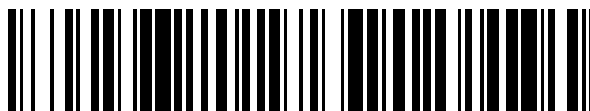


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 711**

51 Int. Cl.:

C12C 5/00 (2006.01)

C12C 7/00 (2006.01)

C12C 11/00 (2006.01)

C12N 9/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2007 E 07869143 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2222830**

54 Título: **Proceso de maceración**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.11.2015

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (50.0%)

Krogshøjvej 36

2880 Bagsværd, DK y

NOVOZYMES INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

ELVIG, NIELS;

JOERGENSEN, PER LINAA y

THOMAS, MICHAEL

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 551 711 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 maceración

5 Referencia a un listado de secuencias

[0001] Esta solicitud contiene un listado de secuencias en la forma legible informática. La forma legible informática es incorporada aquí por referencia.

10 Campo de la invención

[0002] La presente invención se refiere a un proceso de maceración mejorado para la producción de un mosto de cerveza y para la producción de una cerveza.

15 Antecedentes de la invención

[0003] En los procesos de maceración modernos, frecuentemente se añaden enzimas como suplemento cuando la malta de maceración es baja en enzimas o para permitir el uso de todas las moliendas de adjuntos. También se pueden aplicar enzimas en la maceración de maltas bien modificadas con alto contenido enzimático para aumentar la recuperación de extracto al igual que la cantidad de azúcares fermentables. Por consiguiente es bien conocido aplicar enzimas desramificantes, por ejemplo, isoamilasa o pululanasa para aumentar el rendimiento de azúcares fermentables. Las enzimas desramificantes se pueden aplicar en procesos para la producción de cerveza baja en calorías. Tales procesos son el objeto de Willox et al. (MBA Technical Quarterly, 1977, 14: 105), patentes estadounidenses números 4,528,198, 4,666,718, y 4,318,927, y GB 2056484 y GB 2069527, y US 4,355,047.

25 Resumen de la invención

[0004] Los presentes inventores han descubierto ahora sorprendentemente que usando una determinada pululanasa, la maceración se puede conseguir utilizando una cantidad menor de proteína enzimática.

[0005] Por consiguiente, en un primer aspecto la invención proporciona un proceso para producir un mosto de cerveza que comprende formar un macerado a partir de una molienda, y poner en contacto dicho macerado con una pululanasa (E.C. 3.2.1.41), donde dicha pululanasa tiene una secuencia de aminoácidos que a) es al menos un 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n° 4.

[0006] En otro aspecto, la invención proporciona una composición adecuada para su uso en el proceso del primer aspecto, dicha composición comprende pululanasa (E.C. 3.2.1.41), glucoamilasa y opcionalmente alfa-amilasa, donde la pululanasa tiene una secuencia de aminoácidos que a) es al menos un 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID n° 4.

40 Descripción detallada de la invención

[0007] Los procesos de elaboración de cerveza son bien conocidos en la técnica, y generalmente comprenden los pasos de malteado, maceración, y fermentación. La maceración es el proceso de conversión del almidón a partir de la malta de cebada molida y adjuntos sólidos en azúcares fermentables y no fermentables para producir mosto de la composición deseada. La maceración tradicional implica la mezcla de malta de cebada molida y adjuntos con agua a una temperatura y volumen establecidos para continuar los cambios bioquímicos iniciados durante el proceso de malteado. El proceso de maceración se lleva a cabo durante un periodo de tiempo a varias temperaturas para activar las enzimas endógenas responsables de la degradación de proteínas y carbohidratos. Por mucho, el cambio más importante causado en la maceración es la conversión de moléculas de almidón en azúcares fermentables. Las enzimas principales responsables de la conversión de almidón en un proceso de maceración tradicional son las alfa y beta-amilasas. La alfa-amilasa reduce muy rápidamente el almidón insoluble y soluble escindiendo moléculas de almidón en cadenas mucho más cortas que pueden ser atacadas por la beta-amilasa. El disacárido producido es maltosa. Además de la maltosa formada durante la maceración se producen oligómeros de glucosa ramificada corta. Los oligómeros de glucosa ramificada corta son azúcares no fermentables y contribuyen tanto al sabor como a la cantidad de calorías de la cerveza final.

[0008] Después de la maceración, cuando todo el almidón ha sido descompuesto, es necesario separar el extracto líquido (el mosto) de los sólidos (granos consumidos). La separación del mosto, la filtración, es importante debido a que los sólidos contienen grandes cantidades de proteína, almidón pobremente modificado, material graso, silicatos, y polifenoles (taninos). Tras la separación del mosto de los granos consumidos el mosto se puede fermentar con levadura de cerveza para producir una cerveza.

[0009] Se puede encontrar más información sobre los procesos de elaboración de cerveza convencionales en "Technology Brewing and Malting" por Wolfgang Kunze del Research and Teaching Institute of Brewing, Berlín (VLB), 2ª edición corregida 1999, ISBN 3-921690-39-0.

[0010] Los oligómeros de glucosa ramificada corta formados durante la maceración pueden ser además hidrolizados mediante la adición de enzimas exógenas (enzimas añadidas además de la malta). Las enzimas desramificantes tales como pululanasa e isoamilasa hidrolizan la ramificación de enlaces alfa-1,6-glucosídicos en estos oligómeros, liberando así glucosa o maltosa y oligómeros de cadena lineal que están sujetos a la acción de enzimas endógenas (derivadas de la malta) y/o exógenas, por ejemplo, alfa-amilasas, beta-amilasas y glucoamilasas.

[0011] La presente invención proporciona un proceso nuevo adecuado para producir un mosto que sea bajo en azúcares no fermentables. El proceso aplica una actividad de pululanasa expresamente seleccionada.

Definiciones

[0012] En toda esta divulgación, se usan varios términos que son generalmente entendidos por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica. Se usan varios términos con significado específico, tal y como se define posteriormente.

[0013] Como se utiliza en este caso el término **"molienda"** se entiende como el almidón o azúcar que contiene material que es la base para la producción de cerveza, por ejemplo, la malta de cebada y el adjunto. Generalmente, la molienda no contiene agua añadida.

[0014] El término **"malta"** se entiende como cualquier grano de cereal malteado, en particular cebada.

[0015] El término **"adjunto"** se entiende como la parte de la molienda que no es de malta cebada. El adjunto puede comprender cualquier material vegetal rico en almidón, por ejemplo, grano no malteado, tal como cebada, arroz, maíz, trigo, centeno, sorgo y azúcar y/o jarabe fácilmente fermentable.

[0016] El término **"macerado"** se entiende como un almidón que contiene lodo que comprende molienda mojada en agua.

[0017] El término **"mosto"** se entiende como la solución extraída no fermentada siguiente a la extracción de la molienda durante la maceración.

[0018] El término **"granos consumidos"** se entiende como los sólidos drenados restantes cuando la molienda ha sido extraída y el mosto separado.

[0019] El término **"cerveza"** se entiende como mosto fermentado, es decir, una bebida alcohólica fermentada a partir de malta de cebada, opcionalmente adjunto y lúpulo.

[0020] El término **"secuencia homóloga"** se utiliza para caracterizar una secuencia con una secuencia de aminoácidos que es al menos un 70%, preferiblemente al menos un 75%, o al menos un 80%, o al menos un 85%, o un 90%, o al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o incluso al menos un 100% idéntica a una secuencia conocida. La parte relevante de la secuencia de aminoácidos para la determinación de homología es el polipéptido maduro, es decir, sin el péptido señal. El término **"secuencia homóloga"** también se usa para caracterizar secuencias de ADN que hibridan a astringencia baja, astringencia media, astringencia media/alta, astringencia alta, o incluso a astringencia muy alta con una secuencia conocida. Las condiciones experimentales adecuadas para determinar la hibridación a astringencia baja, media o alta entre una sonda de nucleótido y una secuencia de ADN o ARN homóloga implican el prerremojado del filtro que contiene los fragmentos de ADN o el ARN por hibridar en 5 x SSC (cloruro de sodio/citrato de sodio, Sambrook et al., 1989) durante 10 min, y la prehibridación del filtro en una solución de 5 x SSC, 5 x solución de Denhardt (Sambrook et al., 1989), 0,5% SDS y 100 microgramos/ml de ADN de espermatozoos de salmón desnaturalizado y sometido a un baño de ultrasonido (Sambrook et al., 1989), seguido de la hibridación en la misma solución con una concentración de 10ng/ml de una sonda de preparado aleatorio (Feinberg y Vogelstein, 1983, Anal. Biochem. 132:6-13), marcada con 32P-dCTP (actividad específica > 1 x 10⁹ cpm/microgramo) durante 12 horas a alrededor de 45°C. El filtro es luego lavado dos veces durante 30 minutos en 2 x SSC, 0,5% SDS a alrededor de 55°C (astringencia baja), de forma más preferible a alrededor de 60°C (astringencia media), todavía de forma más preferible a alrededor de 65°C (astringencia media/alta), incluso de forma más preferible a alrededor de 70°C (astringencia alta), e incluso de forma más preferible a alrededor de 75°C (astringencia muy alta). Las moléculas a las que la sonda de oligonucleótidos hibrida bajo estas condiciones son detectadas utilizando una película radiográfica.

[0021] El término **"identidad"** cuando se usa acerca de secuencias de polipéptido o de ADN y al cual se hace referencia en esta divulgación se entiende como el grado de identidad entre dos secuencias que indican una derivación de la primera secuencia respecto de la segunda. La identidad puede ser determinada adecuadamente mediante programas informáticos conocidos en la técnica tales como gap proporcionado en el paquete de programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, versión 8, agosto 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU 53711) (Needleman y Wunsch, 1970, Journal of Molecular Biology 48: 443-453). Se usan los siguientes ajustes para la comparación de secuencia polipeptídica: penalización de creación de gap de 3,0 y penalización por extensión de gap de 0,1. El grado de identidad entre una secuencia de aminoácidos de la

presente invención y una secuencia de aminoácidos diferente ("secuencia foránea") se calcula como el número de coincidencias exactas en un alineamiento de las dos secuencias, dividido por la longitud de la "secuencia de invención" o la longitud de la "secuencia foránea", la que sea más corta. El resultado se expresa en porcentaje de identidad.

5

Producción de mosto

[0022] Conforme al primer aspecto, la invención proporciona un proceso para producir un mosto de cerveza que comprende fomar un macerado a partir de una molienda, y poner en contacto dicho macerado con una pululanasa (E.C. 3.2.1.41), donde dicha pululanasa tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 98% o incluso al menos un 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID n° 4.

10

[0023] La molienda del primer aspecto comprende almidón que contiene grano y/o adjunto malteado. La molienda puede comprender preferiblemente de 0% a 100%, preferiblemente de 20% a 100%, preferiblemente de 30% a 100%, de forma más preferible de 40% a 100%, incluso de forma más preferible de 50% a 100%, aún de forma más preferible de 60% a 100%, tal como de 80% a 100% o incluso de la forma más preferible de 90% a 100% de adjunto, grano no malteado y/o cebada no malteada. En una forma de realización particular el adjunto está compuesto al 100% de cebada no malteada. Además, la molienda preferiblemente comprende de 0% a 100%, preferiblemente de 20% a 100%, preferiblemente de 30% a 100%, de forma más preferible de 40% a 100%, incluso de forma más preferible de 50% a 100%, aún de forma más preferible de 60% a 100%, o de la forma más preferible de 70% a 100%, o incluso de la forma más preferible de 90% a 100% de grano malteado y/o cebada malteada. En una forma de realización particular la molienda comprende aproximadamente el 50% de grano malteado, por ejemplo, cebada malteada, y aproximadamente el 50% de adjunto, por ejemplo, grano no malteado, tal como cebada no malteada.

15

20

[0024] El grano malteado usado en el proceso del primer aspecto puede comprender cualquier grano malteado, y preferiblemente el grano malteado seleccionado a partir de cebada, trigo, centeno, sorgo, milla, maíz, y arroz malteados, y de la forma más preferible cebada malteada.

25

[0025] El adjunto usado en el proceso del primer aspecto puede obtenerse a partir de tubérculos, raíces, tallos, hojas, legumbres, cereales y/o grano entero. El adjunto puede comprender almidón crudo y/o refinado y/o azúcar que contiene material derivado de plantas como trigo, centeno, avena, maíz, arroz, sorgo, milla, sorgo, patata, batata, mandioca, tapioca, sagú, plátano, remolacha azucarera y/o azúcar de caña. Preferiblemente, el complemento comprende grano no malteado, por ejemplo, grano no malteado seleccionado a partir de la lista consistente en cebada, trigo, centeno, sorgo, milla, maíz, y arroz, y de la forma más preferible cebada no malteada. El adjunto que comprende carbohidratos fácilmente fermentables tales como azúcares o jarabes se puede añadir al macerado de malta de cebada antes, durante o después del proceso de maceración de la invención pero se añade preferiblemente después del proceso de maceración.

30

35

[0026] Según la invención, una enzima pululanasa (E.C. 3.2.1.41) con al menos el 98% de identidad a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID n° 4, es suministrada exógenamente y está presente en el macerado. La pululanasa se puede añadir a los ingredientes del macerado, por ejemplo, el agua y/o la molienda antes, durante o después de la formación del macerado. En una forma de realización particularmente preferida se añade una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) y/o una glucoamilasa (E.C. 3.2.1.3), y está presente en el macerado con la pululanasa.

40

[0027] En otra forma de realización preferida, se añade otra enzima al macerado, dicha enzima es seleccionada a partir del grupo consistente en celulosa, isoamilasa, proteasa, xilanasas.

45

[0028] Durante el proceso de maceración, el almidón extraído de la molienda es hidrolizado gradualmente en azúcares fermentables y dextrinas más pequeñas. Preferiblemente, el macerado es negativo en almidón en la prueba de yodo, antes de extraer el mosto.

50

[0029] El proceso de maceración aplica generalmente un aumento gradual controlado de la temperatura, donde cada paso favorece una acción enzimática sobre las demás proteínas, paredes celulares y almidón finalmente degradados. Los perfiles de temperatura de maceración son generalmente conocidos en la técnica. En la presente invención el paso de sacarificación (degradación de almidón) en el proceso de maceración se lleva a cabo preferiblemente entre 60°C y 66°C, de forma más preferible entre 61°C y 65°C, incluso de forma más preferible entre 62°C y 64°C, y de la forma más preferible entre 63°C y 64°C. En una forma de realización particular de la presente invención la temperatura de sacarificación es 64°C.

55

[0030] Obtener el mosto a partir del macerado incluye típicamente extraer mediante presión el mosto a partir de los granos consumidos, es decir, el grano insoluble y material de cáscara que forman parte de la molienda. El agua caliente puede hacerse correr a través de los granos consumidos para enjuagar, o asperjar, cualquier extracto restante de la molienda. La solicitud de una celulasa termoestable en el proceso de la presente invención produce una reducción eficaz del nivel de beta-glucano facilitando la extracción por presión del mosto asegurando así una duración del ciclo reducida y una alta recuperación de extracto. Preferiblemente la recuperación del extracto es al menos del 80%, preferiblemente al menos del 81%, de forma más preferible al menos del 82%, incluso de forma

60

65

más preferible al menos del 83%, tal como al menos del 84%, al menos del 85%, al menos del 86%, al menos del 87%, al menos del 88%, al menos del 89%, al menos del 90%, y de la forma más preferible al menos del 91%.

