG KDSNSILTSIHTFDPSIGCD 296
                *    ** **** *****   *     *  ****    *** ** ** *  *** **  * *

SEQ ID NO 2     AGTFQPCSDKALSNLKVVVD SFRSIYGVNKGIPAGAAVAI GRYAEDVYYNGNPWYLATFA 327
SEQ ID NO 7     PATFQPCSDKALSNLKSVVD SFRSIYGVNQGISAGSAVAI GRYSEDVYFNGNPWYLATFA 360
SEQ ID NO 8     ASTFQPCSDKALSNLKVVVD SFRSIYGVNKGIPAGSAVAI GRYPEDVYFNGNPWYLATFA 359
SEQ ID NO 9     AGTFQPCSDKALSNLKVVVD SFRSIYSLNKGIPAGAAVAI GRYPEDVYFNGNPWYLATFA 360
SEQ ID NO 10    ASTFQPCSDKALSNLKVVVD SFRSIYGVNKGISAGSAVAI GRYPEDVYFNGNPWYLATFA 359
SEQ ID NO 11    AGTFQPCSDKALSNLKVVVD SFRSIYGVNKGIPAGAAVAI GRYAEDVYFNGNPWYLATFA 360
SEQ ID NO 12    AGTFQPCSDKALSNLKVVVD SFRSIYGVNKGIPAGAAAAV GRYPEDVYFNGNPWYLATFA 360
SEQ ID NO 13    AATFQPCSDKALSNLKVYVD SFRSIYGVNSGIPAGTAVAV GRYPEDVYFNGNPWYLSTFA 356
SEQ ID NO 14    ASTFQPCSDKALSNLKVVVD SFRSIYSVNKGIPAGAAVAV GRYPEDVYFNGNPWYLATFA 359
SEQ ID NO 15    AATFQPCSDKALSNLKVVVD SFRSIYGVNKGIPAGAAVAI GRYAEDVYFNGNPWYLATFA 360
SEQ ID NO 16    ASTFQPCSDKALSNLKVVVD SFRSIYGVNKGIPAGSAVAI GRYPEDVYFNGNPWYLATFA 359
SEQ ID NO 17    AGTFQPCSDKALSNFKVVVD SFRSIYGVNNGIPAGAAVAI GRYPEDVYFNGNPWYLATFA 360
SEQ ID NO 18    ASTFQPCSDKALSNLKVVVD SFRSIYGVNSGISASSAVAI GRYPEDVYFNGNPWYLATFA 359
