



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 952**

51 Int. Cl.:  
**C12P 19/16** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04738953 .1**

96 Fecha de presentación : **25.06.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1641932**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2006**

54 Título: **Proceso de hidrólisis del almidón.**

30 Prioridad: **25.06.2003 DK 2003 00949**  
**24.10.2003 DK 2003 01568**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.10.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.10.2011**

73 Titular/es: **NOVOZYMES A/S**  
**Krogshoejvej 36**  
**2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es: **Viksoe-Nielsen, Anders;**  
**Andersen, Carsten;**  
**Pedersen, Sven y**  
**Hjort, Carsten**

74 Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 366 952 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

Proceso de hidrólisis del almidón

### CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] La presente invención se refiere a un proceso para la hidrólisis de almidón granulado en un hidrolizado de almidón soluble a una temperatura por debajo de la temperatura inicial de gelatinización de dicho almidón granulado.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 [0002] Un gran número de procesos han sido descritos para convertir almidón en hidrolizados de almidón, tales como jarabes de maltosa, glucosa o de especialidad, bien para uso como edulcorantes o como precursores para otros sacáridos tales como la fructosa. La glucosa puede también ser fermentada a etanol u otros productos de fermentación, tales como ácido cítrico, glutamato monosódico, ácido glucónico, gluconato sódico, gluconato cálcico, gluconato postásico, glucono delta lactona, eritorbato sódico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico; cetonas; aminoácidos, ácido glutámico (monoglutaminato de sodio), penicilina, tetraciclina; enzimas; vitaminas, tales como riboflavina, B12, beta-caroteno u hormonas.

15 [0003] El almidón es un polímero de peso molecular alto que consiste en cadenas de unidades de glucosa. Normalmente consiste en aproximadamente un 80% de amilopectina y un 20% de amilosa. La amilopectina es un polisacárido ramificado en el que cadenas lineales de residuos de alfa-1,4 D-glucosa se unen mediante enlaces glucosídicos alfa-1,6.

20 [0004] La amilosa es un polisacárido lineal formado por unidades de D-glucopiranosas unidas entre sí por enlaces glucosídicos alfa-1,4. En el caso de convertir el almidón en un hidrolizado de almidón soluble, el almidón es despolimerizado. El proceso de despolimerización convencional consiste en un paso de gelatinización y dos pasos de proceso consecutivos, es decir, un proceso de licuefacción y un proceso de sacarificación.

25 [0005] El almidón granulado consiste en gránulos microscópicos, que son insolubles en agua a temperatura ambiente. Cuando una suspensión acuosa de almidón se calienta, los gránulos se hinchan y finalmente estallan, dispersando las moléculas de almidón en la solución. Durante este proceso "gelatinización" se produce un aumento espectacular de la viscosidad. Como el nivel de sólidos es un 30-40% en un proceso típico industrial, el almidón tiene que ser diluido o "licuado" de modo que pueda ser manipulado. Esta reducción en la viscosidad se obtiene hoy en día principalmente mediante la degradación enzimática. Durante el paso de licuefacción, el almidón de cadena larga se degrada en unidades más pequeñas ramificadas y lineales (maltodextrinas) mediante una alfa-amilasa. El proceso de licuefacción se lleva a cabo típicamente a aproximadamente 105-110°C durante aproximadamente 5 a 10 minutos, seguidos de 1-2 horas a aproximadamente 95°C. La temperatura es luego disminuida a 60°C, se añaden una glucoamilasa o una beta-amilasa y opcionalmente una enzima desramificante, tal como una isoamilasa o una pululanasa, y el proceso de sacarificación continúa durante aproximadamente de 24 a 72 horas.

35 [0006] A partir de la explicación anterior, será obvio que el proceso de conversión de almidón convencional consume mucha energía debido a los diferentes requisitos en cuanto a temperatura durante los distintos pasos. Por lo tanto, es deseable poder seleccionar las enzimas usadas en el proceso de modo que el proceso global pueda ser realizado sin tener que gelatinizar el almidón. Tales procesos son el tema de las patentes US4591560, US4727026 y US4009074 y EP0171218. El documento WO 02/068589 divulga una alfa-amilasa termoestable para la hidrólisis de almidón.

[0007] La presente invención se refiere a un proceso de un solo paso para convertir almidón granulado en hidrolizado de almidón soluble a una temperatura inferior a la temperatura de gelatinización inicial del almidón.

### RESUMEN DE LA INVENCION

40 [0008] En un primer aspecto, la invención proporciona un proceso para producir un hidrolizado de almidón soluble, comprendiendo el proceso el hecho de someter la suspensión acuosa de almidón granulado a una temperatura inferior a la temperatura de gelatinización inicial de dicho almidón granulado a la acción de una primera enzima y una segunda enzima, donde dicha primera enzima; (a) es un elemento de la familia 13 de glicosido hidrolasas; (b) tiene actividad de hidrólisis alfa-1,4-glucosídico, y; (c) comprende un módulo de unión a carbohidratos (CBM) funcional que pertenece a la familia 20 de CBM, dicho CBM tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos con al menos un 60% de homología con la SEC ID NO:1, una secuencia de aminoácidos con al menos un 75% de homología con la SEC ID NO:2, y una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de homología con la SEC ID NO:3; y dicha segunda enzima se selecciona de la lista que comprende una alfa-amilasa fúngica (EC 3.2.1.1), una beta-amilasa (E.C. 3.2.1.2), y una glucoamilasa (E.C.3.2.1.3). El proceso del primer aspecto de la invención se puede realizar como un proceso de un solo paso y/o como un proceso comprendiendo uno o más pasos.

50 [0009] En un segundo aspecto, la invención proporciona un proceso para la producción de jarabe de almidón rico en fructosa (HFSS), incluyendo el proceso los pasos de; (a) someter una suspensión acuosa de almidón granulado a una temperatura inferior a la temperatura de gelatinización inicial de dicho almidón granulado para la acción de una primera

- enzima y una segunda enzima, dicha primera enzima; (i) es un elemento de la familia 13 de glicósido hidrolasas (ii) tiene una actividad de hidrólisis alfa-1.4-glucosídico, y; (iii) comprende un módulo de unión a carbohidratos (CBM) funcional de la familia 20 de CBM, dicho CBM tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos con al menos un 60% de homología con la SEC ID NO:1, una secuencia de aminoácidos con al menos un 75% de homología con la SEC ID NO:2, y una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de homología con la SEC ID NO:3 y dicha segunda enzima se selecciona de la lista que comprende una alfa-amilasa fúngica (EC 3.2.1.1), una beta-amilasa (E.C. 3.2.1.2), y una glucoamilasa (E.C.3.2.1.3), para producir un hidrolizado de almidón soluble, (b) someter dicho hidrolizado de almidón soluble, para la conversión en jarabe de maíz rico en fructosa (HFCS).
- 5
- 10 [0010] En un tercer aspecto, la invención proporciona un proceso para la producción de un producto de fermentación, incluyendo el proceso los pasos de: (a) someter una suspensión acuosa de almidón granulado a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho almidón granulado a la acción de una primera enzima y una segunda enzima, dicha primera enzima; (i) es un elemento de la familia 13 de glicósido hidrolasas; (ii) tiene una actividad de hidrólisis alfa-1.4-glucosídico, y; (iii) comprende un módulo de unión a carbohidratos (CBM) funcional de la familia 20
- 15 de CBM, dicho CBM tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos con al menos un 60% de homología con la SEC ID NO:1, una secuencia de aminoácidos con al menos un 75% de homología con la SEC ID NO:2, y una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de homología con la SEC ID NO:3; y dicha segunda enzima se selecciona de la lista comprendiendo una alfa-amilasa fúngica (EC 3.2.1.1), una beta-amilasa (E.C. 3.2.1.2), y una glucoamilasa (E.C.3.2.1.3), para producir un hidrolizado de almidón soluble, (b) someter dicho hidrolizado de almidón soluble a fermentación en un producto de fermentación. En una forma de realización preferida del tercer aspecto el producto de fermentación es etanol.
- 20

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### Definiciones

- 25 [0011] El término "almidón granulado" se entiende como almidón crudo no tratado, es decir, almidón que no ha sido sometido a una gelatinización. El almidón se forma en las plantas como gránulos minúsculos insolubles en agua. Estos gránulos se conservan en almidones a temperaturas inferiores a la temperatura inicial de gelatinización. Cuando se ponen en agua fría, puede que los granos absorban una pequeña cantidad del líquido. Hasta 50°C - 70°C el hinchamiento es reversible, el grado de reversibilidad depende del almidón en particular. Con temperaturas más altas, se inicia un hinchamiento irreversible llamado gelatinización.
- 30 [0012] El término "temperatura inicial de gelatinización" se entiende como la temperatura mínima a la que gelatinización del almidón comienza. El almidón calentado en agua empieza a gelatinizarse a entre 50°C y 75°C; la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón en concreto y puede ser determinada fácilmente por el experto en la materia. Así, la temperatura inicial de gelatinización puede variar según las especies de planta, según la variedad particular de las especies de planta, al igual que con las condiciones de crecimiento. En el contexto de esta invención la temperatura de gelatinización inicial de un almidón dado es la temperatura a la que birrefringencia se pierde en un 5% de los gránulos de almidón que usan el método descrito por Gorinstein. S. y Lii. C., Starch/Stärke, Vol. 44 (12) págs. 461-466 (1992).
- 35 [0013] El término "hidrolizado de almidón soluble" se entiende como los productos solubles de los procesos de la invención y puede comprender mono, di, y oligosacáridos, tales como glucosa, maltosa, maltodextrinas, ciclodextrinas y cualquier mezcla de estos. Preferiblemente al menos un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97% o 98% de los sólidos secos del almidón granulado se convierte en un hidrolizado de almidón soluble.
- 40 [0014] El término "jarabes de especialidad", es un término reconocido en la técnica y se caracteriza según el equivalente de dextrosa (DE) y el espectro de carbohidrato (ver el artículo "New Speciality Glucose Syrups", pág. 50, en el libro de texto "Molecular Structure and Function of Food Carbohydrate", editado por G.G. Birch y L.F. Green, Applied Science Publishers LTD., Londres). Típicamente los jarabes de especialidad tienen un DE en el intervalo de 35 a 45.
- 45 [0015] La "familia 13 de glicósido hidrolasas" es definida en el contexto de esta invención como el grupo de hidrolasas que comprende un módulo catalítico con una estructura (beta/alfa)8 o de barril TIM y que actúa en almidón y sustratos relacionados a través de un mecanismo de reacción de alfa retención (Koshland, 1953, Biol.Rev.Camp.Philos.Soc 28, 416-436).
- 50 [0016] Las enzimas con "actividad de hidrólisis alfa-1, 4-glucosídica" son definidas en el contexto de esta invención definida como el grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis y/o síntesis de enlaces alfa-1,4-glucosídicos tal y como define Takata (Takata et al, 1992, J. Biol. Chem. 267, 18447-18452) y por Koshland (Koshland, 1953, Biol.Rev. Camp. Philos. Soc 28, 416-436).
- 55 [0017] El "módulo de unión a carbohidratos de la familia 20" o un módulo CBM-20 es definido en el contexto de esta invención como una secuencia de aproximadamente 100 aminoácidos con al menos un 45% de homología con el módulo de unión a carbohidratos (CBM) del polipéptido descrito en la figura 1 por Joergensen et al (1997) en Biotechnol.