- 5 [0031] Después de la separación del mosto de los granos consumidos de la molienda de cualquiera de las formas de realización anteriormente mencionadas del primer aspecto, el mosto se puede utilizar como es o se puede deshidratar para proporcionar un mosto concentrado y/o seco. El mosto concentrado y/o seco se puede utilizar como extracto de elaboración de cerveza, como aromatizante de extracto de malta, para bebidas de malta sin alcohol, vinagre de malta, cereales de desayuno, para confitado, etc.
- 10 [0032] En una forma de realización preferida, el mosto se fermenta para producir una bebida alcohólica, preferiblemente una cerveza, por ejemplo, ale, strong ale, amarga, stout, porter, lager, cerveza de exportación, licor de malta, vino de cebada, cerveza happoushu, cerveza de alta graduación alcohólica, cerveza de baja graduación alcohólica, cerveza baja en calorías o cerveza light. La fermentación del mosto puede incluir ajustar el mosto con un lodo de levadura que comprende levadura fresca, es decir, levadura no previamente usada para la invención o la
- 15 levadura puede ser levadura recidada. La levadura aplicada puede ser cualquier levadura adecuada para la elaboración de cerveza, especialmente levaduras seleccionadas a partir de *Saccharomyces* spp. tal como *S. cerevisiae* y *S. uvarum*, incluyendo variantes producidas naturalmente o artificialmente de estos organismos. Los métodos para fermentación de mosto para la producción de cerveza son conocidos por el experto en la materia.
- 20 [0033] El proceso de la invención puede incluir la adición de hidrogel de sílice al mosto fermentado para aumentar la estabilidad coloidal de la cerveza. Los procesos pueden incluir además la adición de diatomita al mosto fermentado y la filtración para hacer la cerveza luminosa.
- 25 [0034] También se describe cerveza producida a partir del mosto del segundo o tercer aspecto, tal como una cerveza producida mediante fermentación del mosto para producir una cerveza. La cerveza puede ser cualquier tipo de cerveza, por ejemplo, ales, strong ales, stouts, porters, lagers, bitters, cervezas de exportación, licores de malta, cerveza happoushu, cerveza de alta graduación alcohólica, cerveza de baja graduación alcohólica, cerveza baja en calorías o cerveza light.
- 30 Enzimas
- [0035] Las enzimas por ser aplicadas en la presente invención deberían ser seleccionadas por su capacidad para retener la suficiente actividad a la temperatura de proceso de los procesos de la invención, al igual que bajo el régimen de pH en el macerado y deberían ser añadidas en cantidades eficaces. Las enzimas pueden ser derivadas
- 35 de cualquier fuente, preferiblemente de una planta o una alga, y de forma más preferible de un microorganismo, tal como de una bacteria o un hongo.

Pululanasa (E.C. 3.2.1.41)

- 40 [0036] Una enzima de pululanasa preferida para ser usada en los procesos y/o composiciones de la invención es una pululanasa con una secuencia de aminoácidos que es al menos un 98% o incluso un 100% idéntica a la secuencia mostrada en la SEC ID n° 4; particular iónica cuando se alinea utilizando la matriz que usa el programa Needle: BLOSUM62; penalización de iniciación de gap: 10,0; penalización por extensión de gap: 0,5; matriz de identidad sin gaps.
- 45 [0037] De la forma más preferible la pululanasa es derivada de *Bacillus acidopulluliticus*. La pululanasa puede tener la secuencia de aminoácidos descrita por Kelly et al., 1994 (FEMS Microbiol. Letters 115: 97-106) (SEC ID n° 6).

Isoamilasa (E.C. 3.2.1.68)

- 50 [0038] Otra enzima aplicada en los procesos y/o composiciones de la invención puede ser una enzima desramificante alternativa, tal como una isoamilasa (E.C. 3.2.1.68). La isoamilasa hidroliza enlaces alfa-1,6-D-glucosídicos ramificados en amilopectina y beta-dextrinas límite y se pueden distinguir de las pululanases por la incapacidad de la isoamilasa de atacar el pulolano, y por la acción limitada en las alfa-dextrinas límite. La isoamilasa
- 55 se puede añadir en cantidades eficaces bien conocidas por el experto en la materia. La isoamilasa se puede añadir sola o junto con unas pululanases.

Alfa-amilasa (EC 3.2.1.1)

- 60 [0039] Una enzima de alfa-amilasa particular para ser usada en los procesos y/o composiciones de la invención puede ser una alfa-amilasa de *Bacillus*. Las alfa-amilasas de *Bacillus* bien conocidas incluyen alfa-amilasas derivadas de una cepa de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, y *B. stearothermophilus*. En el contexto de la presente invención, una alfa-amilasa de *Bacillus* contemplada es una alfa-amilasa tal y como se define en el documento WO 99/19467 en la página 3, línea 18 a página 6, línea 27. Una alfa-amilasa preferida tiene una
- 65 secuencia de aminoácidos con al menos el 90% de identidad a la SEC ID n° 4 en el documento WO 99/19467 (aquí descrita como SEC ID n° 7), tal como al menos el 92%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al

menos el 98%, o particularmente al menos el 99%. La alfa-amilasa maltogénica más preferida es la SEC ID n° 9 o comprende sus variantes descritas en el documento WO 99/43794. Las variantes e híbridos contemplados son descritos en los documentos WO 96/23874, WO 97/41213, y WO 99/19467. Específicamente contemplada es una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) de *B. stearrowthermophilus* con la secuencia de aminoácidos descrita como la SEC ID n° 3 en el documento WO 99/19467 (aquí descrita como SEC ID n° 10) con las mutaciones: I181* + G182* + N193F.

[0040] Se pueden añadir alfa-amilasas de *Bacillus* en las cantidades de 1,0-1000 NU/kg DS, preferiblemente de 2,0-500 NU/kg DS, preferiblemente 10-200 NU/kg DS.

[0041] Otra alfa-amilasa particular para ser usada en los procesos de la invención puede ser cualquier alfa-amilasa fúngica, por ejemplo, una alfa-amilasa derivada de una especie dentro de *Aspergillus*, y preferiblemente derivada de una cepa de *Aspergillus niger*. Especialmente contempladas son las alfa-amilasas fúngicas que muestran una alta identidad, es decir, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85% o incluso al menos el 90% de identidad a las secuencias de aminoácidos mostradas en la SEC ID n° 1 en el documento WO 2002/038787 (aquí descrita como SEC ID n° 11). Las alfa-amilasas fúngicas se pueden añadir en una cantidad de 1-1000 AFAU/kg DS, preferiblemente de 2-500 AFAU/kg DS, preferiblemente 20-100 AFAU/kg DS.

Glucoamilasas (E.C. 3.2.1.3)

[0042] Otra enzima particular para ser usada en los procesos y/o composiciones de la invención puede ser una glucoamilasa (E.C. 3.2.1.3) derivada de un microorganismo o una planta. Se prefieren las glucoamilasas de origen fúngico o bacteriano seleccionadas del grupo consistente en glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular glucoamilasa G1 o G2 de *A. niger* (Boel et al., 1984, EMBO J. 3(5): 1097-1102), o variantes de las mismas, tal como se describe en el documento WO 92/00381 y el documento WO 00/04136; la glucoamilasa de *A. awamori* (WO 84/02921), *A. oryzae* (Agric. Biol. Chem., 1991,55(4): 941-949), o variantes o fragmentos de las mismas.

[0043] Otras glucoamilasas contempladas incluyen glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular derivadas de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente estadounidense n° Re. 32, 153), *Talaromyces duponti*, y *Talaromyces thermophilus* (patente estadounidense n° 4,587,215). Glucoamilasas preferidas incluyen las glucoamilasas derivadas de *Aspergillus oryzae*, tal como una glucoamilasa con al menos el 90%, al menos el 92%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o particularmente al menos el 99% o incluso al menos el 90% de identidad a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID n° 2 en el documento WO00/04136. Otras glucoamilasas preferidas incluyen las glucoamilasas derivadas de *Talaromyces emersonii* tales como una glucoamilasa con al menos el 90%, al menos el 92%, al menos el 95%, al menos el 96%, al menos el 97%, al menos el 98%, o particularmente al menos el 99% o incluso al menos el 90% de identidad a la secuencia de aminoácidos de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448).

[0044] Glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135,138), y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831).

[0045] 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 baja contenido de proteasa). Las glucoamilasas se pueden añadir en cantidades eficaces bien conocidas por el experto en la técnica.

Proteasa

[0046] Proteasas adecuadas incluyen proteasas microbianas, tales como proteasas fúngicas y bacterianas. Las proteasas preferidas son proteasas ácidas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad para hidrolizar proteínas bajo condiciones ácidas inferiores a pH 7.

[0047] Las proteasas son responsables de la reducción de la longitud total de proteínas de alto peso molecular en proteínas de bajo peso molecular en el macerado. Las proteínas de bajo peso molecular son necesarias para la nutrición de la levadura y las proteínas de alto peso molecular aseguran la estabilidad de la espuma. Así es bien conocido al experto en la materia que la proteasa debería ser añadida en una cantidad equilibrada que al mismo tiempo permita el paso de aminoácidos libres para la levadura y deje suficientes proteínas de alto peso molecular para estabilizar la espuma. Las proteasas se pueden añadir en las cantidades de 0,1-1000 AU/kg DS, preferiblemente 1-100 AU/kg DS y de la forma más preferible 5-25 AU/kg DS.

Celulasa (E.C. 3.2.1.4)

[0048] La celulasa puede ser de origen microbiano, tal como derivable a partir de una cepa de un hongo filamentoso (por ejemplo, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Fusarium*). Ejemplos específicos de celulasas incluyen la endoglucanasa (endoglucanasa I) obtenible de *H. insolens* y además definida por la secuencia de aminoácidos de la figura 14 en el documento WO 91/17244 (aquí descrita como SEC ID n° 12) y los 43 kD de endoglucanasa de *H.*

insolens descrita en el documento WO 91/17243.

[0049] Una celulasa particular para ser usada en los procesos de la invención puede ser una endoglucanasa, tal como un endo-1,4-beta-glucanasa. Especialmente contemplada es la beta-glucanasa mostrada en la SEQ ID n° 2 en el documento WO 2003/062409 (aquí descrita como SEC ID n° 14) y secuencias homólogas. Las preparaciones con celulasa disponibles comercialmente que se pueden usar incluyen CELLUCLAST®, CELLUZYME®, CEREFLO® y ULTRAFLO® (disponible de Novozymes AS), LAMINEX™ y SPEZYME® CP (disponible de Genencor Int.) y ROHAMENT® 7069 W (disponible de Röhm, Alemania).

[0050] Las beta-glucanasas se pueden añadir en las cantidades de 1,0-10000 BGU/kg DS, preferiblemente de 10-5000 BGU/kg DS, preferiblemente de 50-1000 BGU/kg DS y de la forma más preferible de 100-500 BGU/kg DS.

Materiales y métodos

Enzimas

[0051] Pululanasa 1 derivada de *Bacillus acidopullulyticus* y con la secuencia mostrada en la SEC ID n° 1. Pululanasa 1 está disponible por Novozymes como Promozyme 400L.

[0052] Pululanasa 2 derivada de *Bacillus deramificans* (patente estadounidense n° 5,736,375) y con la secuencia mostrada en la SEC ID n° 2. Pululanasa 2 está disponible por Novozymes como Promozyme D2.

[0053] Pululanasa 3 derivada de *Bacillus acidopullulyticus* y con la secuencia mostrada en la SEC ID n° 4.

[0054] Alfa-amilasa fúngica ácida derivada de *Aspergillus niger* y con la secuencia mostrada en la SEC ID n° 11.

[0055] Glucoamilasa G1 derivada de *Aspergillus niger* (Boel et al., supra).

Métodos

Actividad de alfa-amilasa (NU)

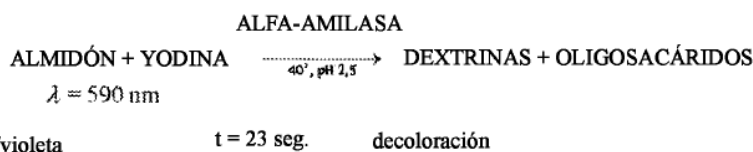
[0056] La actividad de alfa-amilasa se puede determinar usando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición de almidón de patata modificado por la enzima, y la reacción es seguida de la mezcla de muestras de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo. Inicialmente, se forma un color azul negruzco, pero durante la descomposición del almidón, el color cielo se vuelve más débil y cambia gradualmente a marrón rojizo, que se compara con un estándar de vidrio coloreado.

[0057] Una Unidad Kilo Novo de amilasa alfa (KNU por sus siglas en inglés) equivale a 1000 NU. Un KNU se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (es decir, a 37°C +/- 0,05, 0,0003 M Ca²⁺; y pH 5,6) degrada 5,26 g de sustancia seca de almidón (Merck Amylum soluble).

Actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)

[0058] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida, por sus siglas en inglés), que se determinan con respecto a un estándar enzimático. 1 FAU se define como la cantidad de enzima que degrada 5,260 mg de almidón sustancia seca por hora bajo las condiciones estándar mencionadas posteriormente.

[0059] La alfa-amilasa ácida, una endo-alfa-amilasa (1,4-alfa-D-glucan-glucanohidrolasa, E.C. 3.2.1.1) hidroliza enlaces alfa-1,4-glucosídicos en las regiones internas de la molécula de almidón para formar dextrinas y oligosacáridos con diferentes longitudes de cadena. La intensidad de color formada con yodo es directamente proporcional a la concentración de almidón. La actividad de la amilasa se determina utilizando la colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón bajo condiciones analíticas específicas.



Condiciones estándar/condiciones de reacción:

[0060]

	Sustrato:	almidón soluble, aprox. 0,17 g/L
	Tampón:	citrato, aprox. 0,03 M
5	Yodo (I ₂):	0,03 g/L
	CaCl ₂ :	1,85 mM
	pH:	2,50 ± 0,05
	Temperatura de incubación:	40°C
	Tiempo de reacción:	23 segundos
10	Longitud de onda:	590 nm
	Concentración enzimática:	0,025 AFAU/mL
	Rango de trabajo de enzima:	0,01-0,04 AFAU/mL

Actividad de glucoamilasa (AGU)

15 [0061] La Unidad Novo de Glucoamilasa (AGU por sus siglas en inglés) se define como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto a 37°C y pH 4,3.

20 [0062] La actividad se determina como AGU/ml mediante un método modificado después (AEL-SM-0131, disponible en la solicitud de Novozymes) utilizando el equipo Glucose GOD-Perid de Boehringer Mannheim, 124036. Estándar: estándar AMG, lote 7-1195, se incuban 195 AGU/ml. 375 microL de sustrato (1% maltosa en 50 mM acetato sódico, pH 4,3) durante 5 minutos a 37°C. Se añaden 25 microL de enzima diluida en el acetato sódico. La reacción es detenida después de 10 minutos añadiendo 100 microL 0,25 M NaOH. 20 microL se transfiere a una placa microtituladora de 96 pocillos y se añaden 200 microL de solución GOD-Perid (124036, Boehringer Mannheim).