SEQ ID NO 19    AATFQPCSDKALSNLKVYVD SFRSIYGVNSGIPAGTAVAV GRYPEDVYFNGNPWYLSTFA 356
                  ************ *  ** ******  * ** *  * *  *** **** ******* ***
```

FIG. 1D

```
SEQ ID NO 2     AAEQLYDAIYVWKKTGSITV TATSLAFFQELVPGVTAGTY SSSSS-TFTNIINAVSTYAD 386
SEQ ID NO 7     AAEQLYDSLYVWKQTGSITV TAIPLAFFQELVPGVAAGTY LSSQS-TFTSIVNAVSAYAD 419
SEQ ID NO 8     AAEQLYDSVYVWKKTGSITV TSTSSAFFQELVPGVAAGTY SSSQS-TFTSIINAISTYAD 418
SEQ ID NO 9     AAEQLYDAVYVWKETGSITV TATSLAFFQELVPGVTAGTY SSSSSSTFTTIINAVSTYAD 420
SEQ ID NO 10    AAEQLYDSVYVWKKTGSITV TSTSLAFFQELVPGVAAGTY SSSQS-TFTSIVNAVSTYAD 418
SEQ ID NO 11    AAEQLYDAVYVWKKTGSITV TATSLAFFQELVPGVAAGTY ASSSS-TFTNIINAVSTYAD 419
SEQ ID NO 12    AAEQLYDAIYVWKKTGSITV TAISLAFFQELVPGVAAGTY SSSQS-TFTNIINAVSTYAD 419
SEQ ID NO 13    VAEQLYDALYVWKKTGSITV TSTSLAFFQELVPSVTAGTY ASSSS-TFTSIVNAVSTYAD 415
SEQ ID NO 14    AAEQLYDSVYVWKKTGSITV TSTSLAFFQELVPGVAAGTY SSSQS-TFTSIINAVSTYAD 418
SEQ ID NO 15    AAEQLYDAIYVWKKTGSITV TATSLAFFQELVPGVAAGTY ASSSS-TFTNIINAVSTYAD 419
SEQ ID NO 16    AAEQLYDSVYVWKKTGSITV TSTSLAFFQELVPGVAAGTY SSSQS-TFTSIINAVSTYAD 418
SEQ ID NO 17    AAEQLYDAIYVWKKTGSITV TAISLAFFQELVPGVTAGTY SSSQS-TFTNIINAASTYAD 419
SEQ ID NO 18    AAEQLYDALYVWKQAGSITV TSTSLAFFQQLVPGVAAGTY SSSQS-TYTSIINAVSAYAD 418