- Let. 19:1027-1031. El CBM comprende los últimos 102 aminoácidos del polipéptido, es decir, la subsecuencia desde el aminoácido 582 al aminoácido 683. La numeración de familias de glicosido hidrolasas aplicada en esta descripción sigue el concepto de Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) CAZy -Carbohydrate-Active Enzymes en la URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html> o alternativamente Coutinho, P.M. & Henrissat, B. 1999; The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach. En "Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation", K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita y T. Kimura eds., Uni Publishers Co., Tokio, págs. 15-23, y Bourne, Y. & Henrissat, B. 2001 Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules, Current Opinion in Structural Biology 11:593-600 .
- 5 [0018] Un módulo de unión a carbohidratos (CBM) es una secuencia de aminoácidos de polipéptido que se une preferentemente a un poli u oligosacárido (carbohidrato), frecuentemente —pero no necesariamente en exclusiva— a una forma insoluble en agua (incluyendo cristalino) del mismo.
- 10 [0019] Aunque varios tipos de CBMs han sido descritos en la bibliografía científica y de patentes, de la mayoría de ellos —muchos de los cuales derivan de enzimas celulolíticas (celulasas)— se hace referencia comúnmente como "módulos de unión a celulosa"; un módulo de unión a celulosa típico será entonces un CBM que ocurre en una celulosa. Asimismo, otras subclases de CBMs abarcarían, p. ej., módulos de unión de quitina (CBMs que típicamente ocurren en quitinasas), módulos de unión de xilano (CBMs que típicamente ocurren en xilanasas), módulos de unión de manano (CBMs que típicamente ocurren en mananasas), módulos de unión a almidón (CBMs que pueden ocurrir en determinadas enzimas amilolíticas, tales como determinadas glucoamilasas, o en enzimas tales como glucanotransferasas de ciclodextrina), o en alfa-amilasas.
- 15 [0020] Los CBMs se encuentran como partes integrales de polipéptidos grandes o proteínas que consisten en dos o más regiones de secuencia de aminoácidos de polipéptido, especialmente en enzimas hidrolíticas (hidrolasas) que típicamente comprenden un módulo catalítico que contiene el sitio activo para la hidrólisis del sustrato y un módulo de unión a carbohidratos (CBM) para la unión al sustrato del carbohidrato en cuestión. Tales enzimas pueden comprender más de un módulo catalítico y uno, dos o tres CBMs, y opcionalmente comprenden además una o más regiones de
- 20 secuencia de aminoácidos de polipéptido que conectan el CBM(s) con el(los) módulo(s) catalítico(s), una región del último tipo normalmente denominada "enlazador". Ejemplos de enzimas hidrolíticas que comprenden un CBM —algunas de las cuales ya han sido mencionadas anteriormente— son las celulasas, xilanasas, mananasas, arabinofuranosidasas, acetilsterasas y quitinasas. También se han encontrado CBMs en algas, p. ej., en el alga roja *Porphyra purpurea* en forma de una proteína de unión a polisacáridos no hidrolítica.
- 25 [0021] En proteínas/polipéptidos en donde tienen lugar CBMs (p. ej., enzimas, típicamente enzimas hidrolíticas), un CBM se puede localizar en el terminal N o C o en una posición interna.
- 30 [0022] Esta parte de un polipéptido o proteína (p. ej. enzima hidrolítica) que constituye un CBM *per se* típicamente consiste en más de aproximadamente 30 y menos de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos. Para la invención se prefieren enzimas que comprenden un CBM con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste
- 35 en una secuencia de aminoácidos con al menos un 60% de homología con la SEC ID NO:1, una secuencia de aminoácidos con al menos un 75% de homología con la SEC ID NO:2, y una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de homología con la SEC ID NO:3
- [0023] La "homología" de polipéptidos referida en esta descripción se entiende como el grado de identidad entre dos secuencias que indican una derivación de la primera secuencia a partir de la segunda. La homología puede ser determinada adecuadamente mediante programas informáticos conocidos en la técnica tales como GAP proporcionado en el paquete de programas GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, versión 8, agosto 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EEUU 53711) (Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453). Se usan los siguientes ajustes para comparar la secuencia de aminoácidos : penalización de creación GAP 3.0 y penalización de extensión GAP 0.1.
- 40 [0024] La enzima a usar como primera enzima de la presente invención es una alfa-amilasa de cuatro módulos que consiste en un núcleo de tres módulos de amilasa y un módulo de unión a carbohidratos de la familia 20 separado. La alfa-amilasa puede ser una alfa-amilasa de tipo salvaje derivada de fuentes fúngicas o bacterianas, o pueden ser mutantes, variantes modificadas de proteínas, u otras variantes de dichos tipos salvajes, o pueden ser híbridos de variantes o tipos salvajes.
- 45 [0025] Preferiblemente la alfa-amilasa es una enzima de tipo salvaje. Más preferiblemente la alfa-amilasa es una variante y/o híbrido de las alfa-amilasas anteriores que comprende modificaciones de aminoácidos que llevan a una actividad aumentada, una estabilidad de proteína aumentada a pH bajo, y/o a pH alto, estabilidad aumentada hacia depleción de calcio, y/o estabilidad aumentada a temperatura elevada.
- 50 [0026] El término "híbridos enzimáticos" referido en esta descripción se entiende como enzimas modificadas que comprenden una secuencia de aminoácidos de una enzima amilolítica [que en el contexto de la presente invención puede ser, p. ej., una alfa-amilasa (EC 3.2.1.1), una isoamilasa (EC 3.2.1.68) o una pululanasa (EC 3.2.1.41)] enlazada
- 55

(es decir, enlazada de manera covalente) a una secuencia de aminoácidos que comprende un CBM. El CBM está preferiblemente, aunque no exclusivamente, fundido al N-terminal. El híbrido puede comprender más de un CBM.

[0027] Híbridos enzimáticos que contienen CBM, al igual que descripciones detalladas de la preparación y purificación del mismo, se conocen en la técnica [ver, p. ej., WO 90/00609, WO 94/24158 y WO 95/16782, así como Greenwood et al., *Biotechnology and Bioengineering* 44 (1994) págs. 1295-1305]. Estos se pueden preparar, p. ej., transformando en una célula huésped un constructo de ADN que comprende al menos un fragmento de ADN que codifica el módulo de unión a celulosa ligado, con o sin un enlazador, a una secuencia de ADN que codifica la enzima de interés, y cultivando la célula huésped transformada para expresar el gen fundido.

[0028] La construcción de una proteína híbrida entre un módulo de unión a carbohidratos (CBM) y una alfa-amilasa requiere uno o más de los siguientes pasos para obtener una enzima estable, expresable y aplicable.

1) Para identificar posibles puntos de cruce a menudo es necesario alinear la molécula donante de CBM con el donante de los módulos catalíticos usando métodos convencionales. Si la homología es relativamente alta puede haber varios puntos de cruce posibles. No obstante, si la homología es baja o si la secuencia del módulo catalítico y el CBM están disponibles, respectivamente, el CBM puede unirse como una enlongación al módulo catalítico, bien al principio de la secuencia, es decir, en el N-terminal insertado después de una secuencia señal al final, o en el C-terminal antes de la señal de terminación. Indiferentemente de si el CBM se localiza en el N-terminal o en el C-terminal, puede ser beneficioso eliminar unos cuantos aminoácidos o insertar varios aminoácidos como enlazadores para obtener una enzima expresable y estable en uso.

2) La construcción del ADN híbrido de los genes que codifican el CBM y el módulo amilolítico según las consideraciones hechas según 1) se puede realizar mediante métodos conocidos por expertos en la técnica. Estos métodos incluyen entre otros, reacciones de la PCR usando cebadores diseñados para hibridar sobre el punto de cruce de ADN resultante, digestión de ADN seguida de ligamiento o combinación in-vivo, por ejemplo, mediante levadura.

3) Una fijación simple de un CBM a un módulo amilolítico frecuentemente resulta en una proteína híbrida que es expresada mal debido a problemas de pliegue o de estabilidad o en una proteína híbrida carente de estabilidad suficiente y/o actividad en una aplicación dada. Para superar tales problemas, la proteína híbrida se pueden someter a ingeniería de proteínas bien mediante métodos de mutagénesis dirigida o mediante más métodos aleatorios. Esto incluye tanto los aminoácidos en los módulos del CBM y en los módulos amilolíticos, como optimizar la transición desde el módulo amilolítico al CBM, respecto a la longitud y secuencia de aminoácidos.

[0029] Como una primera enzima para la presente invención se prefieren enzimas híbridas que comprenden un CBM que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos SEC ID NO:1, SEC ID NO:2, y SEC ID NO:3, así como enzimas con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos con al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98%, tal como al menos un 99% de homología con la SEC ID NO:1, una secuencia de aminoácidos con al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98%, tal como al menos un 99% de homología con la SEC ID NO:2, y una secuencia de aminoácidos con al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98%, tal como al menos un 99% de homología con la SEC ID NO:3

[0030] También se prefieren como primera enzima para la presente invención las enzimas híbridas que comprenden una secuencia de aminoácidos con actividad alfa-amilolítica y que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, SEC ID NO:6, SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:9, SEC ID NO: 10, SEC ID NO:11, SEC ID NO:12, SEC ID NO:13, SEC ID NO:14, SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, y SEC ID NO:18, así como enzimas que comprenden una secuencia de aminoácidos con al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98%, tal como al menos un 99% de homología con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en secuencias de aminoácidos SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, SEC ID NO:6, SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:9, SEC ID NO:10, SEC ID NO:11, SEC ID NO:12, SEC ID NO:13, SEC ID NO:14, SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, y SEC ID NO:18.

[0031] Preferiblemente, la primera enzima de la presente invención comprende un CBM y/o una secuencia alfa-amilolítica derivada de unos hongos, tales como de una cepa de una especie de *Talaromyces*, o de una cepa de una especie de *Aspergillus* tal como *A. awamori*, *A. kawachii*, *A. niger*, *A. oryzae*, etc. o de una bacteria, tal como de una cepa de la especie de *Bacillus*, tal como de una cepa de *B. amilolyquefaciens*, *B. flavothermus*, *B. licheniformis* o *B. stearothermophilus*.

[0032] Más preferida como primera enzima de la presente invención es una alfa-amilasa de cuatro módulos que consiste en un núcleo de amilasa de tres módulos y un módulo de unión a carbohidratos de la familia 20 separado. La más preferida es una alfa-amilasa de cuatro módulos que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 70%,

al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98%, tal como al menos un 99% de homología con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO:19, SEC ID NO:20, SEC ID NO:21 y SEC ID NO:22.

5 [0033] Preferiblemente la primera enzima de la presente invención es una alfa-amilasa de cuatro módulos aislada de un hongo o una bacteria, tal como de una especie de *Bacillus*, tal como los polipéptidos mostrados en la SEC ID NO:20, y en la SEC ID NO:21, o de una cepa de *Bacillus flavothermus*, tal como el polipéptido mostrado en la SEC ID NO:19, o de una cepa de *Aspergillus kawachii* tal como el polipéptido mostrado en la SEC ID NO:22.

10 [0034] Más preferida como primera enzima de la presente invención es una alfa-amilasa que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 98%, tal como al menos un 99% de homología con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO:19, SEC ID NO:20, SEC ID NO:21 y SEC ID NO:22.

[0035] Las alfa-amilasas anteriores se pueden adicionar en una cantidad de 0,001-1,0 KNU/g de DS, preferiblemente de 0,002-0,5 KNU/g de DS, preferiblemente 0,02-0,1 KNU/g de DS.