25 Después de 30 minutos a temperatura ambiente, la absorbancia se mide a 650 nm y la actividad calculada en AGU/ml del estándar AMG. Una descripción detallada del método analítico (AEL-SM-0131) está disponible tras solicitarla a Novozymes.

Actividad de pululanasa (PUN):

30 [0063] Una unidad de pululanasa (PUN por sus siglas en inglés) se define como la cantidad de enzima que es capaz de formar 1 micromol de glucosa a partir de sustrato de pululano por minuto a 50°C en un tampón de citrato a pH 5.

35 [0064] Se incuban muestras de pululanasa con sustrato (rojo pululano). La endo-pululanasa hidroliza los enlaces alfa-1,6-glicosídicos en el pululano rojo, liberando productos de degradación de sustrato rojo. El sustrato no-degradado es precipitado usando etanol. La cantidad de color liberada se mide espectrofotométricamente a 510 nm y es proporcional a la actividad de endo-pululanasa en la muestra. La formación de color de las muestras es comparada con la formación de color producida por muestras con actividad de pululanasa conocida.

40 [0065] La pululanasa es una pululano 6-glucano-hidrolasa con el número de clasificación enzimática E.C. 3.2.1.41.

Condiciones de reacción

[0066]

45	Temperatura	50°C ± 2°C
	pH	5,0
	Concentración de sustrato	0,67% pululano rojo
	Concentración enzimática	0,04 - 0,13 PUN/ml
	Tiempo de reacción	30 min.
	Longitud de onda	510 nm

Reactivos / sustratos

[0067]

50 Solución de cloruro de potasio 0,5 M
Sustrato de pululano rojo 2%. Proveedor Megazyme, Australia
Tampón de citrato 0,05 M pH 5,0
Tampón de citrato 0,05 M pH 5,0 con 25 mM cisteína

55 Etanol 99,8%
Preparación estándar de pululanasa de 904 PUN/g diluida en el tampón de citrato 0,05 M hasta obtener una serie de dilución estándar de 0,05 - 0,20 PUN/ml
Tampón de citrato virgen 0,05 M
Las muestras enzimáticas son diluidas en el tampón de citrato 0,05 M hasta obtener una actividad entre 0,06 - 0,20 PUN/ml y comparado con la serie de dilución estándar.

60

Ejemplo 1

5 [0068] En este ejemplo, se analizó la capacidad de diferentes pululanases para reducir la cantidad de carbohidratos no fermentables (dextrina/DP4/4+) en un mosto.

10 [0069] 100% malta bien modificada fue molida utilizando un perfil de temperatura de maceración que comprende 46°C durante 26 minutos, seguido de un aumento de 1°C/minuto hasta 64°C después de lo cual la temperatura fue mantenida constante. Se recogieron muestras en los minutos 98, 128 y 158.

[0070] Las enzimas fueron añadidas en el minuto 0. Se añadieron glucoamilasa y alfa-amilasa a todos los tratamientos en cantidades de 1000 AGU/kg DS y 250 AFAU/kg DS respectivamente. La pululanasa fue añadida según la tabla 1.

15 [0071] Las muestras fueron hervidas 10 minutos y filtradas (tamaño de los poros 0,20 micro-m). Las muestras fueron analizadas mediante HPLC y se calculó el % carbohidrato no fermentable (DP4/4+).

Tabla 1: % de carbohidrato no fermentable después de los tiempos de maceración de 98, 128 y 158 minutos.				
Tipo de pululanasa	Cantidad en mg/kg DS	Tiempo de maceración		
		98 minutos	128 minutos	158 minutos
Ninguno	0	28,87	25,16	22,94
Pululanasa 1	0,74	27,64	24,55	21,96
Pululanasa 1	3,65	23,96	21,35	18,92
Pululanasa 1	7,25	20,71	17,74	16,11
Pululanasa 1	14,39	16,36	14,47	13,22
Pululanasa 2	1,86	28,34	25,21	22,79
Pululanasa 2	9,26	26,81	23,28	21,36
Pululanasa 2	18,40	25,68	22,33	20,17
Pululanasa 2	36,59	23,56	20,58	18,35
Pululanasa 3	1,37	27,11	23,38	20,51
Pululanasa 3	2,74	24,46	20,93	18,18

20 [0072] Los datos en la tabla 1 fueron usados para calcular, por regresión, las dosificaciones enzimáticas de pululanasa 1 y pululanasa 2 necesarias para obtener el mismo efecto que 2,74 mg de proteína enzimática/kg de pululanasa 3 (véase tabla 2).

Tabla 2. Proteína enzimática de pululanasa mg/kg DS necesaria para conseguir el mismo efecto que con 2,74 mg pululanasa 3 y tiempos de maceración de 98, 128 y 158 minutos.		
Tiempo de maceración	Pululanasa 1	Pululanasa 2
98 minutos	3,38	27,33
128 minutos	4,04	31,06
158 minutos	4,56	40,37

25 [0073] De estos resultados se puede observar que la pululanasa 3 es la enzima más eficaz. Consecuentemente, es necesaria menos proteína enzimática de pululanasa 3 para reducir la cantidad de carbohidratos no fermentables (dextrina/DP4/4+) y así aumentar la atenuación del mosto.

Ejemplo 2

30 [0074] En el presente ejemplo se analizan el perfil de pH y el perfil de temperatura de diferentes pululanases.

[0075] Las investigaciones del perfil de pH y temperatura se basaron en el análisis de actividad enzimática relativa con las condiciones descritas posteriormente.

35 [0076] Principios del método analítico:

Los enlaces alfa-1,6-glicosídicos en el pululano fueron hidrolizados por una enzima de pululanasa y la capacidad aumentada del azúcar reductor fue detectada por un método Somogyi-Nelson modificado.

40 [0077] En el presente experimento la actividad es evaluada como actividad relativa, donde la muestra más activa se da como 100%.

Las condiciones de ensayo son de la siguiente manera:

45 Tampón: citrato 0,1 M + 0,2 M fosfato (ajustado en el perfil de pH, a pH 5 en el perfil de temperatura)

Sustrato: 0,2% pululano Sigma (p-4516)

Temperatura: 60°C en el perfil de pH, ajustado en el perfil de temperatura

Tiempo de reacción: 30 minutos

[0078] Los azúcares reductores liberados por pululanasa fueron detectados según el principio descrito en Nelson, 1944, J. Biol. Chem. 153: 375-380 y Somogyi, 1945, J. Biol. Chem. 160: 61- 68. En resumen, la reacción de hidrólisis es detenida añadiendo reactivo de cobre de Somogyi a un volumen correspondiente al volumen de muestra (por ejemplo, 2 ml a una muestra de 2 ml). Las muestras son hervidas durante 20 minutos y enfriadas antes de la reacción de color. Esta reacción se realiza añadiendo reactivo de Nelson correspondiente a ½ del volumen de la muestra (por ejemplo, 2 ml a 4 ml muestra+reactivo de cobre de Somogyi). Las muestras son mezcladas durante 2 minutos seguido de la adición de agua en la misma cantidad como reactivo de Nelson. Las muestras son incubadas 30 minutos a oscuras y medidas en un espectrofotómetro a 540 nm.

[0079] Los reactivos se pueden preparar de la siguiente manera:

Reactivo de cobre de Somogyi.

Disolver 70,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ y 80,0 g $\text{KNAC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (tartrato de sodio potasio) en 1000 ml H_2O (calentar ligeramente). Además añadir 60 g NaOH; 16,0 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ y 360,0 g Na_2SO_4 y llenar hasta 2000 ml. Ajustar el pH a 10,8 con NaOH

Reactivo de Nelson:

Disolver 100,0 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 7\text{H}_2\text{O}$ en 1200 ml H_2O . Añadir 84,0 ml H_2SO_4 cuidadosamente. Adicionalmente, disolver 12,00 g $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ (arsenato de hidrógeno disódico) en 100 ml H_2O , y añadir esta solución lentamente a la primera solución y rellenar hasta 2000 ml.

[0080] Los perfiles de pH y temperatura para las tres pululanasa se dan en la tabla 3 y 4 a continuación.

Tabla 3: pH perfil dado en actividad enzimática relativa (%) a 60°C			
pH	Pululanasa 1	Pululanasa 2	Pululanasa 3
2,4	2,2	1	0,2
2,8	6	2,4	30,7
3,7	10,8	68,5	90
4,2	23,1	100	100
5	94	77,4	92,4
5,8	92,8	31,7	74,2
6,3	43,1	4,4	45,3
6,7	3,7	0	1,8
7,3	0	0	0

Tabla 4: perfil de temperatura dado en actividad enzimática relativa (%) a pH 5,0			
Temp. °C	Pululanasa 1	Pululanasa 2	Pululanasa 3
30	22,8	36,7	19,7
45	64,4	72,5	47,3
55	100	100	76,8
60	99,6	85,2	92,6
62,5	87,1	70	101,2
65	42,1	54,4	100
70	9,4	12,7	75,6

[0081] Estos resultados muestran que la pululanasa 3 tiene un perfil de pH amplio y actividad a altas temperaturas en comparación con las otras dos pululanasa. Estas propiedades hacen de la pululanasa 3 una enzima muy robusta en la elaboración de cerveza (condiciones de maceración), en particular para temperaturas de sacarificación entre 62°C y 65°C.

Ejemplo 3

[0082] La prueba de maceración de infusión se llevó a cabo con pululanasa 1 y 3 (SEC ID nº 1 y 4). Se prepararon 6 muestras de maceración con 100% cebada como sustrato (molienda).

[0083] Cebada (DS%: 86,73) fue molida y para cada muestra 50,0 g (total DS 43,34 g) fueron mezcladas con 200 g de agua de grifo a 50°C y 3,0 ml 1 M H_3PO_4 .

[0084] A todas las muestras se les añadió una mezcla de enzima idéntica sin pululanasa.

[0085] A las muestras 1-6 se les añadió luego pululanasa según la siguiente tabla:
Actividad de dosis enzimática/g

Muestra nº	Pululanasa 1 PUN/g	Pululanasa 3 PUN/g
1	0,1	-
2	0,2	-
3	0,5	-
4	-	0,1
5	-	0,2
6	-	0,5

5

[0086] Las muestras fueron luego evaluadas en el equipamiento de maceración automatizado ejecutando el siguiente programa.

Tiempo en minutos	Temp. °C
0-30	50
30-44	aumento a 64
44-104	64
104-120	aumento a 80
120-140	80
140-155	disminución a 20

10

[0087] Después de la maceración a todas las muestras se les añadió agua del grifo hasta un total de 300 g y fueron filtradas. Las muestras filtradas fueron luego hervidas durante 10 minutos y diluidas 1:1 con agua desionizada. Se centrifugaron submuestras de 50 ml y se sometieron a análisis de densidad estándar para el cálculo de RDF % (grado real de fermentación por sus siglas en inglés). Los resultados se dan como RDF % y azúcar de mosto (DP2 y DP4+) en %.

15

PUN/g	Pululanasa 1	Pululanasa 3
0	0	0
0,1	64	64,6
0,2	65	66,1
0,5	67,3	69,5

PUN/g	Pululanasa 1		Pululanasa 3	
	DP2	DP4+	DP2	DP4+
0	48,5	31,5	48,5	31,5
0,1	48,5	30	49	29
0,2	49,5	29	50	27,5
0,5	50,5	36,5	n.d.	n.d.

20

[0088] Los resultados muestran que la pululanasa 3 es claramente mejor que la pululanasa 1 para hacer un % RDF alto, y la pululanasa 3 aún es capaz de producir niveles de maltosa (niveles DP2) incluso mejores que la pululanasa 1.

Ejemplo 4

25

[0089] La prueba de maceración de infusión fue llevada a cabo con pululanasa 3 (SEC ID nº 4) para evaluar las propiedades generadoras de maltosa de la pululanasa 3. Se prepararon 6 muestras con 100% cebada como sustrato (molienda).

30

[0090] La cebada (DS%: 86,73) fue molida y para cada muestra se mezclaron 50,0 g (total DS 43,34 g) con 200 g agua de grifo a 50°C y 5% Na₂SO₃ y 1 M H₃PO₄

[0091] A todas las muestras se les añadió una mezcla de enzima idéntica sin pululanasa.

[0092] Luego a las muestras 1-6 se añadió pululanasa 3 según la siguiente tabla:

Muestra nº	Pululanasa 3 PUN/g
1	-
2	0,1
3	0,3
4	0,5

5	1,0
6	2,0

[0093] Las muestras fueron luego evaluadas en el equipamiento de maceración automatizada ejecutando el siguiente programa.

Tiempo en minutos	Temp °C
0-30	50
30-44	aumento a 64
44-104	64
104-120	aumento a 80
120-140	80
140-155	disminución a 20

5

[0094] Después de la maceración, a todas las muestras se les añadió agua del grifo a un total de 300 g y fueron filtradas. Las muestras filtradas fueron luego hervidas durante 10 minutos y diluidas 1:1 con agua desionizada. Se centrifugaron submuestras de 50 ml y se sometieron a análisis. Los resultados fueron de la siguiente manera:

PUN/g	% glucosa	% maltosa	% dextrina	% RDF
0	3,8	47,5	34	61,2
0,1	3,8	48,2	32	63,2
0,3	3,8	49,8	28,8	65,7
0,5	3,7	51,2	26,4	68,6
1	3,7	52,6	23,9	71
2	3,6	55,6	20,1	74,3

10

[0095] Los resultados muestran que la concentración de maltosa está en aumento con la dosificación en aumento de la pululanasa 3, y el aumento en el % de maltosa es seguido por el aumento en la atenuación (RDF%). La fracción de dextrina (análisis HPLC DP4/4+) está decreciendo a la vez.

15

[0096] Sólo la beta-amilasa de cebada puede producir maltosa en esta reacción, y la pululanasa 3 está facilitando la acción de beta-amilasa de cebada.

20

[0097] La concentración de glucosa es baja y no efectuada por la acción de pululanasa 3 lo cual es una ventaja cuando se fermenta el mosto producido. La pululanasa 3 contribuye a la degradación de dextrina y facilita la formación de maltosa, por la beta-amilasa de cebada, y por este aumento de la atenuación (RDF%) del mosto.