SEQ ID NO 19    VAEQLYDALYVWKKTGSITV TSTSLAFFQELVPSVTAGTY ASSSS-TFTSIVNAVSTYAD 415
                 ******  ****  ***** *    **** *** * ****  ** * * * * ** * ***

SEQ ID NO 2     GFLSEAAKYVPADGSLAEQF DRNSGTPLSALHLTWSYASF LTATARRAGIVPPSWANSSA 446
SEQ ID NO 7     GFLNEAAKYVPSDGSLAEQF DKNNGTPLSAVHLTWSYASF LTATARRAGSVPPSWANSNA 479
SEQ ID NO 8     GFLSEAAKYVPADGSLAEQF DRNTGTPLSAVHLTWSYASF LTAAARRAGVVPPSWASSGA 478
SEQ ID NO 9     GFLSEAAKYVPADGSLAEQF DRNNGTALSARHLTWSYASF LTATARRAGVVPPSWANSSA 480
SEQ ID NO 10    GFLSEAAKYVPADGSLAEQF DRNTGTPLSAVHLTWSYASF FTAAARRSGVVPPSWASSGA 478
SEQ ID NO 11    GFLSEAAKYVPADGSLAEQF DRNSGTPLSALHLTWSYASF LTATARRAGIVPPSWANSSA 479
SEQ ID NO 12    GFISEAAKYVPADGSLAEQF DRNNGTPLSALHLTWSYASF LTATARRAGIVPPSWANSSA 479
SEQ ID NO 13    GFVSEAAKYVPSDGSLSEQF DKNTGTPLSAVHLTWSYASF LTATTRRAGIVPPSWISSGA 475
SEQ ID NO 14    GFLSEAAKYVPADGSLAEQF DRNTGTPLSAVHLTWSYASF LTAAARRAGVVPPSWASSGA 478
SEQ ID NO 15    GFLSEAAKYVPADGSLAEQF DRNSGTPLSALHLTWSYASF LTATARRAGIVPPSWANSSA 479
SEQ ID NO 16    GFLSEAAKYVPADGSLAEQF DRNTGTPLSAVHLTWSYASF LTAAARRAGVVPPSWASSGA 478
SEQ ID NO 17    GFVTEAAKYVPTDGSLAEQF DRNNGTPLSALHLTWSYASF LTASARRAGVVPPSWANSSA 479
SEQ ID NO 18    GFMNEAAKYVPADGSLAEQF DKNSGTPLSAVHLTWSYASF LTAADRRAGIVPSSWASSGA 478