#### Alfa-amilasa fúngica

15 [0036] Una enzima particular a usar como segunda enzima en los procesos de la invención es una alfa-amilasa fúngica (EC 3.2.1.1), tal como una alfa-amilasa tipo Fungamyl. En la presente divulgación, el término "alfa-amilasa tipo Fungamyl" indica una alfa-amilasa que muestra una alta homología, es decir, más de un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o incluso un 90% de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 10 en WO96/23874. Alfa-amilasas fúngicas se pueden adicionar en una cantidad de 0,001-1,0 AFAU/g de DS, preferiblemente de 0,002-0,5 AFAU/g de DS, preferiblemente 0,02-0,1 AFAU/g de DS.

#### Beta-amilasa

20 [0037] Otra enzima particular a usar como segunda enzima en los procesos de la invención puede ser una beta-amilasa (E.C 3.2.1.2). Beta-amilasa es el nombre generalmente dado a amilasas maltogénicas exoactivas, que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos alfa 1,4 en amilosa, amilopectina y polímeros de glucosa relacionados, liberando así maltosa.

25 [0038] Beta-amilasas han sido aisladas de varias plantas y microorganismos (W.M. Fogarty y C.T. Kelly, Progress in Industrial Microbiology, vol. 15, págs. 112-115, 1979). Estas beta-amilasas se caracterizan por el hecho de tener temperaturas óptimas en el intervalo de 40°C a 65°C y un pH óptimo en el intervalo de 4.5 a 7.0. Beta-amilasas contempladas incluyen la beta-amilasa de cebada de Spezyme® BBA 1500, Spezyme® DBA y Optima™ ME, Optimalt™ BBA de Genencor Int., así como Novozym™ WBA de Novozymes A/S.

#### Glucoamilasa

30 [0039] Otra enzima particular a usar como segunda enzima en los procesos de la invención puede también ser una glucoamilasa (E.C.3.2.1.3) derivada de un microorganismo o una planta. Se prefieren las glucoamilasas de origen bacteriano o fúngico seleccionadas del grupo que consiste en glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular la glucoamilasa G1 o G2 de *A. niger* (Boel et al. (1984), EMBO J. 3 (5), p. 1097-1102), o variantes de las mismas, tales como las descritos en WO92/00381 y WO00/04136; la glucoamilasa de *A. awamori* (WO84/02921), *A. oryzae* (Agric. Biol. Chem. (1991), 55 (4), págs. 941-949), o variantes o fragmentos de las mismas.

35 [0040] Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* contempladas incluyen variantes para mejorar la termoestabilidad: G137A y G139A (Chen et al. (1996), Prot. Engng. 9, 499-505); D257E y D293E/Q (Chen et al. (1995), Prot. Engng. 8, 575-582); N182 (Chen et al. (1994), Biochem. J. 301, 275-281); enlaces disulfuros, A246C (Fierobe et al. (1996), Biochemistry, 35, 8698-8704 ; e introducción a los residuos de prolina en posición A435 y S436 (Li et al. (1997), Protein Engng. 10, 1199-1204 . Otras glucoamilasas contempladas incluyen glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular derivado de *Talaromyces emersonii* (WO99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente estadounidense n°. Re.32, 153), *Talaromyces dupontii*, *Talaromyces thermophilus* (patente estadounidense n°. 4.587.215). Glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género de *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP135.138), y *C. thermohydrosulfuricum*(WO86/01831). Glucoamilasas preferidas incluyen las glucoamilasas derivadas de *Aspergillus oryzae*, tales como una glucoamilasa con un 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o incluso un 90% de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO:2 en WO00/04136. También se contemplan los productos comerciales AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER y AMG™ E (de Novozymes); OPTIDEX™ 300 (de Genencor Int.); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME™ G900 (de Enzyme Bio-Systems); G-ZYME™ G990 ZR (glucoamilasa de *A. niger* y bajo contenido de proteasa).

40 [0041] Glucoamilasas se pueden adicionar en una cantidad de 0,02-2,0 AGU/g de DS, preferiblemente 0,1-1,0 AGU/g de DS, tal como 0,2 AGU/g de DS.

Enzimas adicionales.

[0042] Los procesos de la invención se pueden llevar a cabo en presencia de una tercera enzima. Un tercera enzima en particular puede ser una alfa-amilasa de *Bacillus* (frecuentemente referida como "alfa-amilasas tipo Termamyl" ). Alfa-amilasas tipo Termamyl muy conocidas incluyen alfa-amilasa derivada de una cepa de *B. licheniformis* (disponible comercialmente como Termamyl), *B. amyloliquefaciens*, y alfa-amilasa de *B. stearothermophilus*. Otras alfa-amilasas tipo Termamyl incluyen alfa-amilasa derivada de una cepa de las especies de *Bacillus* NCIB 12289, NCIB 12512, NCIB 12513 o DSM 9375, las cuales son todas descritas en detalle en WO95/26397, y la alfa-amilasa descrita por Tsukamoto et al., Biophysical Research Communications, 151 (1988), págs. 25-31. En el contexto de la presente invención una alfa-amilasa tipo Termamyl es una alfa-amilasa tal y como se define en WO99/19467 en la página 3, línea 18 hasta la página 6, línea 27. Variantes e híbridos contemplados son descritos en WO96/23874, WO97/41213 y WO99/19467. Específicamente contemplado es una variante recombinante de alfa-amilasa de *B. stearothermophilus* con las mutaciones: I181\* + G182\* + N193F. Alfa-amilasas de *Bacillus* se pueden adicionar en cantidades eficaces bien conocidas por el experto en la técnica.

[0043] Otra tercera enzima del proceso en particular puede ser una enzima desramificante, tal como una isoamilasa (E.C. 3.2.1.68) o una pululanasa (E.C. 3.2.1.41). La isoamilasa hidroliza los enlaces ramificados alfa-1,6-D-glucosídicos en amilopectina y beta-dextrinas límite y se puede distinguir de las pululanosas por la incapacidad de la isoamilasa para atacar al pululano, y por la acción limitada en alfa-dextrinas límite. La enzima desramificante se puede adicionar en cantidades eficaces bien conocidas por el experto en la técnica.

Formas de realización de la invención

[0044] La suspensión de almidón a someter a los procesos de la invención puede tener un 20-55% de sólidos secos de almidón granulado, preferiblemente un 25-40% de sólidos secos de almidón granulado, más preferiblemente un 30-35% de sólidos secos de almidón granulado.

[0045] Después de ser sometido al proceso del primer aspecto de la invención, al menos un 85%, al menos un 86%, al menos un 87%, al menos un 88%, al menos un 89%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, o preferiblemente al menos un 99% de los sólidos secos del almidón granulado se convierte en un hidrolizado de almidón soluble.

[0046] Según la invención los procesos del primer y segundo aspecto se llevan a cabo a una temperatura por debajo de la temperatura inicial de gelatinización. Preferiblemente la temperatura a la que se realizan los procesos es de al menos 30°C, al menos 31°C, al menos 32°C, al menos 33°C, al menos 34°C, al menos 35°C, al menos 36°C, al menos 37°C, al menos 38°C, al menos 39°C, al menos 40°C, al menos 41°C, al menos 42°C, al menos 43°C, al menos 44°C, al menos 45°C, al menos 46°C, al menos 47°C, al menos 48°C, al menos 49°C, al menos 50°C, al menos 51 °C, al menos 52°C, al menos 53°C, al menos 54°C, al menos 55°C, al menos 56°C, al menos 57°C, al menos 58°C, al menos 59°C, o preferiblemente al menos 60°C.

[0047] El pH con el que se lleva a cabo el proceso del primer aspecto de la invención puede estar en el intervalo de 3.0 a 7.0, preferiblemente de 3.5 a 6.0, o más preferiblemente de 4.0-5.0.

[0048] La composición exacta de los productos del proceso del primer aspecto de la invención, el hidrolizado de almidón soluble, depende de la combinación de enzimas aplicada, así como del tipo de almidón granulado procesado. Preferiblemente el hidrolizado soluble es maltosa con una pureza de al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95,0%, al menos un 95,5%, al menos un 96,0%, al menos un 96,5%, al menos un 97,0%, al menos un 97,5%, al menos un 98,0%, al menos un 98,5%, al menos un 99,0% o al menos un 99,5%. Incluso más preferiblemente el hidrolizado de almidón soluble es glucosa, y de la forma más preferible el hidrolizado de almidón tiene un DX (porcentaje de glucosa del total de sólidos secos solubilizados) de al menos un 94,5%, al menos un 95,0%, al menos un 95,5%, al menos un 96,0%, al menos un 96,5%, al menos un 97,0%, al menos un 97,5%, al menos un 98,0%, al menos un 98,5%, al menos un 99,0% o al menos un 99,5%. No obstante, igualmente contemplado está el proceso donde el producto del proceso de la invención, el hidrolizado de almidón soluble, es un jarabe de especialidad, tal como un jarabe de especialidad con una mezcla de glucosa, maltosa, DP3 y DPn para su uso en la producción de helados, pasteles, caramelos, fruta enlatada.

[0049] El almidón granulado a procesar en los procesos de la invención puede ser obtenido en particular a partir de tubérculos, raíces, tallos, leguminosas, cereales o grano entero. Más específicamente el almidón granulado se puede obtener de granos, sémola de maíz, mazorcas, trigo, cebada, centeno, sorgo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, judías, plátano o patatas. Especialmente contemplados están ambos tipos cerosos y no cerosos de maíz y cebada. El almidón granulado a procesar puede ser de una calidad de almidón altamente refinado, preferiblemente con al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 97% o al menos un 99,5 % de pureza o puede ser un almidón más bruto conteniendo material que comprende grano molido entero incluyendo fracciones no amiláceas tales como residuos de germen y fibras. La materia prima, tal como grano entero, se muele para descubrir la estructura y permitir el proceso posterior. Dos procesos de molienda se prefieren según la invención: molienda húmeda y seca. En la molienda seca, la avellana entera es molida y usada. La molienda húmeda proporciona una buena separación de germen y harina

(gránulos de almidón y proteína) y es aplicada con algunas excepciones en lugares donde el hidrolizado de almidón se usa en la producción de jarabes. Ambas molindas seca y húmeda son bien conocidas en la técnica del tratamiento de almidón y son igualmente contempladas para los procesos de la invención. El proceso del primer aspecto de la invención se puede llevar a cabo en un sistema de ultrafiltración donde el concentrado se mantiene en recirculación en presencia de enzimas, almidón crudo y agua, y donde el permeado es el hidrolizado de almidón soluble. Igualmente contemplado es el proceso llevado a cabo en un reactor de membrana continuo con membranas de ultrafiltración y donde el concentrado se mantiene en recirculación en presencia de enzimas, almidón crudo y agua, y donde el permeado es el hidrolizado de almidón soluble. También se contempla el proceso llevado a cabo en un reactor de membrana continuo con membranas de microfiltración y donde el concentrado se mantiene en recirculación en presencia de enzimas, almidón crudo y agua, y donde el permeado es el hidrolizado de almidón soluble.

[0050] En el proceso del segundo aspecto de la invención, el hidrolizado de almidón soluble del proceso del primer aspecto de la invención se somete a una conversión en jarabe a base de almidón rico en fructosa (HFSS), tal como jarabe de maíz rico en fructosa (HFCS). Esta conversión se consigue preferiblemente usando una glucosa isomerasa, y más preferiblemente mediante una glucosa isomerasa inmovilizada soportada en un soporte sólido. Isomerasas contempladas comprenden los productos comerciales Sweetzyme™ IT de Novozymes A/S, G-zyme™ IMGI y G-zyme™ G993, Ketomax™ y G-zyme™ G993 de Rhodia, G-zyme™ G993 líquido y GenSweet™ IGI de Genencor Int.