Listado de secuencias

[0098]

25

<110> Novozymes A/S
Novozymes NA, Inc.
Elvig, Niels
Joergensen, Per L.
Thomas, Michael

30

<120> Proceso de maceración

<130> 11323.004-WO

35

<160> 14

<170> Versión de patentIn 3.4

40

<210> 1
<211> 921
<212> PRT
<213> Bacillus acidopullulyticus

45

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(921)

<400> 1

ES 2 551 711 T3

Asp Ser Thr Ser Thr Lys Val Ile Val His Tyr His Arg Phe Asp Ser
1 5 10 15

Asn Tyr Thr Asn Trp Asp Val Trp Met Trp Pro Tyr Gln Pro Val Asn
20 25 30

Gly Asn Gly Ala Ala Tyr Gln Phe Thr Gly Thr Asn Asp Asp Phe Gly
35 40 45

Ala Val Ala Asp Thr Gln Val Pro Gly Asp Asn Thr Gln Val Gly Leu
50 55 60

Ile Val Arg Lys Asn Asp Trp Ser Glu Lys Asn Thr Pro Asn Asp Leu
65 70 75 80

His Ile Asp Leu Ala Lys Gly His Glu Val Trp Ile Val Gln Gly Asp
85 90 95

Pro Thr Ile Tyr Tyr Asn Leu Ser Asp Ala Gln Ala Ala Ala Ile Pro
100 105 110

Ser Val Ser Asn Ala Tyr Leu Asp Asp Glu Lys Thr Val Leu Ala Lys
115 120 125

Leu Ser Met Pro Met Thr Leu Ala Asp Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val

ES 2 551 711 T3

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

ES 2 551 711 T3

Asn Gly Thr Thr Gln Thr Ala Val Asp Pro Tyr Ala Arg Ala Ile Ser
 385 390 395 400
 Val Asn Ala Thr Arg Gly Met Ile Val Asp Leu Lys Ala Thr Asp Pro
 405 410 415
 Ala Gly Trp Gln Gly Asp His Glu Gln Thr Pro Ala Asn Pro Val Asp
 420 425 430
 Glu Val Ile Tyr Glu Ala His Val Arg Asp Phe Ser Ile Asp Ala Asn
 435 440 445
 Ser Gly Met Lys Asn Lys Gly Lys Tyr Leu Ala Phe Thr Glu His Gly
 450 455 460
 Thr Lys Gly Pro Asp His Val Lys Thr Gly Ile Asp Ser Leu Lys Glu
 465 470 475 480
 Leu Gly Ile Thr Thr Val Gln Leu Gln Pro Val Glu Glu Phe Asn Ser
 485 490 495
 Ile Asp Glu Thr Gln Pro Asp Thr Tyr Asn Trp Gly Tyr Asp Pro Arg
 500 505 510
 Asn Tyr Asn Val Pro Glu Gly Ala Tyr Ala Thr Thr Pro Glu Gly Thr
 515 520 525
 Ala Arg Ile Thr Glu Leu Lys Gln Leu Ile Gln Ser Leu His Gln Gln
 530 535 540
 Arg Ile Gly Val Asn Met Asp Val Val Tyr Asn His Thr Phe Asp Val
 545 550 555 560
 Met Val Ser Asp Phe Asp Lys Ile Val Pro Gln Tyr Tyr Tyr Arg Thr
 565 570 575
 Asp Ser Asn Gly Asn Tyr Thr Asn Gly Ser Gly Cys Gly Asn Glu Phe
 580 585 590
 Ala Thr Glu His Pro Met Ala Gln Lys Phe Val Leu Asp Ser Val Asn
 595 600 605
 Tyr Trp Val Asn Glu Tyr His Val Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Met
 610 615 620

ES 2 551 711 T3

Ala Leu Leu Gly Lys Asp Thr Met Ala Lys Ile Ser Asn Glu Leu His
625 630 635 640

Ala Ile Asn Pro Gly Ile Val Leu Tyr Gly Glu Pro Trp Thr Gly Gly
645 650 655

Thr Ser Gly Leu Ser Ser Asp Gln Leu Val Thr Lys Gly Gln Gln Lys
660 665 670

Gly Leu Gly Ile Gly Val Phe Asn Asp Asn Ile Arg Asn Gly Leu Asp
675 680 685

Gly Asn Val Phe Asp Lys Thr Ala Gln Gly Phe Ala Thr Gly Asp Pro
690 695 700

Asn Gln Val Asp Val Ile Lys Asn Gly Val Ile Gly Ser Ile Gln Asp
705 710 715 720

Phe Thr Ser Ala Pro Ser Glu Thr Ile Asn Tyr Val Thr Ser His Asp
725 730 735

Asn Met Thr Leu Trp Asp Lys Ile Leu Ala Ser Asn Pro Ser Asp Thr
740 745 750

Glu Ala Asp Arg Ile Lys Met Asp Glu Leu Ala His Ala Val Val Phe
755 760 765

Thr Ser Gln Gly Val Pro Phe Met Gln Gly Gly Glu Glu Met Leu Arg
770 775 780

Thr Lys Gly Gly Asn Asp Asn Ser Tyr Asn Ala Gly Asp Ser Val Asn
785 790 795 800

Gln Phe Asp Trp Ser Arg Lys Ala Gln Phe Lys Asp Val Phe Asp Tyr
805 810 815

Phe Ser Ser Met Ile His Leu Arg Asn Gln His Pro Ala Phe Arg Met
820 825 830

Thr Thr Ala Asp Gln Ile Lys Gln Asn Leu Thr Phe Leu Glu Ser Pro
835 840 845

Thr Asn Thr Val Ala Phe Glu Leu Lys Asn Tyr Ala Asn His Asp Thr
850 855 860

ES 2 551 711 T3

Trp Lys Asn Ile Ile Val Met Tyr Asn Pro Asn Lys Thr Ser Gln Thr
865 870 875 880

Leu Asn Leu Pro Ser Gly Asp Trp Thr Ile Val Gly Leu Gly Asp Gln
885 890 895

Ile Gly Glu Lys Ser Leu Gly His Val Met Gly Asn Val Gln Val Pro
900 905 910

Ala Ile Ser Thr Leu Ile Leu Lys Gln
915 920

<210> 2

<211> 928

5 <212> PRT

<213> Bacillus deramificans

<220>

<221> mat_peptide

10 <222> (1)..(928)

<400> 2

ES 2 551 711 T3

Asp Gly Asn Thr Thr Thr Ile Ile Val His Tyr Phe Arg Pro Ala Gly
1 5 10 15

Asp Tyr Gln Pro Trp Ser Leu Trp Met Trp Pro Lys Asp Gly Gly Gly
20 25 30

Ala Glu Tyr Asp Phe Asn Gln Pro Ala Asp Ser Phe Gly Ala Val Ala
35 40 45

Ser Ala Asp Ile Pro Gly Asn Pro Ser Gln Val Gly Ile Ile Val Arg
50 55 60

Thr Gln Asp Trp Thr Lys Asp Val Ser Ala Asp Arg Tyr Ile Asp Leu
65 70 75 80

Ser Lys Gly Asn Glu Val Trp Leu Val Glu Gly Asn Ser Gln Ile Phe
85 90 95

Tyr Asn Glu Lys Asp Ala Glu Asp Ala Ala Lys Pro Ala Val Ser Asn
100 105 110

Ala Tyr Leu Asp Ala Ser Asn Gln Val Leu Val Lys Leu Ser Gln Pro
115 120 125

Leu Thr Leu Gly Glu Gly Ala Ser Gly Phe Thr Val His Asp Asp Thr

ES 2 551 711 T3

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

ES 2 551 711 T3

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

ES 2 551 711 T3

Ser Thr Arg Thr Ala Val Asp Pro Tyr Ala Thr Ala Ile Ala Pro Asn
385 390 395 400

Gly Thr Arg Gly Met Ile Val Asp Leu Ala Lys Thr Asp Pro Ala Gly
405 410 415

Trp Asn Ser Asp Lys His Ile Thr Pro Lys Asn Ile Glu Asp Glu Val
420 425 430

Ile Tyr Glu Met Asp Val Arg Asp Phe Ser Ile Asp Pro Asn Ser Gly
435 440 445

Met Lys Asn Lys Gly Lys Tyr Leu Ala Leu Thr Glu Lys Gly Thr Lys
450 455 460

Gly Pro Asp Asn Val Lys Thr Gly Ile Asp Ser Leu Lys Gln Leu Gly
465 470 475 480

Ile Thr His Val Gln Leu Met Pro Val Phe Ala Ser Asn Ser Val Asp
485 490 495

Glu Thr Asp Pro Thr Gln Asp Asn Trp Gly Tyr Asp Pro Arg Asn Tyr
500 505 510

Asp Val Pro Glu Gly Gln Tyr Ala Thr Asn Ala Asn Gly Asn Ala Arg
515 520 525

Ile Lys Glu Phe Lys Glu Met Val Leu Ser Leu His Arg Glu His Ile
530 535 540

Gly Val Asn Met Asp Val Val Tyr Asn His Thr Phe Ala Thr Gln Ile
545 550 555 560

Ser Asp Phe Asp Lys Ile Val Pro Glu Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asp Asp
565 570 575

Ala Gly Asn Tyr Thr Asn Gly Ser Gly Thr Gly Asn Glu Ile Ala Ala
580 585 590

Glu Arg Pro Met Val Gln Lys Phe Ile Ile Asp Ser Leu Lys Tyr Trp
595 600 605

Val Asn Glu Tyr His Ile Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Met Ala Leu
610 615 620

ES 2 551 711 T3

Leu Gly Lys Asp Thr Met Ser Lys Ala Ala Ser Glu Leu His Ala Ile
 625 630 635 640
 Asn Pro Gly Ile Ala Leu Tyr Gly Glu Pro Trp Thr Gly Gly Thr Ser
 645 650 655
 Ala Leu Pro Asp Asp Gln Leu Leu Thr Lys Gly Ala Gln Lys Gly Met
 660 665 670
 Gly Val Ala Val Phe Asn Asp Asn Leu Arg Asn Ala Leu Asp Gly Asn
 675 680 685
 Val Phe Asp Ser Ser Ala Gln Gly Phe Ala Thr Gly Ala Thr Gly Leu
 690 695 700
 Thr Asp Ala Ile Lys Asn Gly Val Glu Gly Ser Ile Asn Asp Phe Thr
 705 710 715 720
 Ser Ser Pro Gly Glu Thr Ile Asn Tyr Val Thr Ser His Asp Asn Tyr
 725 730 735
 Thr Leu Trp Asp Lys Ile Ala Leu Ser Asn Pro Asn Asp Ser Glu Ala
 740 745 750
 Asp Arg Ile Lys Met Asp Glu Leu Ala Gln Ala Val Val Met Thr Ser
 755 760 765
 Gln Gly Val Pro Phe Met Gln Gly Gly Glu Glu Met Leu Arg Thr Lys
 770 775 780
 Gly Gly Asn Asp Asn Ser Tyr Asn Ala Gly Asp Ala Val Asn Glu Phe
 785 790 795 800
 Asp Trp Ser Arg Lys Ala Gln Tyr Pro Asp Val Phe Asn Tyr Tyr Ser
 805 810 815
 Gly Leu Ile His Leu Arg Leu Asp His Pro Ala Phe Arg Met Thr Thr
 820 825 830
 Ala Asn Glu Ile Asn Ser His Leu Gln Phe Leu Asn Ser Pro Glu Asn
 835 840 845
 Thr Val Ala Tyr Glu Leu Thr Asp His Val Asn Lys Asp Lys Trp Gly
 850 855 860

ES 2 551 711 T3

Asn Ile Ile Val Val Tyr Asn Pro Asn Lys Thr Val Ala Thr Ile Asn
865 870 875 880

Leu Pro Ser Gly Lys Trp Ala Ile Asn Ala Thr Ser Gly Lys Val Gly
885 890 895

Glu Ser Thr Leu Gly Gln Ala Glu Gly Ser Val Gln Val Pro Gly Ile
900 905 910

Ser Met Met Ile Leu His Gln Glu Val Ser Pro Asp His Gly Lys Lys
915 920 925

<210> 3

<211> 2589

5 <212> ADN

<213> Bacillus acidopullulyticus

<220>

<221> sig_peptide

10 <222> (1)..(99)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(2586)

15

<220>

<221> mat_peptide

<222> (100)..(2589)

20 <400> 3

atg tcc cta ata cgt tct agg tat aat cat ttt gtc att ctt ttt act 48
Met Ser Leu Ile Arg Ser Arg Tyr Asn His Phe Val Ile Leu Phe Thr
-30 -25 -20

gtc gcc ata atg ttt cta aca gtt tgt ttc ccc gct tat aaa gct tta 96
Val Ala Ile Met Phe Leu Thr Val Cys Phe Pro Ala Tyr Lys Ala Leu
-15 -10 -5

gca gat tct acc tcg aca gaa gtc att gtg cat tat cat cgt ttt gat 144
Ala Asp Ser Thr Ser Thr Glu Val Ile Val His Tyr His Arg Phe Asp
-1 1 5 10 15

tct aac tat gca aat tgg gat cta tgg atg tgg cca tat caa cca gtt 192
Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Asp Leu Trp Met Trp Pro Tyr Gln Pro Val
20 25 30

aat ggt aat gga gca gca tac gag ttt tct gga aag gat gat ttt ggc 240
Asn Gly Asn Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Ser Gly Lys Asp Asp Phe Gly
35 40 45

gtt aaa gca gat gtt caa gtg cct ggg gat gat aca cag gta ggt ctg 288
Val Lys Ala Asp Val Gln Val Pro Gly Asp Asp Thr Gln Val Gly Leu
50 55 60

att gtc cgt aca aat gat tgg agc caa aaa aat aca tca gac gat ctc 336
Ile Val Arg Thr Asn Asp Trp Ser Gln Lys Asn Thr Ser Asp Asp Leu

ES 2 551 711 T3

65	70	75	
cat att gat ctg aca aag ggg cat gaa ata tgg att gtt cag ggg gat His Ile Asp Leu Thr Lys Gly His Glu Ile Trp Ile Val Gln Gly Asp 80 85 90 95			384
ccc aat att tat tac aat ctg agt gat gcg cag gct gca gcg act cca Pro Asn Ile Tyr Tyr Asn Leu Ser Asp Ala Gln Ala Ala Ala Thr Pro 100 105 110			432
aag gtt tcg aat gcg tat ttg gat aat gaa aaa aca gta ttg gca aag Lys Val Ser Asn Ala Tyr Leu Asp Glu Lys Thr Val Leu Ala Lys 115 120 125			480
cta act aat cca atg aca tta tca gat gga tca agc ggc ttt acg gtt Leu Thr Asn Pro Met Thr Leu Ser Asp Gly Ser Ser Gly Phe Thr Val 130 135 140			528
aca gat aaa aca aca ggg gaa caa att cca gtt acc gct gca aca aat Thr Asp Lys Thr Thr Gly Glu Gln Ile Pro Val Thr Ala Ala Thr Asn 145 150 155			576
gcg aac tca gcc tcc tcg tct gag cag aca gac ttg gtt caa ttg acg Ala Asn Ser Ala Ser Ser Ser Glu Gln Thr Asp Leu Val Gln Leu Thr 160 165 170 175			624
tta gcc agt gca ccg gat gtt tcc cat aca ata caa gta gga gca gcc Leu Ala Ser Ala Pro Asp Val Ser His Thr Ile Gln Val Gly Ala Ala 180 185 190			672
ggc tat gaa gca gtc aat ctc ata cca cga aat gta tta aat ttg cct Gly Tyr Glu Ala Val Asn Leu Ile Pro Arg Asn Val Leu Asn Leu Pro 195 200 205			720
cgt tat tat tac agc gga aat gat tta ggt aac gtt tat tca aat aag Arg Tyr Tyr Tyr Ser Gly Asn Asp Leu Gly Asn Val Tyr Ser Asn Lys 210 215 220			768
gca acg gcc ttc cgt gta tgg gct cca act gct tcg gat gtc caa tta Ala Thr Ala Phe Arg Val Trp Ala Pro Thr Ala Ser Asp Val Gln Leu 225 230 235			816
ctt tta tac aat agt gaa aca gga cct gta acc aaa cag ctt gaa atg Leu Leu Tyr Asn Ser Glu Thr Gly Pro Val Thr Lys Gln Leu Glu Met 240 245 250 255			864
caa aag agt gat aac ggt aca tgg aaa ctg aag gtc cct ggt aat ctg Gln Lys Ser Asp Asn Gly Thr Trp Lys Leu Lys Val Pro Gly Asn Leu 260 265 270			912
aaa aat tgg tat tat ctc tat cag gta acg gtg aat ggg aag aca caa Lys Asn Trp Tyr Tyr Leu Tyr Gln Val Thr Val Asn Gly Lys Thr Gln 275 280 285			960
aca gcc gtt gac cct tat gtg cgt gct att tca gtc aat gca aca cgt Thr Ala Val Asp Pro Tyr Val Arg Ala Ile Ser Val Asn Ala Thr Arg 290 295 300			1008
ggc atg ata gtc gat tta gaa gat acg aat cct cct gga tgg aaa gaa Gly Met Ile Val Asp Leu Glu Asp Thr Asn Pro Pro Gly Trp Lys Glu 305 310 315			1056