SEQ ID NO 19    GFVSEAAKYVPSDGSLSEQF DKNTGTPLSAVHLTWSYASF LTATARRAGIVPPSWISSGA 475
                **  ******* **** *** * * ** *** *********  **  ** * ** **  * *
```

FIG. 1E

```
SEQ ID NO 2     STIPSTCSGASVVGSYSRPT ATSFPPSQTPKPGVPSGTPY TPLPCATPTSVAVTFHELVS 506
SEQ ID NO 7     TSIPTACSGTSVVGSYSSPT ATSFPPSQTPKVGKPTGTPF TPIPCATPTSVAVTFHELPT 539
SEQ ID NO 8     NTVPSSCSGASVVGSYSRPT ATSFPPSQTPKPGVPSGTPF TPIPCATPTSVAVTFHELAT 538
SEQ ID NO 9     STIPSTCSGASVVGSYSRPT ATSFPPSQTPKPGVPSGTPY TPLPCATPTSVAVTFHELVS 540
SEQ ID NO 10    NSIPATCSGASVVGSYSSPT ATSFPPSQTPKPGVPSGTPF TPLPCATPTSVAVTFHELAT 538
SEQ ID NO 11    STIPSTCSGASVVGSYSRPT ATSFPPSQTPKPGVPSGTPY TPLPCATPTSVAVTFHELVS 539
SEQ ID NO 12    SSIPSTCSGASVVGSYSRPT ATSFPPSQTPKPGVPSGTPY TPLPCATPASVAVTFHELVS 539
SEQ ID NO 13    NTVPSSCSGTTVAGSYSSPT ATSFPPSQTPKT-AATGTSF TPIACATPTSVAVTFHELAT 534
SEQ ID NO 14    NSVPSSCSGASVVGSYSRPT ATSFPPSQTPKPGAPSGAPF TPIPCATPASVAVTFHELAT 538
SEQ ID NO 15    STIPSTCSGASVVGSYSRPT ATSFPPSQTPKPGVPSGTPY TPLPCATPTSVAVTFHELVS 539
SEQ ID NO 16    NSVPSSCSGASVVGSYSRPT ATSFPPSQTPKPGVPSGTPF TPIPCATPTSVAVTFHELAT 538
SEQ ID NO 17    SSISSTCSGASVVGSYSSPT ATSFPPSQTPKPGVPSGTPY TPLPCATPTSVAVTFHELVS 539