[0051] En el proceso del tercer aspecto de la invención, el hidrolizado de almidón soluble del proceso del primer aspecto de la invención se usa para la producción de combustible o etanol potable. En el proceso del tercer aspecto, la fermentación se puede llevar a cabo de manera simultánea o separada/secuencial a la hidrólisis de la suspensión de almidón granulado. Cuando la fermentación se realiza de manera simultánea a la hidrólisis, la temperatura es preferiblemente de entre 30°C y 35°C, y más preferiblemente de entre 31°C y 34°C. El proceso del tercer aspecto de la invención se puede llevar a cabo en un sistema de ultrafiltración donde el concentrado se mantiene en recirculación en presencia de enzimas, almidón crudo, levadura, nutrientes de levadura y agua, y donde el permeado es un líquido que contiene etanol. Igualmente se contempla el proceso llevado a cabo en un reactor de membrana continuo con membranas de ultrafiltración y donde el concentrado se mantiene en recirculación en presencia de enzimas, almidón crudo, levadura, nutrientes de levadura y agua, y donde el permeado es un líquido que etanol.

[0052] El hidrolizado de almidón soluble del proceso del primer aspecto de la invención puede también ser usado para la producción de un producto de fermentación que comprende la fermentación del almidón tratado en un producto de fermentación, tal como ácido cítrico, glutamato monosódico, ácido glucónico, gluconato sódico, gluconato cálcico, gluconato potásico, glucono-delta-lactona, o eritorbato sódico.

[0053] En otra forma de realización la suspensión de almidón está en contacto con un polipéptido que comprende un CBM, pero ningún módulo amilolítico, es decir, aplicación de CBMs sueltos. Los CBMs sueltos puede ser módulos de unión a almidón, módulos de unión de celulosa, módulos de unión de quitina, módulos de unión de xilano, módulos de unión de manano, y otros módulos de unión. CBMs preferidos en el presente contexto son los CBMs microbianos, particularmente CBMs fúngicos o bacterianos. Particularmente preferidos son los módulos de unión a almidón mostrados en la presente divulgación como las secuencias de polipéptidos SEC ID NO:1, SEC ID NO:2, y SEC ID NO:3 o los módulos de unión a almidón descritos en solicitud provisional de patente estadounidense n°. 60/511044 como SEC ID NO:12; el CBM de la glucoamilasa de la especie de *Hormoconis* tal como de *Hormoconis resiniae* (Sin. *Creosote fungus* o *Amorphoteca resiniae*) (SWISSPROT:Q03045), SEC ID NO:13; el CBM de especies de *Lentinula* tal como de *Lentinula edodes* (hongo shiitake) (SPTREMBL:Q9P4C5), SEC ID NO:14 el CBM de especies de *Neurospora* tal como de *Neurospora crassa* (SWISSPROT:P14804), SEC ID NO:15; el CBM de especies de *Talaromyces* tal como de *Talaromyces byssochlamydioides*, SEC ID NO:16; el CBM de especies de *Geosmithia* tal como de *Geosmithia cylindrospora*, SEC ID NO:17; el CBM de especies de *Scorias* tal como de *Scorias spongiosa*, SEC ID NO:18; el CBM de especies de *Eupenicillium* tal como de *Eupenicillium ludwigii*, SEC ID NO:19; el CBM de especies de *Aspergillus* tal como de *Aspergillus japonicus*, SEC ID NO:20; el CBM de especies de *Penicillium* tal como de *Penicillium cf. miczynskii*, SEC ID NO:21; el CBM de especies de *Mz1 Penicillium*, SEC ID NO:22; el CBM de especies de *Thysanophora*, SEC ID NO:23; el CBM de especies de *Humicola* tal como de *Humicola grisea* var. *thermoidea*. Muchos CBMs preferidos incluyen los CBMs descritos en la solicitud provisional de patente estadounidense n°. 60/511044 como SEC ID NO:24; el CBM de la glucoamilasa de especies de *Aspergillus* tal como de *Aspergillus niger*, y como SEC ID NO:25; el CBM de la glucoamilasa de especies de *Athelia* tal como de *Athelia rolfsii*. También se prefiere para la invención la aplicación de cualquier CBM que tenga al menos un 50%, 60%, 70%, 80% o incluso al menos un 90% de homología con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de CBM mencionadas anteriormente.

[0054] Los CBMs sueltos se pueden aplicar a la suspensión de almidón granulado en cantidades eficaces.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Actividad de alfa-amilasa (KNU)

[0055] La actividad amilolítica se puede determinar usando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la

descomposición del almidón de patata modificado por la enzima, y la reacción es seguida de muestras de mezcla de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo. Inicialmente, se forma un color azul negrozco, pero durante la descomposición del almidón el color azul se debilita y gradualmente se convierte en un marrón rojizo, que es comparable a un estándar de vidrio coloreado.

5 [0056] Una unidad Kilo Novo (KNU) de alfa-amilasa es definida como la cantidad de enzima que, en condiciones estándar (es decir, a 37°C +/- 0,05; 0,0003 M Ca<sup>2+</sup>; y pH 5.6) dextriniza 5,26 g de sustancia seca del almidón Merck Amylum soluble.

[0057] Un prospecto AF 9/6 que describe este método analítico con más detalle está disponible previa solicitud a Novozymes A/S, Dinamarca, dicho prospecto se incluye en el presente documento mediante referencia .

10 Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0058] La unidad de glucoamilasa Novo (AGU) es definida como la cantidad de enzima que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto a 37°C y pH 4.3.

15 [0059] La actividad se determina como AGU/ml mediante un método modificado (AEL-SM-0131, disponible previa solicitud en Novozymes) después de usar un kit de diagnóstico glucosa GOD-Perid de Boehringer Mannheim, 124036. Estándar: estándar AMG, lote 7- 1195, 195 AGU/ml. 375 microL de sustrato (1% de maltosa en 50 mM de acetato sódico, pH 4.3) son incubados durante 5 minutos a 37°C. Se añaden 25 microL de enzima diluida en acetato sódico. Después de 10 minutos, la reacción se detiene añadiendo 100 microL 0,25 M de NaOH. 20 microL se transfieren a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se añaden 200 microL de solución GOD-Perid (124036, Boehringer Mannheim). Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la absorbencia se mide a 650 nm y la actividad se calcula en AGU/ml del estándar AMG. Un prospecto (AEL-SM-0131) que describe este método analítico en más detalle está disponible previa solicitud en Novozymes A/S, Dinamarca, dicho prospecto se incluye en el presente documento mediante referencia.

20

Actividad de alfa-amilasa fúngica (FAU)

25 [0060] La actividad de alfa-amilasa fúngica se puede medir en FAU (unidades de alfa-amilasa fúngica). Un (1) FAU es la cantidad de enzima que en condiciones estándar (es decir, a 37°C y pH 4.7) descompone 5260 mg de almidón sólido (almidón soluble, Merck) por hora. Un prospecto AF 9.1/3, que describe este ensayo FAU con más detalle está disponible previa solicitud en Novozymes A/S, Dinamarca, dicho prospecto se incluye en el presente documento mediante referencia.

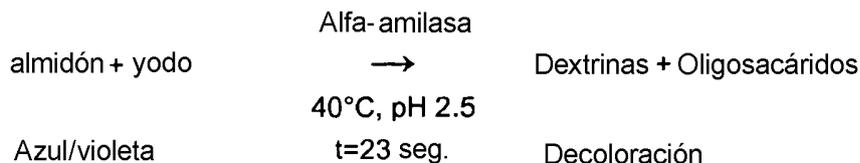
Actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)

30 [0061] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa ácida fúngica), que se determinan en relación a un estándar enzimático.

35 [0062] El estándar usado es AMG 300 L (de Novozymes A/S, glucoamilasa de *Aspergillus niger* G1 tipo salvaje, también descrito en Boel et al. (1984), EMBO J. 3 (5), págs. 1097-1102 y en WO92/00381). La alfa-amilasa neutra en esta AMG disminuye, después de su almacenamiento a temperatura ambiente durante 3 semanas, de aprox. 1 FAU/mL a menos de 0,05 FAU/mL.

[0063] La actividad de alfa-amilasa ácida en este estándar AMG se determina conforme a la siguiente descripción. En este método 1 AFAU se define como la cantidad de enzima que degrada 5,26 mg de sólidos secos de almidón por hora en condiciones estándar.

40 [0064] El yodo forma un complejo azul con almidón, pero no con sus productos de degradación. Por tanto, la intensidad del color es directamente proporcional a la concentración de almidón. La actividad de amilasa es determinada usando colorimetría inversa como reducción en la concentración de almidón en condiciones analíticas específicas.



Condiciones estándar/condiciones de reacción: (por minuto)

Sustrato:	Almidón, approx. 0,17 g/L
Tampón:	Citate, approx. 0,03 M
Yodo (I2):	0,03 g/L
CaCl2:	1,85 mM
pH:	2.50 - 0.05
Temperatura de incubación:	40°C
Tiempo de reacción:	23 seconds
Longitud de onda:	lambda=590nm
Concentración enzimática:	0.025 AFAU/mL
Intervalo de trabajo enzimático:	0,01-0,04 AFAU/mL

[0065] Si se prefiere información más detallada, ésta se puede encontrar en EB-SM-0259.02/01, disponible previa solicitud en Novozymes A/S, y que se incorpora por referencia.

#### Actividad de beta-amylase (DP°)

- 5 [0066] La actividad de SPEZYME® BBA 1500 se expresa en grados de potencia diastásica (DP°). Es la cantidad de enzima contenida en 0,1 ml de un 5% de solución de la preparación enzimática de muestra que producirá azúcares de reducción suficientes para reducir 5 ml de solución de Fehling cuando la muestra se incubaba con 100 ml de sustrato durante 1 hora a 20°C.

#### Actividad de pululanasa (nueva unidad de pululanasa Novo (NPUN))

- 10 [0067] La actividad de pululanasa se puede determinar en relación a un sustrato de pululano. El pululano es un polímero de D-glucosa lineal que consiste esencialmente en unidades maltotriosil unidas por enlaces alfa 1,6. Las endo-pululanasa hidrolizan el los enlaces alfa 1,6 aleatoriamente, liberando maltotriosa de liberación, 6<sup>3</sup>-alfa-maltotriosil-maltotriosa, 6<sup>3</sup>-alfa-(6<sup>3</sup>-alfa-maltotriosil-maltotriosyl)-maltotriosa.

- 15 [0068] Una nueva unidad de pululanasa Novo (NPUN) es una unidad de actividad de endo-pululanasa y se mide en relación a un estándar Promozyme D de Novozymes A/S. Condiciones estándar son 30 minutos de tiempo de reacción a 40°C y pH 4.5 y con 0,7% de pululano como sustrato. La cantidad de producto de degradación de sustrato rojo se mide espectrofotométricamente en 510 nm y es proporcional a la actividad de endo-pululanasa en la muestra. Un prospecto (EB-SM.0420.02/01) que describe este método analítico con más detalle está disponible previa solicitud en Novozymes A/S, Dinamarca, dicho prospecto se incluye en el presente documento mediante referencia.