ES 2 551 711 T3

gat cat caa cag aca cct gcg aac cca gtg gat gaa gta atc tac gaa Asp His Gln Gln Thr Pro Ala Asn Pro Val Asp Glu Val Ile Tyr Glu 320 325 330 335	1104
gtg cat gtg cgt gat ttt tcg att gat gct aat tca ggc atg aaa aat Val His Val Arg Asp Phe Ser Ile Asp Ala Asn Ser Gly Met Lys Asn 340 345 350	1152
aaa ggg aaa tat ctt gcc ttt aca gaa cat ggc aca aaa ggc cct gat Lys Gly Lys Tyr Leu Ala Phe Thr Glu His Gly Thr Lys Gly Pro Asp 355 360 365	1200
aac gtg aaa acg ggt att gat agt ttg aag gaa tta gga atc aat gct Asn Val Lys Thr Gly Ile Asp Ser Leu Lys Glu Leu Gly Ile Asn Ala 370 375 380	1248
gtt caa tta cag ccg att gaa gaa ttt aac agc att gat gaa acc caa Val Gln Leu Gln Pro Ile Glu Glu Phe Asn Ser Ile Asp Glu Thr Gln 385 390 395	1296
cca aat atg tat aac tgg ggc tat gac cca aga aac tac aac gtc cct Pro Asn Met Tyr Asn Trp Gly Tyr Asp Pro Arg Asn Tyr Asn Val Pro 400 405 410 415	1344
gaa gga gcg tat gca act aca cca gaa gga acg gct cgc att acc cag Glu Gly Ala Tyr Ala Thr Thr Pro Glu Gly Thr Ala Arg Ile Thr Gln 420 425 430	1392
tta aag caa ctg att caa agc att cat aaa gat cgg att gct atc aat Leu Lys Gln Leu Ile Gln Ser Ile His Lys Asp Arg Ile Ala Ile Asn 435 440 445	1440
atg gat gtg gtc tat aac cat acc ttt aac gta gga gtg tct gat ttt Met Asp Val Val Tyr Asn His Thr Phe Asn Val Gly Val Ser Asp Phe 450 455 460	1488
gat aag att gtt ccg caa tac tat tat cgg aca gac agc gca ggt aat Asp Lys Ile Val Pro Gln Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asp Ser Ala Gly Asn 465 470 475	1536
tat acg aac ggc tca ggt gta ggt aat gaa att gcg acc gag cgt ccg Tyr Thr Asn Gly Ser Gly Val Gly Asn Glu Ile Ala Thr Glu Arg Pro 480 485 490 495	1584
atg gtc caa aag ttc gtt ctg gat tct gtt aaa tat tgg gta aag gaa Met Val Gln Lys Phe Val Leu Asp Ser Val Lys Tyr Trp Val Lys Glu 500 505 510	1632
tac cat atc gac ggc ttc cgt ttc gat ctt atg gct ctt tta gga aaa Tyr His Ile Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Met Ala Leu Leu Gly Lys 515 520 525	1680
gac acc atg gcc aaa ata tca aaa gag ctt cat gct att aat cct ggc Asp Thr Met Ala Lys Ile Ser Lys Glu Leu His Ala Ile Asn Pro Gly 530 535 540	1728
att gtc ctg tat gga gaa cca tgg act ggc ggt acc tct gga tta tca Ile Val Leu Tyr Gly Glu Pro Trp Thr Gly Gly Thr Ser Gly Leu Ser 545 550 555	1776

ES 2 551 711 T3

agc gac caa ctc gtt acg aaa ggt cag caa aag ggc ttg gga att ggc Ser Asp Gln Leu Val Thr Lys Gly Gln Gln Lys Gly Leu Gly Ile Gly 560 565 570 575	1824
gta ttc aac gat aat att cgg aac gga ctc gat ggt aac gtt ttt gat Val Phe Asn Asp Asn Ile Arg Asn Gly Leu Asp Gly Asn Val Phe Asp 580 585 590	1872
aaa tcg gca caa gga ttt gca aca gga gat cca aac caa gtt aat gtc Lys Ser Ala Gln Gly Phe Ala Thr Gly Asp Pro Asn Gln Val Asn Val 595 600 605	1920
att aaa aat gga gtt atg gga agt att tca gat ttc act tcg gca cct Ile Lys Asn Gly Val Met Gly Ser Ile Ser Asp Phe Thr Ser Ala Pro 610 615 620	1968
agc gaa acc att aac tat gta aca agc cat gat aat atg aca ttg tgg Ser Glu Thr Ile Asn Tyr Val Thr Ser His Asp Asn Met Thr Leu Trp 625 630 635	2016
gat aaa att agc gca agt aat ccg aac gat aca caa gca gat cga att Asp Lys Ile Ser Ala Ser Asn Pro Asn Asp Thr Gln Ala Asp Arg Ile 640 645 650 655	2064
aag atg gat gaa ttg gct caa gct gtg gta ttt act tca caa ggg gta Lys Met Asp Glu Leu Ala Gln Ala Val Val Phe Thr Ser Gln Gly Val 660 665 670	2112
cca ttt atg caa ggt gga gaa gaa atg ctg cgg aca aaa ggc ggt aat Pro Phe Met Gln Gly Gly Glu Glu Met Leu Arg Thr Lys Gly Gly Asn 675 680 685	2160
gat aat agt tac aat gcc ggg gat agc gtg aat cag ttc gat tgg tca Asp Asn Ser Tyr Asn Ala Gly Asp Ser Val Asn Gln Phe Asp Trp Ser 690 695 700	2208
aga aaa gca caa ttt gaa aat gta ttc gac tac tat tct tgg ttg att Arg Lys Ala Gln Phe Glu Asn Val Phe Asp Tyr Tyr Ser Trp Leu Ile 705 710 715	2256
cat cta cgt gat aat cac cca gca ttc cgt atg acg aca gcg gat caa His Leu Arg Asp Asn His Pro Ala Phe Arg Met Thr Thr Ala Asp Gln 720 725 730 735	2304
atc aaa caa aat ctc act ttc ttg gat agc cca acg aac act gta gca Ile Lys Gln Asn Leu Thr Phe Leu Asp Ser Pro Thr Asn Thr Val Ala 740 745 750	2352
ttt gaa tta aaa aat cat gcc aat cat gat aaa tgg aaa aac att ata Phe Glu Leu Lys Asn His Ala Asn His Asp Lys Trp Lys Asn Ile Ile 755 760 765	2400
gtt atg tat aat cca aat aaa act gca caa act ctc act cta cca agt Val Met Tyr Asn Pro Asn Lys Thr Ala Gln Thr Leu Thr Leu Pro Ser 770 775 780	2448
gga aat tgg aca att gta gga tta ggc aat caa gta ggt gag aaa tca Gly Asn Trp Thr Ile Val Gly Leu Gly Asn Gln Val Gly Glu Lys Ser 785 790 795	2496
cta ggc cat gta aat ggc acg gtt gag gtg cca gct ctt agt acg atc Leu Gly His Val Asn Gly Thr Val Glu Val Pro Ala Leu Ser Thr Ile 800 805 810 815	2544
att ctt cat cag ggt aca tct gaa gat gtc att gat caa aat taa Ile Leu His Gln Gly Thr Ser Glu Asp Val Ile Asp Gln Asn 820 825	2589

ES 2 551 711 T3

<210> 4

<211> 862

<212> PRT

5 <213> Bacillus acidopullulyticus

<400> 4

Met Ser Leu Ile Arg Ser Arg Tyr Asn His Phe Val Ile Leu Phe Thr
-30 -25 -20

Val Ala Ile Met Phe Leu Thr Val Cys Phe Pro Ala Tyr Lys Ala Leu
-15 -10 -5

Ala Asp Ser Thr Ser Thr Glu Val Ile Val His Tyr His Arg Phe Asp
-1 1 5 10 15

Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Asp Leu Trp Met Trp Pro Tyr Gln Pro Val
20 25 30

Asn Gly Asn Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Ser Gly Lys Asp Asp Phe Gly
35 40 45

Val Lys Ala Asp Val Gln Val Pro Gly Asp Asp Thr Gln Val Gly Leu
50 55 60

Ile Val Arg Thr Asn Asp Trp Ser Gln Lys Asn Thr Ser Asp Asp Leu
65 70 75

His Ile Asp Leu Thr Lys Gly His Glu Ile Trp Ile Val Gln Gly Asp
80 85 90 95

Pro Asn Ile Tyr Tyr Asn Leu Ser Asp Ala Gln Ala Ala Ala Thr Pro
100 105 110

Lys Val Ser Asn Ala Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Thr Val Leu Ala Lys
115 120 125

Leu Thr Asn Pro Met Thr Leu Ser Asp Gly Ser Ser Gly Phe Thr Val
130 135 140

Thr Asp Lys Thr Thr Gly Glu Gln Ile Pro Val Thr Ala Ala Thr Asn
145 150 155

ES 2 551 711 T3

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

ES 2 551 711 T3

Pro Asn Met Tyr Asn Trp Gly Tyr Asp Pro Arg Asn Tyr Asn Val Pro
 400 405 410 415
 Glu Gly Ala Tyr Ala Thr Thr Pro Glu Gly Thr Ala Arg Ile Thr Gln
 420 425 430
 Leu Lys Gln Leu Ile Gln Ser Ile His Lys Asp Arg Ile Ala Ile Asn
 435 440 445
 Met Asp Val Val Tyr Asn His Thr Phe Asn Val Gly Val Ser Asp Phe
 450 455 460
 Asp Lys Ile Val Pro Gln Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asp Ser Ala Gly Asn
 465 470 475
 Tyr Thr Asn Gly Ser Gly Val Gly Asn Glu Ile Ala Thr Glu Arg Pro
 480 485 490 495
 Met Val Gln Lys Phe Val Leu Asp Ser Val Lys Tyr Trp Val Lys Glu
 500 505 510
 Tyr His Ile Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Met Ala Leu Leu Gly Lys
 515 520 525
 Asp Thr Met Ala Lys Ile Ser Lys Glu Leu His Ala Ile Asn Pro Gly
 530 535 540
 Ile Val Leu Tyr Gly Glu Pro Trp Thr Gly Gly Thr Ser Gly Leu Ser
 545 550 555
 Ser Asp Gln Leu Val Thr Lys Gly Gln Gln Lys Gly Leu Gly Ile Gly
 560 565 570 575
 Val Phe Asn Asp Asn Ile Arg Asn Gly Leu Asp Gly Asn Val Phe Asp
 580 585 590
 Lys Ser Ala Gln Gly Phe Ala Thr Gly Asp Pro Asn Gln Val Asn Val
 595 600 605
 Ile Lys Asn Gly Val Met Gly Ser Ile Ser Asp Phe Thr Ser Ala Pro
 610 615 620
 Ser Glu Thr Ile Asn Tyr Val Thr Ser His Asp Asn Met Thr Leu Trp
 625 630 635

ES 2 551 711 T3

Asp Lys Ile Ser Ala Ser Asn Pro Asn Asp Thr Gln Ala Asp Arg Ile
640 645 650 655

Lys Met Asp Glu Leu Ala Gln Ala Val Val Phe Thr Ser Gln Gly Val
660 665 670

Pro Phe Met Gln Gly Gly Glu Glu Met Leu Arg Thr Lys Gly Gly Asn
675 680 685

Asp Asn Ser Tyr Asn Ala Gly Asp Ser Val Asn Gln Phe Asp Trp Ser
690 695 700

Arg Lys Ala Gln Phe Glu Asn Val Phe Asp Tyr Tyr Ser Trp Leu Ile
705 710 715

His Leu Arg Asp Asn His Pro Ala Phe Arg Met Thr Thr Ala Asp Gln
720 725 730 735

Ile Lys Gln Asn Leu Thr Phe Leu Asp Ser Pro Thr Asn Thr Val Ala
740 745 750

Phe Glu Leu Lys Asn His Ala Asn His Asp Lys Trp Lys Asn Ile Ile
755 760 765

Val Met Tyr Asn Pro Asn Lys Thr Ala Gln Thr Leu Thr Leu Pro Ser
770 775 780

Gly Asn Trp Thr Ile Val Gly Leu Gly Asn Gln Val Gly Glu Lys Ser
785 790 795

Leu Gly His Val Asn Gly Thr Val Glu Val Pro Ala Leu Ser Thr Ile
800 805 810 815

Ile Leu His Gln Gly Thr Ser Glu Asp Val Ile Asp Gln Asn
820 825

<210> 5

<211> 2589

5 <212> ADN

<213> Bacillus acidopullulyticus

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(2586)

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)..(99)

5 <220>
<221> mat peptide
<222> (100)..(2586)