SEQ ID NO 18    NTVPSSCSGASVVGSYSRPT ATSFPPSQTPKPGVPSGTPF TPIPCATPTSVAVTFHELAT 538
SEQ ID NO 19    NTVPSSCSGTTVAGSYSSPT ATSFPPSQTPKT-AATGTSF TPIACATPTSVAVTFHELAT 534
                      ***  * **** ** ***********     *    **  **** *********

SEQ ID NO 2     TQFGQTVKVAGNAAALGNWS TSAAVALDAVNYADNHPLWI GTVNLEAGDVVEYKYINVGQ 566
SEQ ID NO 7     TQFGQTIKLAGSAEALGNWS TGAAVGLDAANYASNHPLWF GTLNLQAGDVIEYKYINVGK 599
SEQ ID NO 8     TQFGQTIKVAGSAPELGNWS TSAAIALDAVNYATNHPLWI GSVNLEAGDVIEYKYINVGQ 598
SEQ ID NO 9     TQFGQTVKVAGSAQALGNWS TSAAVALDAVNYADNHPLWI GTVNLEAGDVVEYKYINVGQ 600
SEQ ID NO 10    TQFGQNIKVAGSAPELGNWS TSAAIALDAVNYATNHPLWI GSVNLEAGDVIEYKYINVGQ 598
SEQ ID NO 11    TQLGQTVKVAGNAPALGNWS TSAAVALDAVNYADNHPLWI GTVDLEAGDVVEYKYINVGQ 599
SEQ ID NO 12    TQLGQTVKVAGSAPALGNWS TSAAVALDAVNYADNHPLWI GSVELEAGDVVEYKYINVGQ 599
SEQ ID NO 13    TVPGQTIKVVGNAQALGNWS TSAGVALNAVNCASNHPLWI GPVNLKAGDVVEYKYINVGS 594
SEQ ID NO 14    TQFGQTIKVAGSAPELGNWS TSAAIALDAVNYATNHPLWI GSVNLEAGDVIEYKYISVGQ 598
SEQ ID NO 15    TQFGQTVKVAGNAPALGNWS ASAAVALDAINYADNHPLWI GTVDLEAGDVVEYKYINVGQ 599
SEQ ID NO 16    TQFGQTIKVAGSAPELGNWS TSAAIALDAVNYATNHPLWI GSVSLEAGDVIEYKYINVGQ 598
SEQ ID NO 17    TQFGQTVKAAGSAPALGNWS TSAAVGLDAVNYADNHPLWI GTVELEAGDVVEYKYINVGQ 599