- 20 [0069] En las condiciones estándar un NPUN es aproximadamente igual a la cantidad de enzima que libera carbohidrato reductor con una potencia reductora equivalente a 2,86 micromoles de glucosa por minuto.

#### Determinación del perfil de azúcar y sólidos secos solubilizados

- 25 [0070] La composición de azúcar de los hidrolizados de almidón fue determinada mediante HPLC y posteriormente se calculó el rendimiento de glucosa como DX. °BRIX, sólidos secos solubilizados (solubles) de hidrolizado de almidón fueron determinados mediante la medición del índice de refracción.

#### **Materiales**

- 30 [0071] Las siguientes actividades enzimáticas fueron usadas. Una alfa-amilasa bacteriana con un CBD con la secuencia representada en SEC ID NO:19 y la misma alfa-amilasa bacteriana, pero sin el módulo CBD (SEC ID NO:4). Una glucoamilasa derivada de *Aspergillus niger* con la secuencia de aminoácidos mostrada en WO00/04136 como SEC ID n°: 2 o una de las variantes descritas. Una alfa-amilasa ácida fúngica derivada de *Aspergillus niger*.

[0072] Almidón de trigo (S-5127) se obtuvo de Sigma-Aldrich.

#### **Ejemplo 1**

[0073] Este ejemplo ilustra la conversión de almidón granulado de trigo en glucosa usando una alfa-amilasa bacteriana

5 de cuatro módulos y una glucoamilasa y una amilasa ácida fúngica. Una suspensión con un 33% de sólidos secos (DS) de almidón granulado fue preparada añadiendo 247,5 g de almidón de trigo, mientras se agitaba, a 502,5 ml de agua. El pH fue ajustado con HCl a 4.5. La suspensión de almidón granulado fue distribuida en matraces de tapón azul de 100 ml con 75 g en cada matraz. Los matraces fueron incubados con agitación magnética en un baño maría a 60°C. A las cero horas las actividades enzimáticas mostradas en la tabla 1 fueron dosificadas a los matraces. Las muestras fueron retiradas después 24, 48, 72, y 96 horas.

Tabla 1. Los niveles de actividad enzimática usados.

<b>Alfa-amilasa bacteriana KNU/kg de DS</b>	<b>Glucoamilasa AGU/kg de DS</b>	<b>Alfa-amilasa ácida fúngica AFAU/kg de DS</b>
100,0	200	50

10 [0074] El total de sólidos secos de almidón fue determinado usando el siguiente método. El almidón fue completamente hidrolizado añadiendo una cantidad en exceso de alfa-amilasa (300 KNU/Kg de sólidos secos) y colocando la muestra en un baño de aceite a 95 °C durante 45 minutos. Posteriormente las muestras fueron enfriadas a 60°C y una cantidad en exceso de glucoamilasa (600 AGU/kg de DS) fue añadida seguida de una incubación durante 2 horas a 60°C.

15 [0075] Sólidos secos solubles en el hidrolizado de almidón fueron determinados mediante medición del índice de refracción en muestras después de filtrar a través de un filtro de 0,22 microM. El perfil de azúcar fue determinado mediante HPLC. La cantidad de glucosa fue calculada como DX. Los resultados se muestran en la tabla 2 y 3.

Tabla 2. Sólidos secos solubles como porcentaje de sustancia seca total a 100 KNU/kg de DS de dosificación de alfa-amilasa.

<b>KNU/kg de DS</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>	<b>96 horas</b>
100,0	92,5	96	97,3	99,2

20 Tabla 3. DX del hidrolizado soluble a 100 KNU/kg de DS de dosificación de alfa-amilasa.

<b>KNU/kg de DS</b>	<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>	<b>96 horas</b>
100,0	88,4	92,4	93,7	95,3

### Ejemplo 2

[0076] Este ejemplo ilustra la única conversión parcial de almidón granulado en glucosa usando una glucoamilasa y una alfa-amilasa ácida fúngica.

25 [0077] Matraces con un 33% de DS de almidón granulado fueron preparados e incubados como se describe en el ejemplo 1. A las cero horas las actividades enzimáticas mostradas en la tabla 4 fueron dosificadas a los matraces. Las muestras fueron retiradas después de 24, 48, 72, y 96 horas. Las muestras fueron analizadas como se describe en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 5 y 6.

30 Tabla 4. El nivel de actividad enzimática usado.

<b>Glucoamilasa e AGU/kg de DS</b>	<b>Alfa-amilasa ácida fúngica AFAU/kg de DS</b>
200	50

Tabla 5. Sólidos secos solubles como porcentaje de sustancia seca total.

<b>24 horas</b>	<b>48 horas</b>	<b>72 horas</b>	<b>96 horas</b>
28,5	36,3	41,6	45,7

35

Tabla 6. DX del hidrolizado soluble.

24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
27,7	34,9	39,2	42,2

5 **Ejemplo 3**

[0078] En el ejemplo 3 la conversión del almidón granulado de trigo en glucosa fue realizada usando una glucoamilasa (200 AGU/kg de DS), una amilasa ácida fúngica (50 AFAU/kg de DS) y la alfa-amilasa bacteriana de cuatro módulos intacta (SEC ID NO:19), también usada en el ejemplo 1 o la misma alfa-amilasa bacteriana de cuatro módulos, pero sin el módulo CBD (SEC ID NO:4) (100 KNU/kg de DS). Una suspensión con un 33% de sólidos secos (DS) de almidón granulado fue preparada e incubada como se describe en el ejemplo 1. Las muestras fueron retiradas después de 24, 46, 70, y 90 horas.

[0079] El total de sólidos secos de almidón fue determinado como se describe en el ejemplo 1. Sólidos secos solubles en el hidrolizado de almidón y el perfil de azúcar fueron determinados como se describe en el ejemplo 1. Los resultados se muestran en la tabla 7 y 8.

15 Tabla 7. Sólidos secos solubles como porcentaje de sustancia seca total. Enzimas: glucoamilasa, amilasa ácida fúngica y alfa-amilasa bacteriana con el módulo CBD (SEC ID NO:19) o sin el módulo CBD (SEC ID NO:4).

	24 horas	46 horas	70 horas	90 horas
Sin CBD	89,7	92,4	92,4	92,5
Con CBD	94,1	95,2	96,9	97,1

Tabla 8. DX del hidrolizado soluble: enzimas: glucoamilasa, amilasa ácida fúngica y alfa-amilasa bacteriana con el módulo CBD (SEC ID NO:19) o sin el módulo CBD (SEC ID NO:4).

	24 horas	46 horas	70 horas	90 horas
Sin CBD	85,9	88,7	89,0	89,0
Con CBD	89,9	93,3	93,0	93,2

20

LISTADO DE SECUENCIAS

[0080]

25 <110> Novozymes A/S

<120> Licuefacción fría con alfa-amilasa de cuatro-dominios

<130> 10473

30

<160> 22

<170> Versión de patentIn 3.2

<210> 1

<211> 102

<212> PRT

<213> Bacillus flavothermus

5

<400> 1

Ile Ser Thr Thr Ser Gln Ile Thr Phe Thr Val Asn Asn Ala Thr Thr  
 1 5 10 15

Val Trp Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn Ile Ser Gln Leu Gly  
 20 25 30

Asn Trp Asp Pro Val His Ala Val Gln Met Thr Pro Ser Ser Tyr Pro  
 35 40 45

Thr Trp Thr Val Thr Ile Pro Leu Leu Gln Gly Gln Asn Ile Gln Phe  
 50 55 60

Lys Phe Ile Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val Ile Trp Glu Asp Ile  
 65 70 75 80

Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ala Ala Ser Gly Ala Tyr Thr  
 85 90 95

Ala Ser Trp Asn Val Pro  
 100

<210> 2

<211> 99

10 <212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 2

Thr Ser Asn Val Thr Phe Thr Val Asn Asn Ala Thr Thr Val Tyr Gly  
 1 5 10 15

Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn Ile Pro Glu Leu Gly Asn Trp Asn  
 20 25 30

Ile Ala Asn Ala Ile Gln Met Thr Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Trp Lys  
 35 40 45

Thr Thr Val Ser Leu Pro Gln Gly Lys Ala Ile Glu Phe Lys Phe Ile  
 50 55 60

Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val Ile Trp Glu Asn Ile Ala Asn Arg  
 65 70 75 80

Thr Tyr Thr Val Pro Phe Ser Ser Thr Gly Ser Tyr Thr Ala Asn Trp  
 85 90 95

Asn Val Pro

<210> 3

<211> 102

5 <212> PRT

<213> Bacillus alcalifilico

<400> 3

Thr Ser Thr Thr Ser Gln Ile Thr Phe Thr Val Asn Asn Ala Thr Thr  
1 5 10 15

Val Trp Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn Ile Ser Gln Leu Gly  
20 25 30

Asn Trp Asp Pro Val Asn Ala Val Gln Met Thr Pro Ser Ser Tyr Pro  
35 40 45

Thr Trp Val Val Thr Val Pro Leu Pro Gln Ser Gln Asn Ile Gln Phe  
50 55 60

Lys Phe Ile Lys Lys Asp Gly Ser Gly Asn Val Ile Trp Glu Asn Ile  
65 70 75 80

Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ala Ala Ser Gly Ala Tyr Thr  
85 90 95

Ala Asn Trp Asn Val Pro  
100

<210> 4

<211> 484

<212> PRT

5 <213> Bacillus flavothermus

<400> 4

Gly Ser Val Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr  
1 5 10 15

Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Asn Ala Gln  
20 25 30

Ser Leu Ala Asn Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr  
35 40 45

Lys Gly Thr Ser Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr  
 50 55 60

Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly  
 65 70 75 80

Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Thr Ala Gly  
 85 90 95

Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala Asp  
 100 105 110

Gly Thr Glu Leu Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn  
 115 120 125

Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp  
 130 135 140

Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
 145 150 155 160

His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile  
 165 170 175

Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr  
 180 185 190

Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp  
 195 200 205

His Pro Glu Val Val Ser Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val  
 210 215 220

Thr Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile  
 225 230 235 240

Lys Tyr Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Thr Gln Thr  
 245 250 255

Gln Lys Pro Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Ile Ser  
 260 265 270

Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ser Met Ser Leu Phe  
 275 280 285

Asp Ala Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Ile Ala Ser Lys Ser Gly Gly  
 290 295 300

Tyr Phe Asp Met Arg Thr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln  
 305 310 315 320

Pro Thr Leu Ala Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly  
 325 330 335

Gln Ser Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr  
 340 345 350

Ala Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly  
 355 360 365

Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Ala Leu Lys Ser Lys  
 370 375 380

Leu Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln  
 385 390 400

His Asp Tyr Ile Asp Ser Ala Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly  
 405 410 415

Val Ala Glu Lys Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly  
 420 425 430

Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys  
 435 440 445

Thr Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn  
 450 455 460

Ala Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile  
 465 470 475 480

Trp Val Pro Lys

<210> 5

<211> 485

<212> PRT

5 <213> Bacillus sp

<400> 5

Ala Asn Thr Ala Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp  
 1 5 10 15

Asp Leu Pro Asn Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Lys Asn Glu Ala  
 20 25 30

Ser Ser Leu Ser Ala Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala  
 35 40 45

Tyr Lys Gly Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu  
 50 55 60

Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr





Gly Ser Val Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Asn Ala Gln  
 20 25 30  
 Ser Leu Ala Asn Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr  
 35 40 45  
 Lys Gly Thr Ser Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr  
 50 55 60  
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Thr Ala Gly  
 85 90 95

Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala Asp  
100 105 110

Gly Thr Glu Leu Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn  
115 120 125

Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp  
130 135 140

Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
145 150 155 160

His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile  
165 170 175

Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr  
180 185 190

Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp  
195 200 205

His Pro Glu Val Val Ser Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val  
210 215 220

Ile Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile  
225 230 235 240

Lys Tyr Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Leu Arg Thr Gln Thr  
245 250 255

Gln Lys Pro Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Ile Asn  
260 265 270

Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ser Met Ser Leu Phe  
275 280 285

Asp Ala Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Ile Ala Ser Lys Ser Gly Gly  
290 295 300

Tyr Phe Asp Met Arg Thr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Glu Gln  
305 310 315 320

Pro Thr Leu Ser Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly  
325 330 335

Gln Ser Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr  
340 345 350

Ala Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly  
355 360 365

Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Ala Leu Lys Ser Lys  
 370 375 380  
 Leu Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln  
 385 390 395 400  
 His Asp Tyr Ile Asp Asn Ala Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly  
 405 410 415  
 Val Ala Glu Lys Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly  
 420 425 430  
 Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys  
 435 440 445  
 Thr Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn  
 450 455 460  
 Ala Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile  
 465 470 475 480  
 Trp Val Pro Lys

<210> 7

<211> 517

<212> PRT

5 <213> Bacillus sp.:

<400> 7

Met Ser Leu Phe Lys Lys Ile Phe Pro Trp Ile Leu Ser Leu Leu Leu  
 1 5 10 15

Leu Phe Leu Phe Ile Ala Pro Phe Ser Ile Gln Thr Glu Lys Val Arg  
 20 25 30

Ala Gly Ser Val Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp  
 35 40 45

Tyr Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Asn Ala  
 50 55 60

Gln Ser Leu Ala Asn Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala  
 65 70 75 80

Tyr Lys Gly Thr Ser Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu  
 85 90 95

Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr  
 100 105 110

Gly Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Thr Ala  
 115 120 125

Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala  
 130 135 140

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

Asn Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe  
 165 170 175

Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp  
 180 185 190

Tyr His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg  
 195 200 205

Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp  
 210 215 220

Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met  
 225 230 235 240

Asp His Pro Glu Val Val Ser Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr  
 245 250 255

Val Thr Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His  
 260 265 270

Ile Lys Tyr Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Thr Gln  
 275 280 285

Thr Gln Lys Pro Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Ile  
 290 295 300

Ser Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ser Met Ser Leu  
 305 310 315 320

Phe Asp Ala Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Ile Ala Ser Lys Ser Gly  
 325 330 335

Gly Tyr Phe Asp Met Arg Thr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp  
 340 345 350

Gln Pro Thr Leu Ala Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro  
 355 360 365

Gly Gln Ser Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 370 375 380

Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr  
 385 390 395 400  
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Ala Leu Lys Ser  
 405 410 415  
 Lys Leu Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr  
 420 425 430  
 Gln His Asp Tyr Ile Asp Ser Ala Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
 435 440 445  
 Gly Val Ala Glu Lys Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp  
 450 455 460  
 Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly  
 465 470 475 480  
 Lys Thr Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile  
 485 490 495  
 Asn Ala Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
 500 505 510  
 Ile Trp Val Pro Lys  
 515

<210> 8

<211> 550

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Fuente desconocida

10 <400> 8

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

ES 2 366 952 T3

85 90 95

Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr  
100 105 110

Gly Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Thr Ala  
115 120 125

Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala  
130 135 140

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

Asn Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe  
165 170 175

Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp  
180 185 190

Tyr His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg  
195 200 205

Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp  
210 215 220

Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met  
225 230 235 240

Asp His Pro Glu Val Val Ser Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr  
245 250 255

Val Thr Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His  
260 265 270

Ile Lys Tyr Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Thr Gln  
275 280 285

Thr Gln Lys Pro Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Ile  
290 295 300

Asn Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ser Met Ser Leu  
305 310 315 320

Phe Asp Ala Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Ile Ala Ser Lys Ser Gly  
325 330 335

Gly Tyr Phe Asp Met Arg Thr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp  
340 345 350

Gln Pro Thr Leu Ser Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro



<220>

<223> fuente desconocida

5 <400> 9

Ala Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Asp Leu Pro  
1 5 10 15

Asn Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Lys Asn Glu Ala Thr Asn Leu  
20 25 30

Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys Gly  
 35 40 45  
 Thr Ser Gln Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu  
 50 55 60  
 Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys  
 65 70 75 80  
 Ala Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala Lys Ala Ala Gly Met Gln  
 85 90 95  
 Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Gly Thr  
 100 105 110  
 Glu Phe Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asn Arg Asn Gln Glu  
 115 120 125  
 Thr Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe Pro  
 130 135 140  
 Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His Phe  
 145 150 155 160  
 Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys  
 165 170 175  
 Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu Asn  
 180 185 190  
 Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Phe Ala Asp Leu Asp Met Asp His Pro  
 195 200 205  
 Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn Thr  
 210 215 220  
 Thr Asn Val Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Tyr  
 225 230 235 240  
 Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Thr Tyr Val Arg Asn Gln Thr Gly Lys  
 245 250 255  
 Asn Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Val Asn Lys Leu  
 260 265 270  
 His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ser Met Ser Leu Phe Asp Ala  
 275 280 285  
 Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Ile Ala Ser Lys Ser Ser Gly Tyr Phe  
 290 295 300

Asp Met Arg Tyr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro Ser  
 305 310 315 320  
 Leu Ala Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser  
 325 330 335  
 Leu Gln Ser Trp Val Glu Ala Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe  
 340 345 350  
 Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp Tyr  
 355 360 365  
 Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Gly Leu Lys Ser Lys Ile Asp  
 370 375 380  
 Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Asp  
 385 390 395 400  
 Tyr Ile Asp His Gln Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ile Asp  
 405 410 415  
 Ala Lys Pro Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly  
 420 425 430  
 Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Lys His Ala Gly Lys Val Phe  
 435 440 445  
 Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ala Asp  
 450 455 460  
 Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val ser Ile Trp Val  
 465 470 475 480

Ala Lys

<210> 10

<211> 482

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Fuente desconocida

<400> 10

Ala Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Asp Leu Pro  
1 5 10 15

Asn Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Lys Asn Glu Ala Thr Asn Leu  
20 25 30

Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys Gly





<400> 11

Ala Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Asp Leu Pro  
1 5 10 15

Asn Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Lys Asn Glu Ala Ser Ser Leu  
20 25 30

Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys Gly  
35 40 45

Thr Ser Gln Gly Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu  
 50 55 60

Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys  
 65 70 75 80

Thr Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Lys Ser Ala Gly Met Gln  
 85 90 95

Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ser Thr  
 100 105 110

Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asn Arg Asn Gln Glu  
 115 120 125

Thr Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe Pro  
 130 135 140

Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His Phe  
 145 150 155 160

Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys  
 165 170 175

Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu Asn  
 180 185 190

Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Phe Ala Asp Leu Asp Met Asp His Pro  
 195 200 205

Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Thr Trp Tyr Val Asn Thr  
 210 215 220

Thr Asn Val Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Tyr  
 225 230 235 240

Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Thr His Val Arg Ser Gln Thr Arg Lys  
 245 250 255

Asn Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Val Asn Lys Leu  
 260 265 270

His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Ser Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp Ala  
 275 280 285

Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Ser Gly Tyr Phe  
 290 295 300

Asp Met Arg Tyr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro Ser  
 305 310 315 320

Leu Ala Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser  
 325 330

Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe  
 340 345 350

Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp Tyr  
 355 360 365

Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Gly Leu Lys Ser Lys Ile Asp  
 370 375 380

Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Asp  
 385 390 395 400

Tyr Ile Asp His Gln Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ile Asp  
 405 410 415

Ser Lys Pro Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly  
 420 425 430

Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Lys His Ala Gly Lys Val Phe  
 435 440 445

Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ala Asp  
 450 455 460

Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Trp Val  
 465 470 475 480

Ala Lys

<210> 12

<211> 482

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> Fuente desconocida

10 <400> 12

Ala Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Asp Leu Pro  
1 5 10 15  
Asn Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Lys Asn Glu Ala Ser Ser Leu  
20 25 30  
Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys Gly  
35 40 45  
Thr Ser Gln Gly Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu



325 330 335  
 Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe  
 340 345 350  
 Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp Tyr  
 355 360 365  
 Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Gly Leu Lys Ser Lys Ile Asp  
 370 375 380  
 Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Asp  
 385 390 395 400  
 Tyr Ile Asp His Gln Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ile Asp  
 405 410 415  
 Ser Lys Pro Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly  
 420 425 430  
 Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Lys His Ala Gly Lys Val Phe  
 435 440 445  
 Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ala Asp  
 450 455 460  
 Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Trp Val  
 465 470 475 480

Ala Lys

<210> 13

<211> 483

<212> PRT

5 <213> Bacillus licheniformis

<400> 13

Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro  
 1 5 10 15

Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu  
 20 25 30

Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly  
 35 40 45

Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu  
 50 55 60

Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys  
 65 70 75 80



Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly  
 355 360 365

Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile  
 370 375 380

Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His  
 385 390 395 400

Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp  
 405 410 415

Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro  
 420 425 430

Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr  
 435 440 445

Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser  
 450 455 460

Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr  
 465 470 475 480

Val Gln Arg

<210> 14

<211> 483

<212> PRT

5 <213> Bacillus amyloliquefaciens

<400> 14

Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp  
 20 25 30  
 Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Leu Ser  
 35 40 45  
 Gln Ser Asp Asn Gly Tyr Gly Pro Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu  
 50 55 60  
 Phe Gln Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Ser Glu  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Asp Ala Ile Gly Ser Leu His Ser Arg Asn Val Gln Val Tyr  
 85 90 95

Gly Asp Val Val Leu Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp  
 100 105 110  
 Val Thr Ala Val Glu Val Asn Pro Ala Asn Arg Asn Gln Glu Thr Ser  
 115 120 125  
 Glu Glu Tyr Gln Ile Lys Ala Trp Thr Asp Phe Arg Phe Pro Gly Arg  
 130 135 140  
 Gly Asn Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe Asp Gly  
 145 150 155 160  
 Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg Ile Phe Lys Phe Arg  
 165 170 175  
 Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Ser Glu Asn Gly Asn  
 180 185 190  
 Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr Asp His Pro Asp Val  
 195 200 205  
 Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Ser  
 210 215 220  
 Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe Ser Phe  
 225 230 235 240  
 Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met  
 245 250 255  
 Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn Ala Gly Lys Leu Glu Asn  
 260 265 270  
 Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser Val Phe Asp Val Pro Leu  
 275 280 285  
 His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met  
 290 295 300  
 Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser Arg His Pro Glu Lys Ala  
 305 310 315 320  
 Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu  
 325 330 335  
 Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu  
 340 345 350  
 Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly  
 355 360 365

Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp Asn Ile  
 370 375 380  
 Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro Gln His  
 385 390 395 400  
 Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp  
 405 410 415  
 Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro  
 420 425  
 Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys Asn Ala Gly Glu Thr  
 435 440 445  
 Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Lys Ile Gly Ser  
 450 455 460  
 Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp Gly Ser Val Ser Ile Tyr  
 465 470 475 480