10 <400> 5

ES 2 551 711 T3

gtg tcc cta ata cgt tct agg tat aat cat ttt gtc att ctt ttt act	48
Val Ser Leu Ile Arg Ser Arg Tyr Asn His Phe Val Ile Leu Phe Thr	
-30 -25 -20	
gtc gcc ata atg ttt cta aca gtt tgt ttc ccc gct tat aaa gct tta	96
Val Ala Ile Met Phe Leu Thr Val Cys Phe Pro Ala Tyr Lys Ala Leu	
-15 -10 -5	
gca gat tct acc tcg aca gaa gtc att gtg cat tat cat cgt ttt gat	144
Ala Asp Ser Thr Ser Thr Glu Val Ile Val His Tyr His Arg Phe Asp	
-1 1 5 10 15	
tct aac tat gca aat tgg gat cta tgg atg tgg cca tat caa cca gtt	192
Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Asp Leu Trp Met Trp Pro Tyr Gln Pro Val	
20 25 30	
aat ggt aat gga gca gca tac gag ttt tct gga aag gat gat ttt ggc	240
Asn Gly Asn Gly Ala Ala Tyr Glu Phe Ser Gly Lys Asp Asp Phe Gly	
35 40 45	
gtt aaa gca gat gtt caa gtg cct ggg gat gat aca cag gta ggt ctg	288
Val Lys Ala Asp Val Gln Val Pro Gly Asp Asp Thr Gln Val Gly Leu	
50 55 60	
att gtc cgt aca aat gat tgg agc caa aaa aat aca tca gac gat ctg	336
Ile Val Arg Thr Asn Asp Trp Ser Gln Lys Asn Thr Ser Asp Asp Leu	
65 70 75	
cat att gat ctg aca aag ggg cat gaa ata tgg att gtt cag ggg gat	384
His Ile Asp Leu Thr Lys Gly His Glu Ile Trp Ile Val Gln Gly Asp	
80 85 90 95	
ccc aat att tat tac aat ctg agt gat gcg cag gct gca gcg act cca	432
Pro Asn Ile Tyr Tyr Asn Leu Ser Asp Ala Gln Ala Ala Ala Thr Pro	
100 105 110	
aag gtt tcg aat gcg tat ttg gat aat gaa aaa aca gta ttg gca aag	480
Lys Val Ser Asn Ala Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Thr Val Leu Ala Lys	
115 120 125	
cta act aat cca atg aca tta tca gat gga tca agc ggc ttt acg gtt	528
Leu Thr Asn Pro Met Thr Leu Ser Asp Gly Ser Ser Gly Phe Thr Val	
130 135 140	
aca gat aaa aca aca ggg gaa caa att cca gtt acc gct gca aca aat	576
Thr Asp Lys Thr Thr Gly Glu Gln Ile Pro Val Thr Ala Ala Thr Asn	
145 150 155	
gcg aac tca gcc tcc tcg tct gag cag aca gac ttg gtt caa ttg acg	624
Ala Asn Ser Ala Ser Ser Ser Glu Gln Thr Asp Leu Val Gln Leu Thr	
160 165 170 175	
tta gcc agt gca ccg gat gtt tcc cat aca ata caa gta gga gca gcc	672
Leu Ala Ser Ala Pro Asp Val Ser His Thr Ile Gln Val Gly Ala Ala	
180 185 190	

ES 2 551 711 T3

ggt tat gaa gca gtc aat ctc ata cca cga aat gta tta aat ttg cct Gly Tyr Glu Ala Val Asn Leu Ile Pro Arg Asn Val Leu Asn Leu Pro 195 200 205	720
cgt tat tat tac agc gga aat gat tta ggt aac gtt tat tca aat aag Arg Tyr Tyr Tyr Ser Gly Asn Asp Leu Gly Asn Val Tyr Ser Asn Lys 210 215 220	768
gca acg gcc ttc cgt gta tgg gct cca act gct tcg gat gtc caa tta Ala Thr Ala Phe Arg Val Trp Ala Pro Thr Ala Ser Asp Val Gln Leu 225 230 235	816
ctt tta tac aat agt gaa aca gga cct gta acc aaa cag ctt gaa atg Leu Leu Tyr Asn Ser Glu Thr Gly Pro Val Thr Lys Gln Leu Glu Met 240 245 250 255	864
caa aag agt gat aac ggt aca tgg aaa ctg aag gtc cct ggt aat ctg Gln Lys Ser Asp Asn Gly Thr Trp Lys Leu Lys Val Pro Gly Asn Leu 260 265 270	912
aaa aat tgg tat tat ctc tat cag gta acg gtg aat ggg aag aca caa Lys Asn Trp Tyr Tyr Leu Tyr Gln Val Thr Val Asn Gly Lys Thr Gln 275 280 285	960
aca gcc gtt gac cct tat gtg cgt gct att tca gtc aat gca aca cgt Thr Ala Val Asp Pro Tyr Val Arg Ala Ile Ser Val Asn Ala Thr Arg 290 295 300	1008
ggt atg ata gtc gat tta gaa gat acg aat cct cct gga tgg aaa gaa Gly Met Ile Val Asp Leu Glu Asp Thr Asn Pro Pro Gly Trp Lys Glu 305 310 315	1056
gat cat caa cag aca cct gcg aac cca gtg gat gaa gta atc tac gaa Asp His Gln Gln Thr Pro Ala Asn Pro Val Asp Glu Val Ile Tyr Glu 320 325 330 335	1104
gtg cat gtg cgt gat ttt tcg att gat gct aat tca ggc atg aaa aat Val His Val Arg Asp Phe Ser Ile Asp Ala Asn Ser Gly Met Lys Asn 340 345 350	1152
aaa ggg aaa tat ctt gcc ttt aca gaa cat ggc aca aaa ggc cct gat Lys Gly Lys Tyr Leu Ala Phe Thr Glu His Gly Thr Lys Gly Pro Asp 355 360 365	1200
aac gtg aaa acg ggt att gat agt ttg aag gaa tta gga atc aat gct Asn Val Lys Thr Gly Ile Asp Ser Leu Lys Glu Leu Gly Ile Asn Ala 370 375 380	1248
gtt caa tta cag ccg att gaa gaa ttt aac agc att gat gaa acc caa Val Gln Leu Gln Pro Ile Glu Glu Phe Asn Ser Ile Asp Glu Thr Gln 385 390 395	1296
cca aat atg tat aac tgg ggc tat gac cca aga aac tac aac gtc cct Pro Asn Met Tyr Asn Trp Gly Tyr Asp Pro Arg Asn Tyr Asn Val Pro 400 405 410 415	1344
gaa gga gcg tat gca act aca cca gaa gga acg gct cgc att acc cag Glu Gly Ala Tyr Ala Thr Pro Glu Gly Thr Ala Arg Ile Thr Gln 420 425 430	1392

ES 2 551 711 T3

tta aag caa ctg att caa agc att cat aaa gat cgg att gct atc aat Leu Lys Gln Leu Ile Gln Ser Ile His Lys Asp Arg Ile Ala Ile Asn 435 440 445	1440
atg gat gtg gtc tat aac cat acc ttt aac gta gga gtg tct gat ttt Met Asp Val Val Tyr Asn His Thr Phe Asn Val Gly Val Ser Asp Phe 450 455 460	1488
gat aag att gtt ccg caa tac tat tat cgg aca gac agc gca ggt aat Asp Lys Ile Val Pro Gln Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asp Ser Ala Gly Asn 465 470 475	1536
tat acg aac ggc tca ggt gta ggt aat gaa att gcg acc gag cgt ccg Tyr Thr Asn Gly Ser Gly Val Gly Asn Glu Ile Ala Thr Glu Arg Pro 480 485 490 495	1584
atg gtc caa aag ttc gtt ctg gat tct gtt aaa tat tgg gta aag gaa Met Val Gln Lys Phe Val Leu Asp Ser Val Lys Tyr Trp Val Lys Glu 500 505 510	1632
tac cat atc gac ggc ttc cgt ttc gat ctt atg gct ctt tta gga aaa Tyr His Ile Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Met Ala Leu Leu Gly Lys 515 520 525	1680
gac acc atg gcc aaa ata tca aaa gag ctt cat gct att aat cct ggc Asp Thr Met Ala Lys Ile Ser Lys Glu Leu His Ala Ile Asn Pro Gly 530 535 540	1728
att gtc ctg tat gga gaa cca tgg act ggc ggt acc tct gga tta tca Ile Val Leu Tyr Gly Glu Pro Trp Thr Gly Gly Thr Ser Gly Leu Ser 545 550 555	1776
agc gac caa ctc gtt acg aaa ggt cag caa aag ggc ttg gga att ggc Ser Asp Gln Leu Val Thr Lys Gly Gln Gln Lys Gly Leu Gly Ile Gly 560 565 570 575	1824
gta ttc aac gat aat att cgg aac gga ctc gat ggt aac gtt ttt gat Val Phe Asn Asp Asn Ile Arg Asn Gly Leu Asp Gly Asn Val Phe Asp 580 585 590	1872
aaa tcg gca caa gga ttt gca aca gga gat cca aac caa gtt aat gtc Lys Ser Ala Gln Gly Phe Ala Thr Gly Asp Pro Asn Gln Val Asn Val 595 600 605	1920
att aaa aat aga gtt atg gga agt att tca gat ttc act tcg gca cct Ile Lys Asn Arg Val Met Gly Ser Ile Ser Asp Phe Thr Ser Ala Pro 610 615 620	1968
agc gaa acc att aac tat gta aca agc cat gat aat atg aca ttg tgg Ser Glu Thr Ile Asn Tyr Val Thr Ser His Asp Asn Met Thr Leu Trp 625 630 635	2016
gat aaa att agc gca agt aat ccg aac gat aca caa gca gat cga att Asp Lys Ile Ser Ala Ser Asn Pro Asn Asp Thr Gln Ala Asp Arg Ile 640 645 650 655	2064
aag atg gat gaa ttg gct caa gct gtg gta ttt act tca caa ggg gta Lys Met Asp Glu Leu Ala Gln Ala Val Val Phe Thr Ser Gln Gly Val 660 665 670	2112
cca ttt atg caa ggt gga gaa gaa atg ctg cgg aca aaa ggc ggt aat	2160

ES 2 551 711 T3

Pro	Phe	Met	Gln	Gly	Gly	Glu	Glu	Met	Leu	Arg	Thr	Lys	Gly	Gly	Asn		
			675					680					685				
gat	aat	agt	tac	aat	gcc	ggg	gat	agc	gtg	aat	cag	ttc	gat	tg	tca	2208	
Asp	Asn	Ser	Tyr	Asn	Ala	Gly	Asp	Ser	Val	Asn	Gln	Phe	Asp	Trp	Ser		
		690					695				700						
aga	aaa	gca	caa	ttt	gaa	aat	gta	ttc	gac	tac	tat	tct	tg	ttg	att	2256	
Arg	Lys	Ala	Gln	Phe	Glu	Asn	Val	Phe	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Trp	Leu	Ile		
	705					710					715						
cat	cta	cgt	gat	aat	cac	cca	gca	ttc	cgt	atg	acg	aca	gcg	gat	caa	2304	
His	Leu	Arg	Asp	Asn	His	Pro	Ala	Phe	Arg	Met	Thr	Thr	Ala	Asp	Gln		
	720				725					730					735		
atc	aaa	caa	aat	ctc	act	ttc	ttg	gat	agc	cca	acg	aac	act	gta	gca	2352	
Ile	Lys	Gln	Asn	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp	Ser	Pro	Thr	Asn	Thr	Val	Ala		
			740						745					750			
ttt	gaa	tta	aaa	aat	cat	gcc	aat	cat	gat	aaa	tg	aaa	aac	att	ata	2400	
Phe	Glu	Leu	Lys	Asn	His	Ala	Asn	His	Asp	Lys	Trp	Lys	Asn	Ile	Ile		
			755					760					765				
gtt	atg	tat	aat	cca	aat	aaa	act	gca	caa	act	ctc	act	cta	cca	agt	2448	
Val	Met	Tyr	Asn	Pro	Asn	Lys	Thr	Ala	Gln	Thr	Leu	Thr	Leu	Pro	Ser		
		770					775					780					
gga	aat	tg	aca	att	gta	gga	tta	ggc	aat	caa	gta	ggt	gag	aaa	tca	2496	
Gly	Asn	Trp	Thr	Ile	Val	Gly	Leu	Gly	Asn	Gln	Val	Gly	Glu	Lys	Ser		
	785					790					795						
cta	ggc	cat	gta	aat	ggc	acg	gtt	gag	gtg	cca	gct	ctt	agt	acg	atc	2544	
Leu	Gly	His	Val	Asn	Gly	Thr	Val	Glu	Val	Pro	Ala	Leu	Ser	Thr	Ile		
	800				805					810					815		
att	ctt	cat	cag	ggt	aca	tct	gaa	gat	gtc	att	gat	caa	aat	taa		2589	
Ile	Leu	His	Gln	Gly	Thr	Ser	Glu	Asp	Val	Ile	Asp	Gln	Asn				
			820						825								

<210> 6

<211> 862

5 <212> PRT

<213> Bacillus acidopullulyticus

<400> 6

ES 2 551 711 T3

Val Ser Leu Ile Arg Ser Arg Tyr Asn His Phe Val Ile Leu Phe Thr
 -30 -25 -20

Val Ala Ile Met Phe Leu Thr Val Cys Phe Pro Ala Tyr Lys Ala Leu
 -15 -10 -5

Ala Asp Ser Thr Ser Thr Glu Val Ile Val His Tyr His Arg Phe Asp
 -1 1 5 10 15

Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Asp Leu Trp Met Trp Pro Tyr Gln Pro Val
 20 25 30

ES 2 551 711 T3

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

ES 2 551 711 T3

Lys Asn Trp Tyr Tyr Leu Tyr Gln Val Thr Val Asn Gly Lys Thr Gln
 275 280 285
 Thr Ala Val Asp Pro Tyr Val Arg Ala Ile Ser Val Asn Ala Thr Arg
 290 295 300
 Gly Met Ile Val Asp Leu Glu Asp Thr Asn Pro Pro Gly Trp Lys Glu
 305 310 315
 Asp His Gln Gln Thr Pro Ala Asn Pro Val Asp Glu Val Ile Tyr Glu
 320 325 330 335
 Val His Val Arg Asp Phe Ser Ile Asp Ala Asn Ser Gly Met Lys Asn
 340 345 350
 Lys Gly Lys Tyr Leu Ala Phe Thr Glu His Gly Thr Lys Gly Pro Asp
 355 360 365
 Asn Val Lys Thr Gly Ile Asp Ser Leu Lys Glu Leu Gly Ile Asn Ala
 370 375 380
 Val Gln Leu Gln Pro Ile Glu Glu Phe Asn Ser Ile Asp Glu Thr Gln
 385 390 395
 Pro Asn Met Tyr Asn Trp Gly Tyr Asp Pro Arg Asn Tyr Asn Val Pro
 400 405 410 415
 Glu Gly Ala Tyr Ala Thr Thr Pro Glu Gly Thr Ala Arg Ile Thr Gln
 420 425 430
 Leu Lys Gln Leu Ile Gln Ser Ile His Lys Asp Arg Ile Ala Ile Asn
 435 440 445
 Met Asp Val Val Tyr Asn His Thr Phe Asn Val Gly Val Ser Asp Phe
 450 455 460
 Asp Lys Ile Val Pro Gln Tyr Tyr Tyr Arg Thr Asp Ser Ala Gly Asn
 465 470 475
 Tyr Thr Asn Gly Ser Gly Val Gly Asn Glu Ile Ala Thr Glu Arg Pro
 480 485 490 495
 Met Val Gln Lys Phe Val Leu Asp Ser Val Lys Tyr Trp Val Lys Glu
 500 505 510