SEQ ID NO 18    TQFGQTIKVVGSVPELGNWS TNAAVALNAVNYASNHPLWL GSINLAAGEVVQYKYINVGS 598
SEQ ID NO 19    TVPGQTIKVVGNAQALGNWS TSAGVALNAVNYASNHPLWI GPVNLKAGDVVEYKYINVGS 594
                *  **  *  *    *****   *   * * * * *****  *   * ** *  **** **
```

FIG. 1F

```
                 ++++++++++++++++++++++++++++++++++++++++
SEQ ID NO 2      DGSVTWESDPNHTYTVPAVA CVTQVVKEDTWQS 599
SEQ ID NO 7      DGSVTWESDPNHTYTVPAVA CVTEVVKEDTWQS 632
SEQ ID NO 8      DGSVTWESDPNHTYTVPAVA CVTEVVKEDTWQS 631
SEQ ID NO 9      DGSVTWESDPNHTYTVPAVA CVTQVVKEDTWQS 633
SEQ ID NO 10     DGSVTWESDPNHTYTVPAVA CVTEVVKEDTWQS 631
SEQ ID NO 11     DGSVTWESDPNHTYTVPAVA CVTQVVKEDTWQS 632
SEQ ID NO 12     DGSVTWESDPNHTYTVPAVA CVTQVVKEDTWQS 632
SEQ ID NO 13     DGSVTWEADPNHTYTVPAVA CVTAVVKEDTWQS 627
SEQ ID NO 14     DGSVTWESDPNHTYTVPAVA CVTEVVKEDTWQS 631
SEQ ID NO 15     DGSVTWESDPNHTYTVPAVA CVTQVVKEDTWQS 632
SEQ ID NO 16     DGSVTWESDPNHTYTVPAVA CVTEVVKEDTWQS 631
SEQ ID NO 17     DGSVTWESDPNHTYTVPAVA CVTEVVKEDTWQS 632
SEQ ID NO 18     DGSVTWESDPNHTYTVPAVA CVTQVVKEDTWQS 631
SEQ ID NO 19     DGSVTWEADPNHTYTVPAVA CVTAVVKEDTWQS 627
                 ******* ************ *** *********
```

Dominio catalítico de TrGA — Residuos 1-453 de SEQ ID NO: 2