Val Gln Lys

<210> 15

<211> 483

<212> PRT

5 <213> Bacillus stearothermophilus

<400> 15

Ala Ala Pro Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Leu  
 1 5 10 15

Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala Asn Asn  
 20 25 30

Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys  
 35 40 45

Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr Asp  
 50 55 60

Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr  
 65 70 75 80

Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met  
 85 90 95

Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala Asp Gly  
 100 105 110

ES 2 366 952 T3

Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn Gln  
 115 120 125  
 Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe  
 130 135 140  
 Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His  
 145 150 155 160  
 Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr  
 165 170 175  
 Lys Phe Arg Gly Ile Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu  
 180 185 190  
 Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His  
 195 200 205  
 Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn  
 210 215 220  
 Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys  
 225 230 235 240  
 Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Ser Gln Thr Gly  
 245 250 255  
 Lys Pro Leu Phe Thr Val Gly Glu Tyr Trp Ser Tyr Asp Ile Asn Lys  
 260 265 270  
 Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Thr Met Ser Leu Phe Asp  
 275 280 285  
 Ala Pro Leu His Asn Lys Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Gly Gly Ala  
 290 295 300  
 Phe Asp Met Arg Thr Leu Met Thr Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro  
 305 310 315 320  
 Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln  
 325 330 335  
 Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala  
 340 345 350  
 Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp  
 355 360 365  
 Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile  
 370 375 380

Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His  
 385 390 395 400

Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Val  
 405 410 415

Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro  
 420 425 430

Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val  
 435 440 445

Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser  
 450 455 460

Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp  
 465 470 475 480

Val Pro Arg

<210> 16

<211> 485

<212> PRT

5 <213> desconocido

<220>

<223> fuente desconocida

10 <400> 16

His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser  
 20 25 30  
 Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Ser Ala Val Trp Ile Pro Ala Trp  
 35 40 45  
 Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr  
 50 55 60  
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Asn Ala Leu Lys Ser Asn Gly  
 85 90 95  
 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp  
 100 105 110  
 Ala Thr Glu Met Val Arg Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn  
 115 120 125

Gln Glu Val Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp  
 130 135 140

Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
 145 150 155

His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Lys Leu Asn Asn Arg  
 165 170 175

Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Asp Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp  
 180 185 190

Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met  
 195 200 205

Asp His Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr  
 210 215 220

Thr Asn Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His  
 225 230 235

Ile Lys Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala  
 245 250 255

Thr Gly Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu  
 260 265 270

Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val  
 275 280 285

Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly  
 290 295 300

Gly Asn Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg  
 305 310 315 320

His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro  
 325 330 335

Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 340 345 350

Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr  
 355 360 365

Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser  
 370 375 380

Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Arg  
 385 390 395 400

Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
 405 410 415

Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp  
 420 425 430

Gly Ala Gly Gly Asn Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly  
 435 440 445

Gln Val Trp Thr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ala Gly Thr Val Thr Ile  
 450 455 460

Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
 465 470 475 480

Ile Trp Val Asn Lys  
 485

<210> 17

<211> 484

<212> PRT

5 <213> Desconocido

<220>

<223> fuente desconocida

10 <400> 17

Gly Ser Val Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Asn Ala Gln  
 20 25 30  
 Ser Leu Ala Asn Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr  
 35 40 45  
 Lys Gly Thr Ser Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr  
 50 55 60  
 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Thr Ala Gly  
 85 90 95  
 Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala Asp  
 100 105 110  
 Gly Thr Glu Leu Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn  
 115 120 125

Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp  
 130 135 140  
 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr  
 145 150 155 160  
 His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile  
 165 170 175  
 Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr  
 180 185 190  
 Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp  
 195 200 205  
 His Pro Glu Val Val Ser Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val  
 210 215  
 Thr Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile  
 225 230 235 240  
 Lys Tyr Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Thr Gln Thr  
 245 250 255  
 Gln Lys Pro Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Ile Asn  
 260 265  
 Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ser Met Ser Leu Phe  
 275 280 285  
 Asp Ala Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Ile Ala Ser Lys Ser Gly Gly  
 290 295 300  
 Tyr Phe Asp Met Arg Thr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln  
 305 310 315 320  
 Pro Thr Leu Ser Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly  
 325 330 335  
 Gln Ser Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr  
 340 345 350  
 Ala Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Ile Phe Tyr Gly  
 355 360 365  
 Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Ala Leu Lys Ser Lys  
 370 375 380  
 Leu Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln  
 385 390 395 400

His Asp Tyr Ile Asp Asn Ala Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly  
 405 410 415

Val Ala Glu Lys Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly  
 420 425 430

Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys  
 435 440 445

Thr Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn  
 450 455 460

Ala Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile  
 465 470 475 480

Trp Val Pro Lys

<210> 18

<211> 485

<212> PRT

5 <213> desconocido

<220>

<223> fuente desconocida

10 <400> 18

Ala Asn Thr Ala Pro Ile Asn Glu Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp  
 1 5 10 15

Asp Leu Pro Asn Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Lys Asn Glu Ala  
 20 25 30

Ala Asn Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala  
 35 40 45

Tyr Lys Gly Thr Ser Gln Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu  
 50 55 60

Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr  
 65 70 75 80

Gly Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala Lys Ala Ala  
 85 90 95

Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala  
 100 105 110

Asp Gly Thr Glu Phe Val Asp Ala Val Glu Val Asp Pro Ser Asn Arg  
 115 120 125

Asn Gln Glu Thr Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe  
 130 135 140

Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg  
 165 170 175  
 Ile Tyr Lys Phe Arg Ser Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp  
 180 185 190  
 Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Phe Ala Asp Leu Asp Met  
 195 200 205  
 Asp His Pro Glu Val Val Thr Glu Leu Lys Asn Trp Gly Thr Trp Tyr  
 210 215 220  
 Val Asn Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His  
 225 230 235 240  
 Ile Lys Tyr Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Thr Tyr Val Arg Asn Gln  
 245 250 255  
 Thr Gly Lys Asn Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Val  
 260 265 270  
 Asn Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ser Met Ser Leu  
 275 280 285  
 Phe Asp Ala Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Thr Ala Ser Lys Ser Ser  
 290 295 300  
 Gly Tyr Phe Asp Met Arg Tyr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp  
 305 310 315 320  
 Gln Pro Ser Leu Ala Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro  
 325 330 335  
 Gly Gln Ser Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 340 345 350  
 Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr  
 355 360 365  
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Gly Leu Lys Ser  
 370 375 380  
 Lys Ile Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr  
 385 390 395 400  
 Gln Arg Asp Tyr Ile Asp His Gln Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
 405 410 415

Gly Ile Asp Thr Lys Pro Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp  
 420 425 430

Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Lys His Ala Gly  
 435 440 445

Lys Val Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile  
 450 455 460

Asn Ala Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
 465 470 475 480

Ile Trp Val Ala Lys  
 485

<210> 19

<211> 619

<212> PRT

5 <213> Bacillus flavothermus

<400> 19

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

Asn Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe  
 165 170 175  
 Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp  
 180 185 190  
 Tyr His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg  
 195 200 205  
 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp  
 210 215 220  
 Thr Glu Asn Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met  
 225 230 235 240  
 Asp His Pro Glu Val Val Ser Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr  
 245 250 255  
 Val Thr Thr Thr Asn Ile Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His  
 260 265 270  
 Ile Lys Tyr Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Thr Gln  
 275 280 285  
 Thr Gln Lys Pro Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Ser Tyr Asp Ile  
 290 295 300  
 Ser Lys Leu His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ser Met Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Phe Asp Ala Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Ile Ala Ser Lys Ser Gly  
 325 330 335  
 Gly Tyr Phe Asp Met Arg Thr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp  
 340 345 350  
 Gln Pro Thr Leu Ala Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro  
 355 360 365  
 Gly Gln Ser Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala  
 370 375 380  
 Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr  
 385 390 395 400  
 Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Ala Leu Lys Ser  
 405 410 415  
 Lys Leu Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr  
 420 425 430

Gln His Asp Tyr Ile Asp Ser Ala Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu  
 435 440 445

Gly Val Ala Glu Lys Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp  
 450 455 460

Gly Pro Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly  
 465 470 475 480

Lys Thr Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile  
 485 490 495

Asn Ala Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser  
 500 505 510

Ile Trp Val Pro Lys Ile Ser Thr Thr Ser Gln Ile Thr Phe Thr Val  
 515 520 525

Asn Asn Ala Thr Thr Val Trp Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn  
 530 535 540

Ile Ser Gln Leu Gly Asn Trp Asp Pro Val His Ala Val Gln Met Thr  
 545 550 555 560

Pro Ser Ser Tyr Pro Thr Trp Thr Val Thr Ile Pro Leu Leu Gln Gly  
 565 570 575

Gln Asn Ile Gln Phe Lys Phe Ile Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val  
 580 585 590

Ile Trp Glu Asp Ile Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ala Ala  
 595 600 605

Ser Gly Ala Tyr Thr Ala Ser Trp Asn Val Pro  
 610 615

<210> 20

<211> 613

<212> PRT

5 <213> Bacillus

<400> 20

Met Ser Tyr Leu Lys Lys Val Trp Leu Tyr Tyr Thr Ile Ile Ala Thr  
1 5 10 15

Leu Ile Ile Ser Phe Phe Thr Pro Phe Ser Thr Ala Gln Ala Asn Thr  
20 25 30

Ala Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Asp Leu Pro  
35 40 45

Asn Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Lys Asn Glu Ala Ser Ser Leu  
 50 55 60

Ser Ala Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr Lys Gly  
 65 70 75 80

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

Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys  
 100 105 110

Thr Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala Lys Ser Ala Gly Met Gln  
 115 120 125

Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala Asp Ser Thr  
 130 135 140

Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asn Arg Asn Gln Glu  
 145 150 155 160

Thr Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp Phe Pro  
 165 170 175

Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr His Phe  
 180 185 190

Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys  
 195 200 205

Phe Arg Gly Thr Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu Asn  
 210 215 220

Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Phe Ala Asp Leu Asp Met Asp His Pro  
 225 230 235 240

Glu Val Val Ala Glu Leu Lys Asn Trp Gly Lys Trp Tyr Val Asn Thr  
 245 250 255

Thr Asn Val Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Tyr  
 260 265 270

Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Tyr Val Arg Asn Gln Thr Gly Lys  
 275 280 285

Asn Leu Phe Ala Val Gly Glu Phe Trp Gly Tyr Asp Val Asn Lys Leu  
 290 295 300

His Asn Tyr Ile Thr Lys Thr Asn Gly Ala Met Ser Leu Phe Asp Ala  
 305 310 315 320

Pro Leu His Asn Asn Phe Tyr Ile Ala Ser Lys Ser Ser Gly Tyr Phe  
 325 330 335  
 Asp Met Arg Tyr Leu Leu Asn Asn Thr Leu Met Lys Asp Gln Pro Ala  
 340 345 350  
 Leu Ala Val Thr Leu Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser  
 355 360 365  
 Leu Gln Ser Trp Val Glu Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe  
 370 375 380  
 Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp Tyr  
 385 390 395 400  
 Tyr Gly Ile Pro Lys Tyr Asn Ile Pro Gly Leu Lys Ser Lys Ile Asp  
 405 410 415  
 Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln Arg Asp  
 420 425 430  
 Tyr Ile Asp His Gln Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Ile Asp  
 435 440 445  
 Ala Lys Pro Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly  
 450 455 460  
 Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Arg His Ala Gly Lys Val Phe  
 465 470 475 480  
 Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ala Asp  
 485 490 495  
 Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Trp Val  
 500 505 510  
 Ala Lys Thr Ser Asn Val Thr Phe Thr Val Asn Asn Ala Thr Thr Val  
 515 520 525  
 Tyr Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn Ile Pro Glu Leu Gly Asn  
 530 535 540  
 Trp Asn Ile Ala Asn Ala Ile Gln Met Thr Pro Ser Ser Tyr Pro Thr  
 545 550 555 560  
 Trp Lys Thr Thr Val Ser Leu Pro Gln Gly Lys Ala Ile Glu Phe Lys  
 565 570 575  
 Phe Ile Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val Ile Trp Glu Asn Ile Ala  
 580 585 590

Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Phe Ser Ser Thr Gly Ser Tyr Thr Ala  
595 600 605

Asn Trp Asn Val Pro  
610

<210> 21

<211> 619

<212> PRT

5 <213> Bacillus alcalifilico

<400> 21

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





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

Lys Leu Ala Leu Gly Leu Ser Ala Ala Glu Trp Arg Thr Gln Ser Ile  
 20 25 30

Tyr Phe Leu Leu Thr Asp Arg Phe Gly Arg Thr Asp Asn Ser Thr Thr  
 35 40 45

Ala Thr Cys Asn Thr Gly Asp Gln Ile Tyr Cys Gly Gly Ser Trp Gln  
 50 55 60

Gly Ile Ile Asn His Leu Asp Tyr Ile Gln Gly Met Gly Phe Thr Ala  
 65 70 75 80

Ile Trp Ile Ser Pro Ile Thr Glu Gln Leu Pro Gln Asp Thr Ser Asp  
 85 90 95

Gly Glu Ala Tyr His Gly Tyr Trp Gln Gln Lys Ile Tyr Tyr Val Asn  
 100 105 110

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

His Ala Arg Gly Met Tyr Leu Met Val Asp Val Val Pro Asn His Met  
 130 135 140

Gly Tyr Ala Gly Asn Gly Asn Asp Val Asp Tyr Ser Val Phe Asp Pro  
 145 150 155 160

Phe Asp Ser Ser Ser Tyr Phe His Pro Tyr Cys Leu Ile Thr Asp Trp  
 165 170 175

Asp Asn Leu Thr Met Val Gln Asp Cys Trp Glu Gly Asp Thr Ile Val  
 180 185 190

Ser Leu Pro Asp Leu Asn Thr Thr Glu Thr Ala Val Arg Thr Ile Trp  
 195 200 205

Tyr Asp Trp Val Ala Asp Leu Val Ser Asn Tyr Ser Val Asp Gly Leu  
 210 215 220

Arg Ile Asp Ser Val Glu Glu Val Glu Pro Asp Phe Phe Pro Gly Tyr  
 225 230 235 240

Gln Glu Ala Ala Gly Val Tyr Cys Val Gly Glu Val Asp Asn Gly Asn  
 245 250 255

Pro Ala Leu Asp Cys Pro Tyr Gln Lys Tyr Leu Asp Gly Val Leu Asn  
 260 265 270

Tyr Pro Ile Tyr Trp Gln Leu Leu Tyr Ala Phe Glu Ser Ser Ser Gly  
 275 280 285

Ser Ile Ser Asn Leu Tyr Asn Met Ile Lys Ser Val Ala Ser Asp Cys  
 290 295 300

Ser Asp Pro Thr Leu Leu Gly Asn Phe Ile Glu Asn His Asp Asn Pro  
 305 310 315 320

Arg Phe Ala Ser Tyr Thr Ser Asp Tyr Ser Gln Ala Lys Asn Val Leu  
 325 330 335

Ser Tyr Ile Phe Leu Ser Asp Gly Ile Pro Ile Val Tyr Ala Gly Glu  
 340 345 350

Glu Gln His Tyr Ser Gly Gly Asp Val Pro Tyr Asn Arg Glu Ala Thr  
 355 360 365

Trp Leu Ser Gly Tyr Asp Thr Ser Ala Glu Leu Tyr Thr Trp Ile Ala  
 370 375 380

Thr Thr Asn Ala Ile Arg Lys Leu Ala Ile Ser Ala Asp Ser Asp Tyr  
 385 390 395 400  
 Ile Thr Tyr Lys Asn Asp Pro Ile Tyr Thr Asp Ser Asn Thr Ile Ala  
 405 410 415  
 Met Arg Lys Gly Thr Ser Gly Ser Gln Ile Ile Thr Val Leu Ser Asn  
 420 425 430  
 Lys Gly Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Thr Leu Thr Leu Ser Gly Ser Gly  
 435 440 445  
 Tyr Thr Ser Gly Thr Lys Leu Ile Glu Ala Tyr Thr Cys Thr Ser Val  
 450 455 460  
 Thr Val Asp Ser Asn Gly Asp Ile Pro Val Pro Met Ala Ser Gly Leu  
 465 470 475 480  
 Pro Arg Val Leu Leu Pro Ala Ser Val Val Asp Ser Ser Ser Leu Cys  
 485 490  
 Gly Gly Ser Gly Asn Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Ser Thr  
 500 505  
 Ser Lys Ala Thr Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ala Ala Ala Thr Thr  
 515 520 525  
 Ser Ser Ser Cys Thr Ala Thr Ser Thr Thr Leu Pro Ile Thr Phe Glu  
 530 535 540  
 Glu Leu Val Thr Thr Thr Tyr Gly Glu Glu Val Tyr Leu Ser Gly Ser  
 545 550 555 560  
 Ile Ser Gln Leu Gly Glu Trp His Thr Ser Asp Ala Val Lys Leu Ser  
 565 570 575  
 Ala Asp Asp Tyr Thr Ser Ser Asn Pro Glu Trp Ser Val Thr Val Ser  
 580 585 590  
 Leu Pro Val Gly Thr Thr Phe Glu Tyr Lys Phe Ile Lys Val Asp Glu  
 595 600 605  
 Gly Gly Ser Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val  
 610 615 620  
 Pro Glu Cys Gly Ser Gly Ser Gly Glu Thr Val Val Asp Thr Trp Arg  
 625 630 635 640

## REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir un hidrolizado de almidón soluble, comprendiendo el proceso el hecho de someter una suspensión acuosa de almidón granulado a una temperatura por debajo de la temperatura inicial de gelatinización de dicho almidón granulado a la acción de una primera enzima y una segunda enzima, dicha primera enzima:
  - 5 (a) es un elemento de la familia 13 de glicosido hidrolasas;
  - (b) tiene actividad de hidrólisis de alfa-1.4-glucosídico, y;
  - (c) comprende un módulo de unión a carbohidratos (CBM) funcional de la familia 20 de CBM, dicho CBM tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos con al menos un 60% de homología con la SEC ID NO:1, una secuencia de aminoácidos con al menos un 75% de homología con la SEC ID NO:2, y una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de homología con la SEC ID NO:3;

y dicha segunda enzima se selecciona de la lista que comprende una alfa-amilasa fúngica (EC 3.2.1.1), una beta-amilasa (E.C. 3.2.1.2), y una glucoamilasa (E.C.3.2.1.3).
- 15 2. Proceso según la reivindicación 1, donde la primera enzima comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 75% de homología con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, SEC ID NO:6, SEC ID NO: 7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:9, SEC ID NO:10, SEC ID NO:11, SEC ID NO:12, SEC ID NO:13, SEC ID NO:14, SEC ID NO:15, SEC ID NO:16, SEC ID NO:17, y SEC ID NO:18.
- 20 3. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la primera enzima comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 75% de homología con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO:19, SEC ID NO:20, SEC ID NO:21 y SEC ID NO:22.
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la suspensión de almidón tiene un 20-55% de sólidos secos de almidón granulado.
5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde al menos un 85% de los sólidos secos del almidón granulado se convierten en un hidrolizado de almidón soluble.
- 25 6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, comprendiendo el hecho de someter la suspensión de almidón granulado a la acción de una isoamilasa y/o una pululanasa.
7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la temperatura es de al menos 58°C.
8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el pH se encuentra en el intervalo de 3.0 a 7.0.
- 30 9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el porcentaje de glucosa del total de sólidos secos solubilizados del hidrolizado de almidón soluble es al menos un 94,5%.
10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el almidón granulado se obtiene de tubérculos, raíces, tallos, o grano entero.
- 35 11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el almidón granulado se obtiene a partir de cereales.
12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el almidón granulado se obtiene a partir de maíz, mazorcas, trigo, cebada, centeno, mijo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz o patatas.
13. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el almidón granulado se obtiene a partir de la molienda en seco de grano entero o a partir de la molienda húmeda de grano entero o a partir de sémola de maíz molida.
- 40 14. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el proceso se lleva a cabo en un sistema de ultrafiltración y donde el concentrado se mantiene en recirculación en presencia de enzimas, almidón crudo y agua y donde el permeado es el hidrolizado de almidón soluble.
- 45 15. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el proceso se lleva a cabo en un reactor de membrana continuo con membranas de ultrafiltración y donde el concentrado se mantiene en recirculación en presencia de enzimas, almidón crudo y agua y donde el permeado es el hidrolizado de almidón soluble.
16. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el proceso se lleva a cabo en un reactor de membrana continuo con membranas de microfiltración y donde el concentrado se mantiene en recirculación en presencia de enzimas, almidón crudo y agua y donde el permeado es el hidrolizado de almidón soluble.

17. Proceso para la producción de jarabe a base de almidón rico en fructosa (HFSS), incluyendo el proceso los pasos de:
- 5 a) someter una suspensión acuosa de almidón granulado a una temperatura por debajo de la temperatura inicial de gelatinización de dicho almidón granulado a la acción de una primera enzima y una segunda enzima, dicha primera enzima:
- (i) es un elemento de la familia 13 de glicósido hidrolasas;
- (ii) tiene actividad de hidrólisis alfa-1.4-glucosídico, y;
- 10 (iii) comprende un módulo de unión a carbohidratos (CBM) funcional de la familia 20 de CBM, dicho CBM tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos con al menos un 60% de homología con la SEC ID NO:1, una secuencia de aminoácidos con al menos un 75% de homología con la SEC ID NO:2, y una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de homología con la SEC ID NO:3;
- y dicha segunda enzima se selecciona de la lista que comprende una alfa-amilasa fúngica (EC 3.2.1.1), una beta-amilasa (E.C. 3.2.1.2), y una glucoamilasa (E.C.3.2.1.3),
- 15 para producir un hidrolizado de almidón soluble,
- b) someter dicho hidrolizado de almidón soluble a una conversión en jarabe de maíz rico en fructosa (HFCS).
18. Proceso para la producción de un producto de fermentación, incluyendo el proceso los pasos de:
- 20 a) someter una suspensión acuosa de almidón granulado a una temperatura por debajo de la temperatura inicial de gelatinización de dicho almidón granulado a la acción de una primera enzima y una segunda enzima, dicha primera enzima:
- (i) es un elemento de la familia 13 de glicósido hidrolasas;
- (ii) tiene actividad de hidrólisis de alfa-1.4-glucosídico, y;
- 25 (iii) comprende un módulo de unión a carbohidratos (CBM) funcional de la familia 20 de CBM, dicho CBM tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en una secuencia de aminoácidos con al menos un 60% de homología con la SEC ID NO:1, una secuencia de aminoácidos con al menos un 75% de homología con la SEC ID NO:2, y una secuencia de aminoácidos con al menos un 90% de homología con la SEC ID NO:3;
- y dicha segunda enzima se selecciona de la lista que comprende una alfa-amilasa fúngica (EC 3.2.1.1), una beta-amilasa (E.C. 3.2.1.2), y una glucoamilasa (E.C.3.2.1.3),
- 30 para producir un hidrolizado de almidón soluble,
- b) someter dicho hidrolizado de almidón soluble a fermentación en un producto de fermentación.
19. Proceso según la reivindicación 18 donde el producto de fermentación es etanol.
- 35 20. Proceso según cualquiera de reivindicaciones 18 ó 19, donde el paso de fermentación se realiza de manera simultánea o separada/secuencial a la hidrólisis del almidón granulado.