ES 2 551 711 T3

Tyr His Ile Asp Gly Phe Arg Phe Asp Leu Met Ala Leu Leu Gly Lys
 515 520 525
 Asp Thr Met Ala Lys Ile Ser Lys Glu Leu His Ala Ile Asn Pro Gly
 530 535 540
 Ile Val Leu Tyr Gly Glu Pro Trp Thr Gly Gly Thr Ser Gly Leu Ser
 545 550 555
 Ser Asp Gln Leu Val Thr Lys Gly Gln Gln Lys Gly Leu Gly Ile Gly
 560 565 570 575
 Val Phe Asn Asp Asn Ile Arg Asn Gly Leu Asp Gly Asn Val Phe Asp
 580 585 590
 Lys Ser Ala Gln Gly Phe Ala Thr Gly Asp Pro Asn Gln Val Asn Val
 595 600 605
 Ile Lys Asn Arg Val Met Gly Ser Ile Ser Asp Phe Thr Ser Ala Pro
 610 615 620
 Ser Glu Thr Ile Asn Tyr Val Thr Ser His Asp Asn Met Thr Leu Trp
 625 630 635
 Asp Lys Ile Ser Ala Ser Asn Pro Asn Asp Thr Gln Ala Asp Arg Ile
 640 645 650 655
 Lys Met Asp Glu Leu Ala Gln Ala Val Val Phe Thr Ser Gln Gly Val
 660 665 670
 Pro Phe Met Gln Gly Gly Glu Glu Met Leu Arg Thr Lys Gly Gly Asn
 675 680 685
 Asp Asn Ser Tyr Asn Ala Gly Asp Ser Val Asn Gln Phe Asp Trp Ser
 690 695 700
 Arg Lys Ala Gln Phe Glu Asn Val Phe Asp Tyr Tyr Ser Trp Leu Ile
 705 710 715
 His Leu Arg Asp Asn His Pro Ala Phe Arg Met Thr Thr Ala Asp Gln
 720 725 730 735
 Ile Lys Gln Asn Leu Thr Phe Leu Asp Ser Pro Thr Asn Thr Val Ala
 740 745 750
 Phe Glu Leu Lys Asn His Ala Asn His Asp Lys Trp Lys Asn Ile Ile

ES 2 551 711 T3

755

760

765

Val Met Tyr Asn Pro Asn Lys Thr Ala Gln Thr Leu Thr Leu Pro Ser
770 775 780

Gly Asn Trp Thr Ile Val Gly Leu Gly Asn Gln Val Gly Glu Lys Ser
785 790 795

Leu Gly His Val Asn Gly Thr Val Glu Val Pro Ala Leu Ser Thr Ile
800 805 810 815

Ile Leu His Gln Gly Thr Ser Glu Asp Val Ile Asp Gln Asn
820 825

<210> 7

<211> 483

5 <212> PRT

<213> Bacillus licheniformis

<220>

<221> mat_peptide

10 <222> (1)..(483)

<400> 7

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

Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn
85 90 95

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

Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val
115 120 125

ES 2 551 711 T3

Ile	Ser	Gly	Glu	His	Leu	Ile	Lys	Ala	Trp	Thr	His	Phe	His	Phe	Pro	130	135	140	
Gly	Arg	Gly	Ser	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	His	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	Gln	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Ser	Asn	Glu	Asn	Gly	Asn	180	185	190	
Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Ile	Asp	Tyr	Asp	His	Pro	Asp	Val	195	200	205	
Ala	Ala	Glu	Ile	Lys	Arg	Trp	Gly	Thr	Trp	Tyr	Ala	Asn	Glu	Leu	Gln	210	215	220	
Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys	Phe	Ser	Phe	225	230	235	240
Leu	Arg	Asp	Trp	Val	Asn	His	Val	Arg	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Glu	Met	245	250	255	
Phe	Thr	Val	Ala	Glu	Tyr	Trp	Gln	Asn	Asp	Leu	Gly	Ala	Leu	Glu	Asn	260	265	270	
Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Asn	Phe	Asn	His	Ser	Val	Phe	Asp	Val	Pro	Leu	275	280	285	
His	Tyr	Gln	Phe	His	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asp	Met	290	295	300	
Arg	Lys	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Val	Ser	Lys	His	Pro	Leu	Lys	Ser	305	310	315	320
Val	Thr	Phe	Val	Asp	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	

ES 2 551 711 T3

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> 8

<211> 2160

5 <212> ADN

<213> Bacillus sp.

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(2157)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (100)..(2157)

15

<400> 8

atg aaa aag aaa acg ctt tct tta ttt gtg gga ctg atg ctc ctc atc 48
Met Lys Lys Lys Thr Leu Ser Leu Phe Val Gly Leu Met Leu Leu Ile
-30 -25 -20

ggt ctt ctg ttc agc ggt tct ctt ccg tac aat cca aac gcc gct gaa 96
Gly Leu Leu Phe Ser Gly Ser Leu Pro Tyr Asn Pro Asn Ala Ala Glu
-15 -10 -5

gcc agc agt tcc gca agc gtc aaa ggg gac gtg att tac cag att atc 144
Ala Ser Ser Ser Ala Ser Val Lys Gly Asp Val Ile Tyr Gln Ile Ile
-1 1 5 10 15

att gac cgg ttt tac gat ggg gac acg acg aac aac aat cct gcc aaa 192

ES 2 551 711 T3

Ile	Asp	Arg	Phe	Tyr	Asp	Gly	Asp	Thr	Thr	Asn	Asn	Asn	Pro	Ala	Lys	
			20						25					30		
agt	tat	gga	ctt	tac	gat	ccg	acc	aaa	tcg	aag	tgg	aaa	atg	tat	tgg	240
Ser	Tyr	Gly	Leu	Tyr	Asp	Pro	Thr	Lys	Ser	Lys	Trp	Lys	Met	Tyr	Trp	
			35					40					45			
ggc	ggg	gat	ctg	gag	ggg	gtt	cgt	caa	aaa	ctt	cct	tat	ctt	aaa	cag	288
Gly	Gly	Asp	Leu	Glu	Gly	Val	Arg	Gln	Lys	Leu	Pro	Tyr	Leu	Lys	Gln	
			50				55					60				
ctg	ggc	gta	acg	aca	atc	tgg	ttg	tcc	ccg	gtt	ttg	gac	aat	ctg	gat	336
Leu	Gly	Val	Thr	Thr	Ile	Trp	Leu	Ser	Pro	Val	Leu	Asp	Asn	Leu	Asp	
			65			70					75					
aca	ctg	gcg	ggc	acc	gat	aac	acg	ggc	tat	cac	gga	tac	tgg	acg	cgc	384
Thr	Leu	Ala	Gly	Thr	Asp	Asn	Thr	Gly	Tyr	His	Gly	Tyr	Trp	Thr	Arg	
80					85				90						95	
gat	ttt	aaa	cag	att	gag	gaa	cat	ttc	ggg	aat	tgg	acc	aca	ttt	gac	432
Asp	Phe	Lys	Gln	Ile	Glu	Glu	His	Phe	Gly	Asn	Trp	Thr	Thr	Phe	Asp	
				100					105					110		
acg	ttg	gtc	aat	gat	gct	cac	caa	aac	gga	atc	aag	gtg	att	gtc	gac	480
Thr	Leu	Val	Asn	Asp	Ala	His	Gln	Asn	Gly	Ile	Lys	Val	Ile	Val	Asp	
			115					120					125			
ttt	gtg	ccc	aat	cat	tcg	act	cct	ttt	aag	gca	aac	gat	tcc	acc	ttt	528
Phe	Val	Pro	Asn	His	Ser	Thr	Pro	Phe	Lys	Ala	Asn	Asp	Ser	Thr	Phe	
		130					135					140				
gcg	gaa	ggc	ggc	gcc	ctc	tac	aac	aat	gga	acc	tat	atg	ggc	aat	tat	576
Ala	Glu	Gly	Gly	Ala	Leu	Tyr	Asn	Asn	Gly	Thr	Tyr	Met	Gly	Asn	Tyr	
		145				150					155					
ttt	gat	gac	gca	aca	aaa	ggg	tac	ttc	cac	cat	aat	ggg	gac	atc	agc	624
Phe	Asp	Asp	Ala	Thr	Lys	Gly	Tyr	Phe	His	His	Asn	Gly	Asp	Ile	Ser	
160						165				170					175	
aac	tgg	gac	gac	cgg	tac	gag	gcg	caa	tgg	aaa	aac	ttc	acg	gat	cca	672
Asn	Trp	Asp	Asp	Arg	Tyr	Glu	Ala	Gln	Trp	Lys	Asn	Phe	Thr	Asp	Pro	
				180					185					190		
gcc	ggt	ttc	tcg	ctt	gcc	gat	ttg	tcg	cag	gaa	aat	ggc	acg	att	gct	720
Ala	Gly	Phe	Ser	Leu	Ala	Asp	Leu	Ser	Gln	Glu	Asn	Gly	Thr	Ile	Ala	
			195					200					205			
caa	tac	ctg	acc	gat	gcg	gcg	gtt	caa	ttg	gta	gca	cat	gga	gcg	gat	768
Gln	Tyr	Leu	Thr	Asp	Ala	Ala	Val	Gln	Leu	Val	Ala	His	Gly	Ala	Asp	
		210					215					220				
ggt	ttg	cgg	att	gat	gcg	gtg	aag	cat	ttt	aat	tcg	ggg	ttc	tcc	aaa	816
Gly	Leu	Arg	Ile	Asp	Ala	Val	Lys	His	Phe	Asn	Ser	Gly	Phe	Ser	Lys	
		225				230					235					
tcg	ttg	gcc	gat	aaa	ctg	tac	caa	aag	aaa	gac	att	ttc	ctg	gtg	ggg	864
Ser	Leu	Ala	Asp	Lys	Leu	Tyr	Gln	Lys	Lys	Asp	Ile	Phe	Leu	Val	Gly	
240						245				250					255	
gaa	tgg	tac	gga	gat	gac	ccc	gga	aca	gcc	aat	cat	ctg	gaa	aag	gtc	912
Glu	Trp	Tyr	Gly	Asp	Asp	Pro	Gly	Thr	Ala	Asn	His	Leu	Glu	Lys	Val	

ES 2 551 711 T3

260	265	270	
cgg tac gcc aac aac agc ggt gtc aat gtg ctg gat ttt gat ctc aac Arg Tyr Ala Asn Asn Ser Gly Val Asn Val Leu Asp Phe Asp Leu Asn 275 280 285			960
acg gtg att cga aat gtg ttc ggc aca ttt acg caa acg atg tac gat Thr Val Ile Arg Asn Val Phe Gly Thr Phe Thr Gln Thr Met Tyr Asp 290 295 300			1008
ctt aac aat atg gtg aac caa acg ggg aac gag tac aaa tac aaa gaa Leu Asn Asn Met Val Asn Gln Thr Gly Asn Glu Tyr Lys Tyr Lys Glu 305 310 315			1056
aat cta atc aca ttt atc gat aac cat gat atg tca aga ttt ctt tcg Asn Leu Ile Thr Phe Ile Asp Asn His Asp Met Ser Arg Phe Leu Ser 320 325 330 335			1104
gta aat tcg aac aag gcg aat ttg cac cag gcg ctt gct ttc att ctc Val Asn Ser Asn Lys Ala Asn Leu His Gln Ala Leu Ala Phe Ile Leu 340 345 350			1152
act tcg cgg ggt acg ccc tcc atc tat tat gga acc gaa caa tac atg Thr Ser Arg Gly Thr Pro Ser Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Met 355 360 365			1200
gca ggc ggc aat gac ccg tac aac cgg ggg atg atg ccg gcg ttt gat Ala Gly Gly Asn Asp Pro Tyr Asn Arg Gly Met Met Pro Ala Phe Asp 370 375 380			1248
acg aca acc acc gcc ttt aaa gag gtg tca act ctg gcg ggg ttg cgc Thr Thr Thr Thr Ala Phe Lys Glu Val Ser Thr Leu Ala Gly Leu Arg 385 390 395			1296
agg aac aat gcg gcg atc cag tac ggc acc acc acc cag cgt tgg atc Arg Asn Asn Ala Ala Ile Gln Tyr Gly Thr Thr Thr Gln Arg Trp Ile 400 405 410 415			1344
aac aat gat gtt tac att tat gaa cgg aaa ttt ttc aac gat gtc gtg Asn Asn Asp Val Tyr Ile Tyr Glu Arg Lys Phe Phe Asn Asp Val Val 420 425 430			1392
ttg gtg gcc atc aat cga aac acg caa tcc tcc tat tcg att tcc ggt Leu Val Ala Ile Asn Arg Asn Thr Gln Ser Ser Tyr Ser Ile Ser Gly 435 440 445			1440
ttg cag acg gcc ttg cca aat ggc agc tat gcg gat tat ctg tca ggg Leu Gln Thr Ala Leu Pro Asn Gly Ser Tyr Ala Asp Tyr Leu Ser Gly 450 455 460			1488
ctg ttg ggg ggg aac ggg att tcc gtt tcc aat gga agt gtc gct tcg Leu Leu Gly Gly Asn Gly Ile Ser Val Ser Asn Gly Ser Val Ala Ser 465 470 475			1536
ttc acg ctt gcg cct gga gcc gtg tct gtt tgg cag tac agc aca tcc Phe Thr Leu Ala Pro Gly Ala Val Ser Val Trp Gln Tyr Ser Thr Ser 480 485 490 495			1584
gct tca gcg ccg caa atc gga tcg gtt gct cca aat atg ggg att ccg Ala Ser Ala Pro Gln Ile Gly Ser Val Ala Pro Asn Met Gly Ile Pro 500 505 510			1632

ES 2 551 711 T3

ggt aat gtg gtc acg atc gac ggg aaa ggt ttt ggg acg acg cag gga Gly Asn Val Val Thr Ile Asp Gly Lys Gly Phe Gly Thr Thr Gln Gly 515 520 525	1680
acc gtg aca ttt ggc gga gtg aca gcg act gtg aaa tcc tgg aca tcc Thr Val Thr Phe Gly Gly Val Thr Ala Thr Val Lys Ser Trp Thr Ser 530 535 540	1728
aat cgg att gaa gtg tac gtt ccc aac atg gcc gcc ggg ctg acc gat Asn Arg Ile Glu Val Tyr Val Pro Asn Met Ala Ala Gly Leu Thr Asp 545 550 555	1776
gtg aaa gtc acc gcg ggt gga gtt tcc agc aat ctg tat tct tac aat Val Lys Val Thr Ala Gly Gly Val Ser Ser Asn Leu Tyr Ser Tyr Asn 560 565 570 575	1824
att ttg agt gga acg cag aca tcg gtt gtg ttt act gtg aaa agt gcg Ile Leu Ser Gly Thr Gln Thr Ser Val Val Phe Thr Val Lys Ser Ala 580 585 590	1872
cct ccg acc aac ctg ggg gat aag att tac ctg acg ggc aac ata ccg Pro Pro Thr Asn Leu Gly Asp Lys Ile Tyr Leu Thr Gly Asn Ile Pro 595 600 605	1920
gaa ttg ggg aat tgg agc acg gat acg agc gga gcc gtt aac aat gcg Glu Leu Gly Asn Trp Ser Thr Asp Thr Ser Gly Ala Val Asn Asn Ala 610 615 620	1968
caa ggg ccc ctg ctc gcg ccc aat tat ccg gat tgg ttt tat gta ttc Gln Gly Pro Leu Leu Ala Pro Asn Tyr Pro Asp Trp Phe Tyr Val Phe 625 630 635	2016
agc gtt cca gca gga aag acg att caa ttc aag ttc ttc atc aag cgt Ser Val Pro Ala Gly Lys Thr Ile Gln Phe Lys Phe Phe Ile Lys Arg 640 645 650 655	2064
gcg gat gga acg att caa tgg gag aat ggt tcg aac cac gtg gcc aca Ala Asp Gly Thr Ile Gln Trp Glu Asn Gly Ser Asn His Val Ala Thr 660 665 670	2112
act ccc acg ggt gca acc ggt aac att act gtt acg tgg caa aac tag Thr Pro Thr Gly Ala Thr Gly Asn Ile Thr Val Thr Trp Gln Asn 675 680 685	2160

<210> 9

<211> 719

5 <212> PRT

<213> Bacillus sp.