Enlace de TrGA — Residuos 454-490 de SEQ ID NO: 2

Dominio de unión al almidón de TrGA — Residuos 491-599 de SEQ ID NO: 2

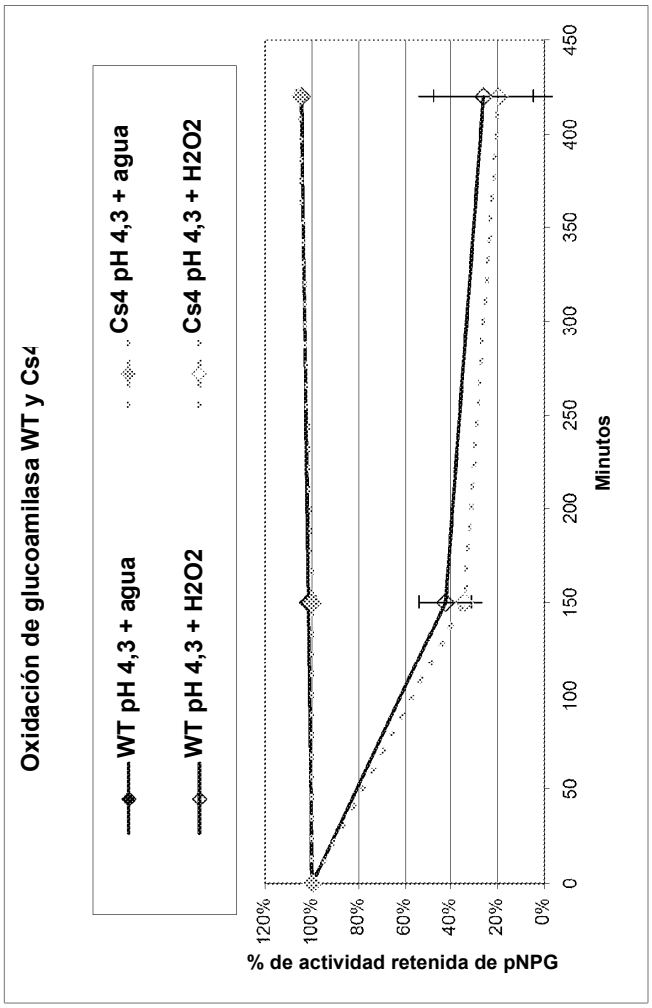
Oxidación de glucoamilasa WT y Cs4
WT pH 4,3 + agua
WT pH 4,3 + H2O2
Cs4 pH 4,3 + agua
Cs4 pH 4,3 + H2O2
% de actividad retenida de pNPG
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
Minutos

FIG. 2

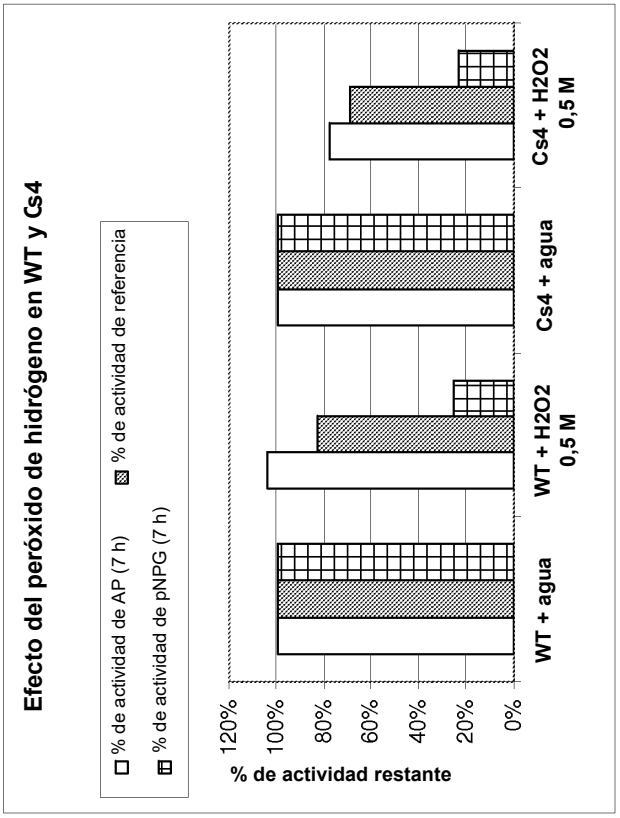
Efecto del peróxido de hidrógeno en WT y Cs4
% de actividad de AP (7 h)
% de actividad de referencia
% de actividad de pNPG (7 h)
% de actividad restante
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
WT + agua
WT + H2O2 0,5 M
Cs4 + agua
Cs4 + H2O2 0,5 M

FIG. 3

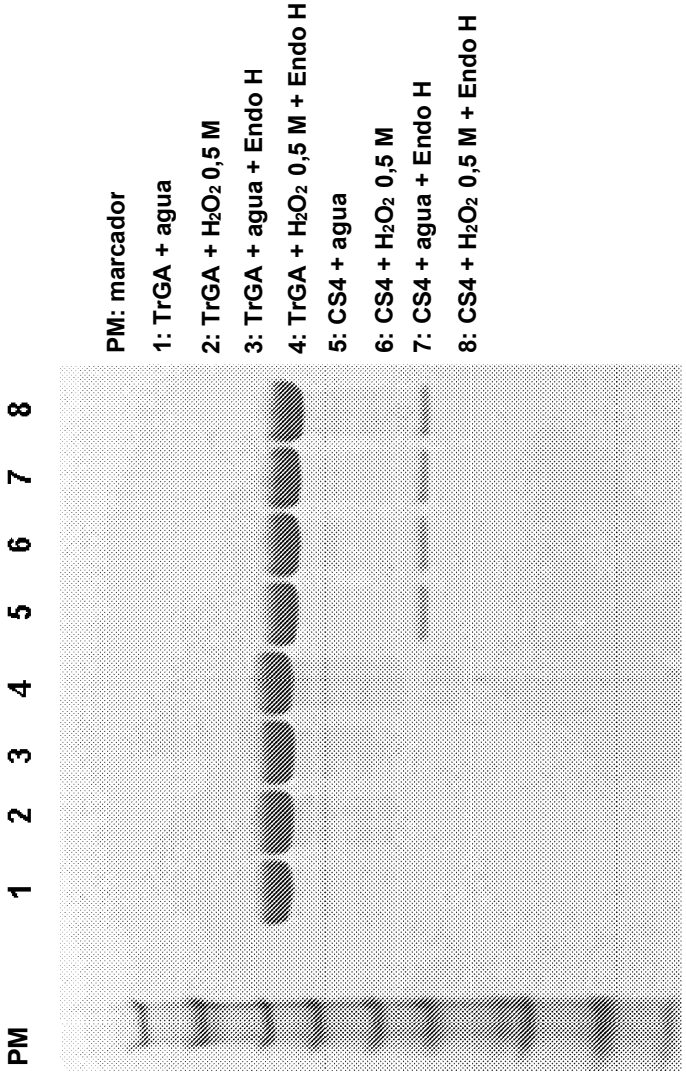
PM
1
2
3
4
5
6
7
8
PM: marcador
1: TrGA + agua
2: TrGA + H_2O_2 0,5 M
3: TrGA + agua + Endo H
4: TrGA + H_2O_2 0,5 M + Endo H
5: CS4 + agua
6: CS4 + H_2O_2 0,5 M
7: CS4 + agua + Endo H
8: CS4 + H_2O_2 0,5 M + Endo H

FIG. 4

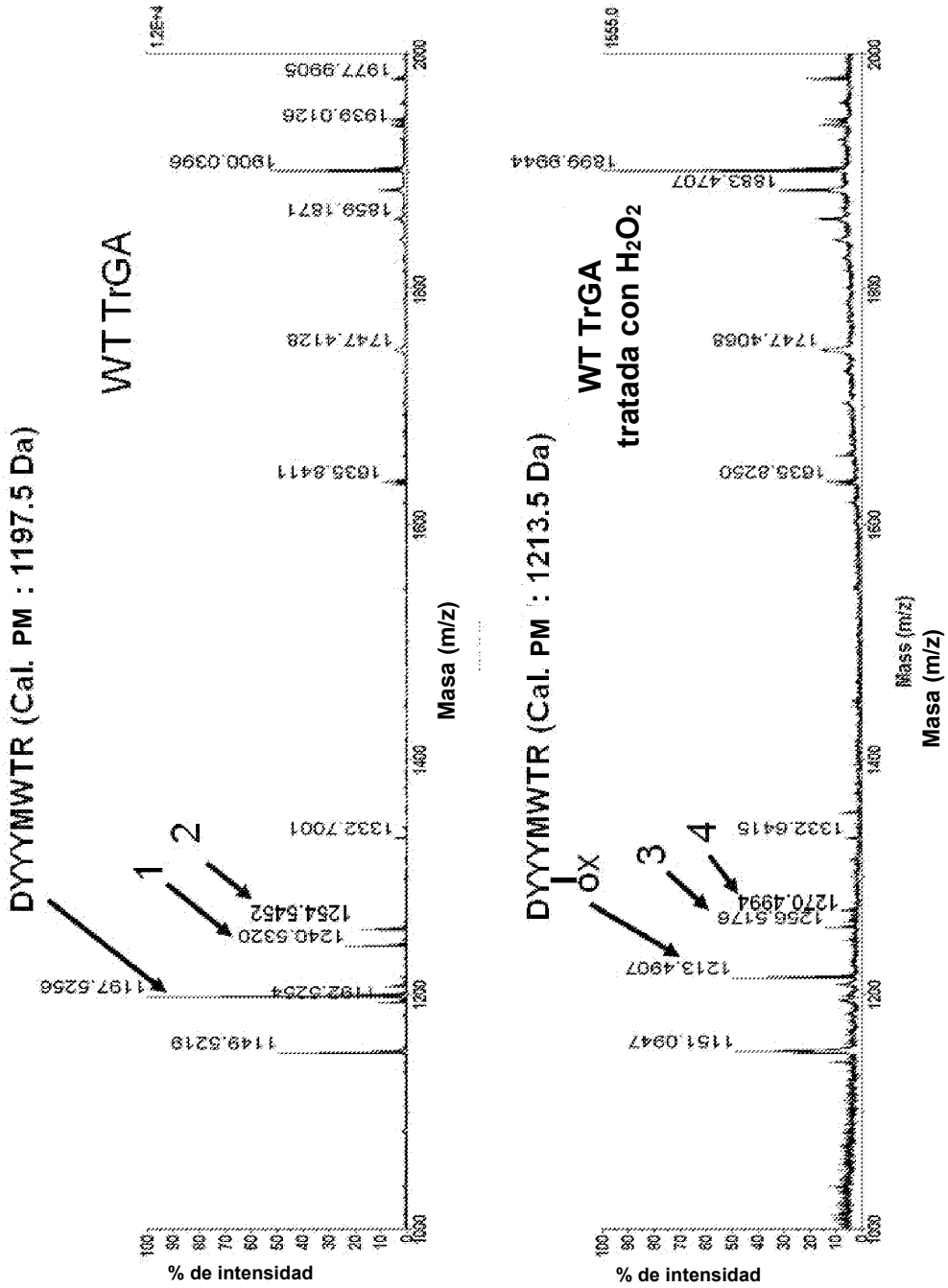
DYYYMWTR (Cal. PM : 1197.5 Da)
WT TrGA
1
2
1197.5256
1254.5452
1240.5320
1332.7001
1149.5219
1635.8411
1747.4128
1859.1871
1900.0396
1939.0126
1977.9905
% de intensidad
Masa (m/z)
DYYYMWTR (Cal. PM : 1213.5 Da)
OX
WT TrGA
tratada con H_2O_2
3
4
1213.4907
1270.4994
1256.5176
1332.6415
1151.0947
1635.8250
1747.4068
1883.4707
1899.9944
% de intensidad
Masa (m/z)

FIG. 5A

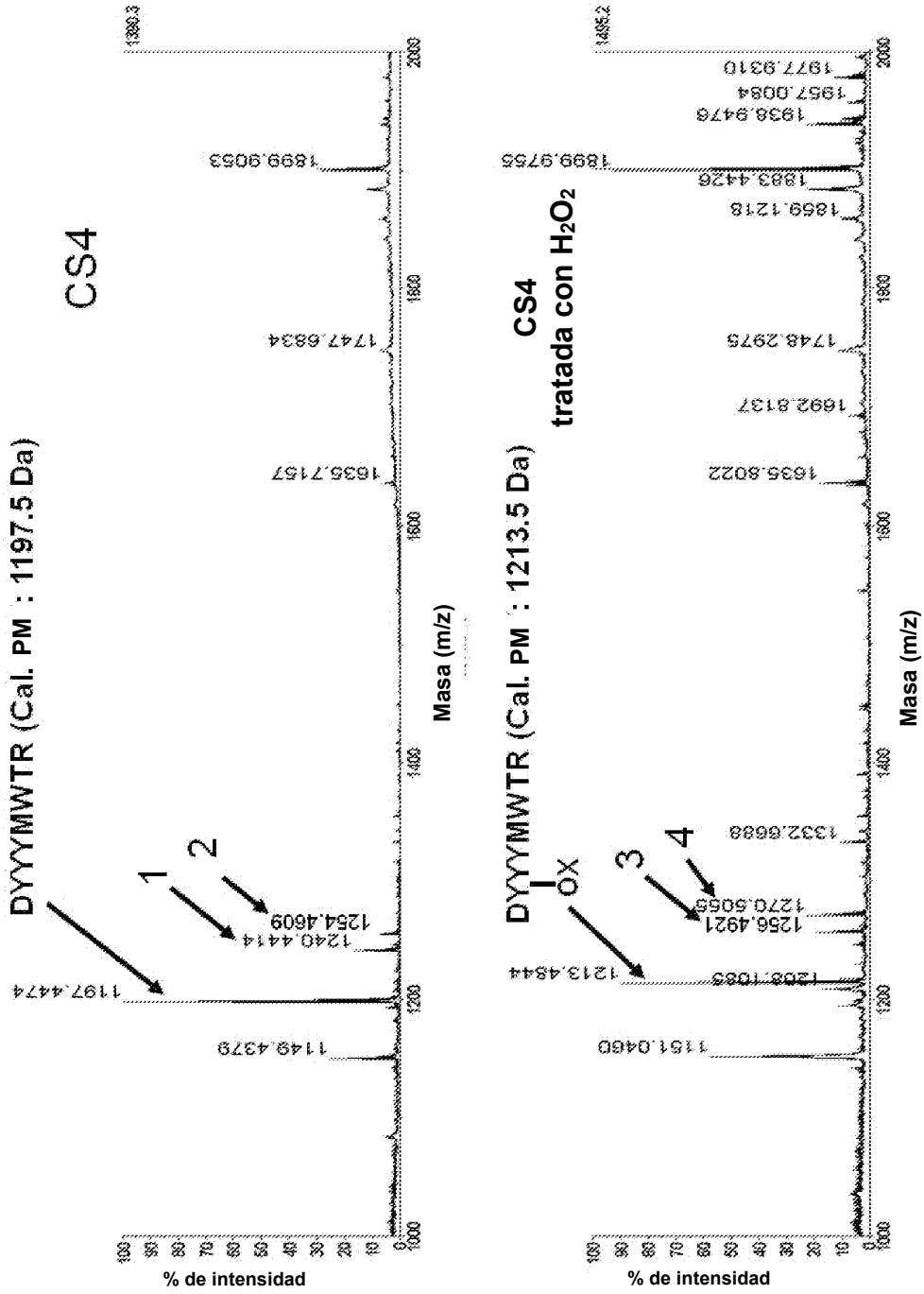
CS4
DYYYMWTR (Cal. PM : 1197.5 Da)
1
2
1197.4474
1149.4379
1240.4414
1254.4609
1635.7157
1747.6834
1899.9053
% de intensidad
Masa (m/z)
CS4
tratada con H_2O_2
DYYYMWTR (Cal. PM : 1213.5 Da)
I
OX
3
4
1151.0460
1213.4544
1208.1083
1256.4921
1270.5065
1332.6688
1635.8022
1692.8137
1748.2975
1869.1218
1883.4426
1899.9755
1938.9476
1957.0084
1977.9310
% de intensidad
Masa (m/z)

FIG. 5B

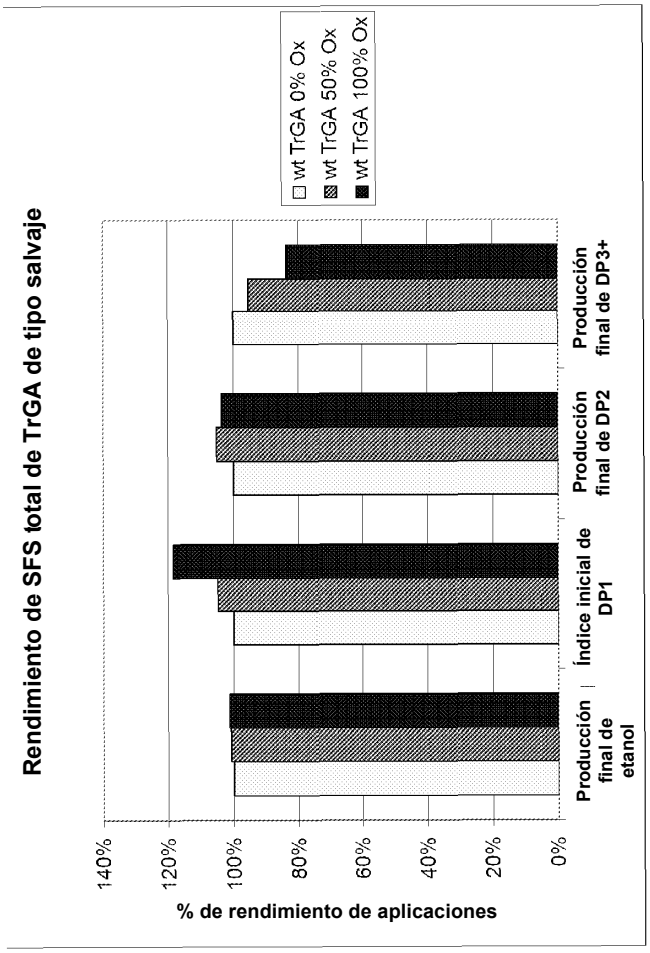
Rendimiento de SFS total de TrGA de tipo salvaje
% de rendimiento de aplicaciones
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Producción final de etanol
Índice inicial de DP1
Producción final de DP2
Producción final de DP3+
wt TrGA 0% Ox
wt TrGA 50% Ox
wt TrGA 100% Ox

FIG. 6A

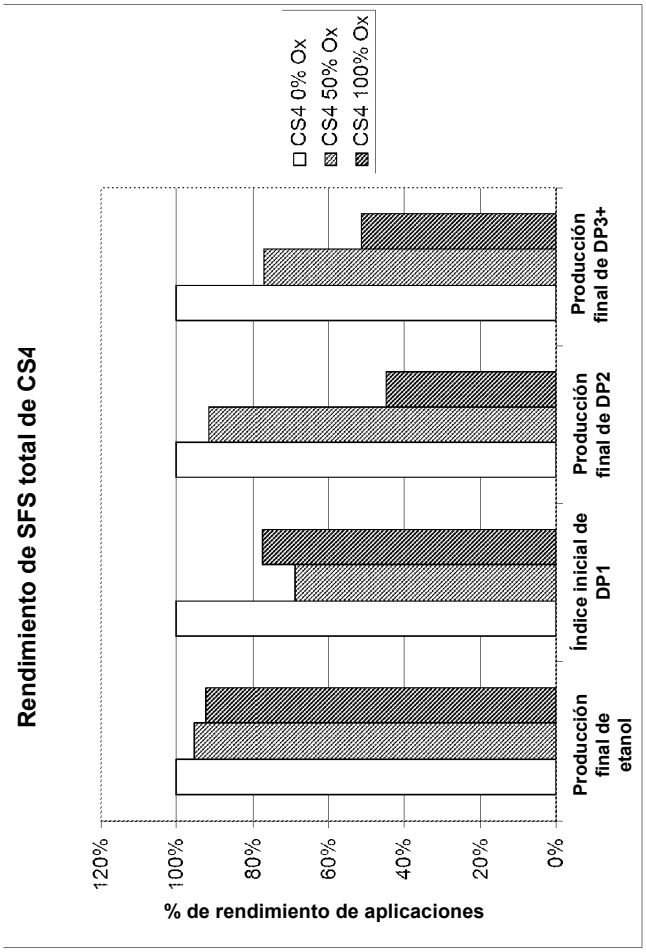
Rendimiento de SFS total de CS4
% de rendimiento de aplicaciones
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Producción final de etanol
Índice inicial de DP1
Producción final de DP2
Producción final de DP3+
CS4 0% Ox
CS4 50% Ox
CS4 100% Ox

FIG. 6B