<400> 9

Met Lys Lys Lys Thr Leu Ser Leu Phe Val Gly Leu Met Leu Leu Ile -30 -25 -20
--

Gly Leu Leu Phe Ser Gly Ser Leu Pro Tyr Asn Pro Asn Ala Ala Glu -15 -10 -5

ES 2 551 711 T3

Ala Ser Ser Ser Ala Ser Val Lys Gly Asp Val Ile Tyr Gln Ile Ile
-1 1 5 10 15

Ile Asp Arg Phe Tyr Asp Gly Asp Thr Thr Asn Asn Asn Pro Ala Lys
20 25 30

Ser Tyr Gly Leu Tyr Asp Pro Thr Lys Ser Lys Trp Lys Met Tyr Trp
35 40 45

Gly Gly Asp Leu Glu Gly Val Arg Gln Lys Leu Pro Tyr Leu Lys Gln
50 55 60

Leu Gly Val Thr Thr Ile Trp Leu Ser Pro Val Leu Asp Asn Leu Asp
65 70 75

Thr Leu Ala Gly Thr Asp Asn Thr Gly Tyr His Gly Tyr Trp Thr Arg
80 85 90 95

Asp Phe Lys Gln Ile Glu Glu His Phe Gly Asn Trp Thr Thr Phe Asp
100 105 110

Thr Leu Val Asn Asp Ala His Gln Asn Gly Ile Lys Val Ile Val Asp
115 120 125

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

Ala Glu Gly Gly Ala Leu Tyr Asn Asn Gly Thr Tyr Met Gly Asn Tyr
145 150 155

Phe Asp Asp Ala Thr Lys Gly Tyr Phe His His Asn Gly Asp Ile Ser
160 165 170 175

Asn Trp Asp Asp Arg Tyr Glu Ala Gln Trp Lys Asn Phe Thr Asp Pro
180 185 190

Ala Gly Phe Ser Leu Ala Asp Leu Ser Gln Glu Asn Gly Thr Ile Ala
195 200 205

Gln Tyr Leu Thr Asp Ala Ala Val Gln Leu Val Ala His Gly Ala Asp
210 215 220

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

Ser Leu Ala Asp Lys Leu Tyr Gln Lys Lys Asp Ile Phe Leu Val Gly

ES 2 551 711 T3

240		245		250		255
Glu Trp Tyr Gly Asp Asp Pro Gly Thr Ala Asn His Leu Glu Lys Val	260		265		270	
Arg Tyr Ala Asn Asn Ser Gly Val Asn Val Leu Asp Phe Asp Leu Asn	275		280		285	
Thr Val Ile Arg Asn Val Phe Gly Thr Phe Thr Gln Thr Met Tyr Asp	290		295		300	
Leu Asn Asn Met Val Asn Gln Thr Gly Asn Glu Tyr Lys Tyr Lys Glu	305		310		315	
Asn Leu Ile Thr Phe Ile Asp Asn His Asp Met Ser Arg Phe Leu Ser	320		325		330	335
Val Asn Ser Asn Lys Ala Asn Leu His Gln Ala Leu Ala Phe Ile Leu	340		345		350	
Thr Ser Arg Gly Thr Pro Ser Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Met	355		360		365	
Ala Gly Gly Asn Asp Pro Tyr Asn Arg Gly Met Met Pro Ala Phe Asp	370		375		380	
Thr Thr Thr Thr Ala Phe Lys Glu Val Ser Thr Leu Ala Gly Leu Arg	385		390		395	
Arg Asn Asn Ala Ala Ile Gln Tyr Gly Thr Thr Thr Gln Arg Trp Ile	400		405		410	415
Asn Asn Asp Val Tyr Ile Tyr Glu Arg Lys Phe Phe Asn Asp Val Val	420		425		430	
Leu Val Ala Ile Asn Arg Asn Thr Gln Ser Ser Tyr Ser Ile Ser Gly	435		440		445	
Leu Gln Thr Ala Leu Pro Asn Gly Ser Tyr Ala Asp Tyr Leu Ser Gly	450		455		460	
Leu Leu Gly Gly Asn Gly Ile Ser Val Ser Asn Gly Ser Val Ala Ser	465		470		475	
Phe Thr Leu Ala Pro Gly Ala Val Ser Val Trp Gln Tyr Ser Thr Ser	480		485		490	495

ES 2 551 711 T3

Ala Ser Ala Pro Gln Ile Gly Ser Val Ala Pro Asn Met Gly Ile Pro
500 505 510

Gly Asn Val Val Thr Ile Asp Gly Lys Gly Phe Gly Thr Thr Gln Gly
515 520 525

Thr Val Thr Phe Gly Gly Val Thr Ala Thr Val Lys Ser Trp Thr Ser
530 535 540

Asn Arg Ile Glu Val Tyr Val Pro Asn Met Ala Ala Gly Leu Thr Asp
545 550 555

Val Lys Val Thr Ala Gly Gly Val Ser Ser Asn Leu Tyr Ser Tyr Asn
560 565 570 575

Ile Leu Ser Gly Thr Gln Thr Ser Val Val Phe Thr Val Lys Ser Ala
580 585 590

Pro Pro Thr Asn Leu Gly Asp Lys Ile Tyr Leu Thr Gly Asn Ile Pro
595 600 605

Glu Leu Gly Asn Trp Ser Thr Asp Thr Ser Gly Ala Val Asn Asn Ala
610 615 620

Gln Gly Pro Leu Leu Ala Pro Asn Tyr Pro Asp Trp Phe Tyr Val Phe
625 630 635

Ser Val Pro Ala Gly Lys Thr Ile Gln Phe Lys Phe Phe Ile Lys Arg
640 645 650 655

Ala Asp Gly Thr Ile Gln Trp Glu Asn Gly Ser Asn His Val Ala Thr
660 665 670

Thr Pro Thr Gly Ala Thr Gly Asn Ile Thr Val Thr Trp Gln Asn
675 680 685

<210> 10

<211> 514

5 <212> PRT

<213> Bacillus stearothermophilus

<220>

<221> mat_peptide

10 <222> (1)..(514)

ES 2 551 711 T3

<400> 10

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	Ala	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	
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	Ser	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

ES 2 551 711 T3

Phe Ser Phe Phe Pro Asp Trp Leu Ser Asp 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 Met 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 Thr
 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 Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Trp Ser Ile Thr Thr

ES 2 551 711 T3

485

490

495

Arg Pro Trp Thr Asp Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val
500 505 510

Ala Trp

<210> 11

<211> 484

5 <212> PRT

<213> Aspergillus niger

<220>

<221> mat_peptide

10 <222> (1)..(484)

<400> 11

Leu Ser Ala Ala Ser Trp Arg Thr Gln Ser Ile Tyr Phe Leu Leu Thr
1 5 10 15

Asp Arg Phe Gly Arg Thr Asp Asn Ser Thr Thr Ala Thr Cys Asn Thr
20 25 30

Gly Asn Glu Ile Tyr Cys Gly Gly Ser Trp Gln Gly Ile Ile Asp His
35 40 45

Leu Asp Tyr Ile Glu Gly Met Gly Phe Thr Ala Ile Trp Ile Ser Pro
50 55 60

Ile Thr Glu Gln Leu Pro Gln Asp Thr Ala Asp Gly Glu Ala Tyr His
65 70 75 80

Gly Tyr Trp Gln Gln Lys Ile Tyr Asp Val Asn Ser Asn Phe Gly Thr
85 90 95

Ala Asp Asn Leu Lys Ser Leu Ser Asp Ala Leu His Ala Arg Gly Met
100 105 110

Tyr Leu Met Val Asp Val Val Pro Asp His Met Gly Tyr Ala Gly Asn
115 120 125

Gly Asn Asp Val Asp Tyr Ser Val Phe Asp Pro Phe Asp Ser Ser Ser
130 135 140

Tyr Phe His Pro Tyr Cys Leu Ile Thr Asp Trp Asp Asn Leu Thr Met
145 150 155 160

ES 2 551 711 T3

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

ES 2 551 711 T3

Ser Gly Ser Gln Val Ile Thr Val Leu Ser Asn Lys Gly Ser Ser Gly
405 410 415

Ser Ser Tyr Thr Leu Thr Leu Ser Gly Ser Gly Tyr Thr Ser Gly Thr
420 425 430

Lys Leu Ile Glu Ala Tyr Thr Cys Thr Ser Val Thr Val Asp Ser Ser
435 440 445

Gly Asp Ile Pro Val Pro Met Ala Ser Gly Leu Pro Arg Val Leu Leu
450 455 460

Pro Ala Ser Val Val Asp Ser Ser Ser Leu Cys Gly Gly Ser Gly Arg
465 470 475 480

Leu Tyr Val Glu

<210> 12

<211> 435

5 <212> PRT

<213> Humicola insolens

<220>

<221> mat_peptide

10 <222> (1)..(435)

<400> 12

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

Leu Val Asn Gly Gln Lys Pro Gly Glu Thr Lys Glu Val His Pro Gln
20 25 30

Leu Thr Thr Phe Arg Cys Thr Lys Arg Gly Gly Cys Lys Pro Ala Thr
35 40 45

Asn Phe Ile Val Leu Asp Ser Leu Ser His Pro Ile His Arg Ala Glu
50 55 60

Gly Leu Gly Pro Gly Gly Cys Gly Asp Trp Gly Asn Pro Pro Pro Lys
65 70 75 80

Asp Val Cys Pro Asp Val Glu Ser Cys Ala Lys Asn Cys Ile Met Glu
85 90 95

ES 2 551 711 T3

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

ES 2 551 711 T3

	340		345		350
	Gly Glu Ala Leu Thr Arg Gly Met Val Leu Ala Met Ser Ile Trp Trp				
	355		360		365
	Asp Gln Gly Gly Asn Met Glu Trp Leu Asp His Gly Glu Ala Gly Pro				
	370		375		380
	Cys Ala Lys Gly Glu Gly Ala Pro Ser Asn Ile Val Gln Val Glu Pro				
	385		390		395 400
	Phe Pro Glu Val Thr Tyr Thr Asn Leu Arg Trp Gly Glu Ile Gly Ser				
	405		410		415
	Thr Tyr Gln Glu Val Gln Lys Pro Lys Pro Lys Pro Gly His Gly Pro				
	420		425		430
	Arg Ser Asp				
	435				

5 <210> 13
 <211> 1008
 <212> ADN
 <213> Thermoascus aurantiacus

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1005)

15 <220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)..(90)

15 <220>
 <221> mat peptide
 <222> (91)..(1005)

20 <400> 13

atg aag ctc ggc tct ctc gtg ctc gct ctc agc gca gct agg ctt aca	48
Met Lys Leu Gly Ser Leu Val Leu Ala Leu Ser Ala Ala Arg Leu Thr	
-30 -25 -20 -15	
ctg tcg gcc cct ctc gca gac aga aag cag gag acc aag cgt gcg aaa	96
Leu Ser Ala Pro Leu Ala Asp Arg Lys Gln Glu Thr Lys Arg Ala Lys	
-10 -5 -1 1	
gta ttc caa tgg ttc ggt tcg aac gag tcc ggt gct gaa ttc gga agc	144
Val Phe Gln Trp Phe Gly Ser Asn Glu Ser Gly Ala Glu Phe Gly Ser	
5 10 15	
cag aac ctt cca gga gtc gag gga aag gat tat ata tgg cct gat ccc	192
Gln Asn Leu Pro Gly Val Glu Gly Lys Asp Tyr Ile Trp Pro Asp Pro	
20 25 30	

ES 2 551 711 T3

aac acc att gac aca ttg atc agc aag ggg atg aac atc ttt cgt gtc Asn Thr Ile Asp Thr Leu Ile Ser Lys Gly Met Asn Ile Phe Arg Val 35 40 45 50	240
ccc ttt atg atg gag aga ttg gtt ccc aac tca atg acc ggc tct ccg Pro Phe Met Met Glu Arg Leu Val Pro Asn Ser Met Thr Gly Ser Pro 55 60 65	288
gat ccg aac tac ctg gca gat ctc ata gcg act gta aat gca atc acc Asp Pro Asn Tyr Leu Ala Asp Leu Ile Ala Thr Val Asn Ala Ile Thr 70 75 80	336
cag aaa ggt gcc tac gcc gtc gtc gat cct cat aac tac ggc aga tac Gln Lys Gly Ala Tyr Ala Val Val Asp Pro His Asn Tyr Gly Arg Tyr 85 90 95	384
tac aat tct ata atc tcg agc cct tcc gat ttc cag acc ttc tgg aaa Tyr Asn Ser Ile Ile Ser Ser Pro Ser Asp Phe Gln Thr Phe Trp Lys 100 105 110	432
acg gtc gcc tca cag ttt gct tcg aat cca ctg gtc atc ttc gac act Thr Val Ala Ser Gln Phe Ala Ser Asn Pro Leu Val Ile Phe Asp Thr 115 120 125 130	480
aat aac gaa tac cac gat atg gac cag acc tta gtc ctc aat ctc aac Asn Asn Glu Tyr His Asp Met Asp Gln Thr Leu Val Leu Asn Leu Asn 135 140 145	528
cag gcc gct atc gac ggc atc cgt tcc gcc gga gcc act tcc cag tac Gln Ala Ala Ile Asp Gly Ile Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ser Gln Tyr 150 155 160	576
atc ttt gtc gag ggc aat tcg tgg acc ggg gca tgg acc tgg acg aac Ile Phe Val Glu Gly Asn Ser Trp Thr Gly Ala Trp Thr Trp Thr Asn 165 170 175	624
gtg aac gat aac atg aaa agc ctg acc gac cca tct gac aag atc ata Val Asn Asp Asn Met Lys Ser Leu Thr Asp Pro Ser Asp Lys Ile Ile 180 185 190	672
tac gag atg cac cag tac ctg gac tct gac gga tcc ggg aca tca gcg Tyr Glu Met His Gln Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Gly Thr Ser Ala 195 200 205 210	720
acc tgc gta tct tcg acc atc ggt caa gag cga atc acc agc gca acg Thr Cys Val Ser Ser Thr Ile Gly Gln Glu Arg Ile Thr Ser Ala Thr 215 220 225	768
cag tgg ctc agg gcc aac ggg aag aag ggc atc atc ggc gag ttt gcg Gln Trp Leu Arg Ala Asn Gly Lys Lys Gly Ile Ile Gly Glu Phe Ala 230 235 240	816
ggc gga gcc aac gac gtc tgc gag acg gcc atc acg ggc atg ctg gac Gly Gly Ala Asn Asp Val Cys Glu Thr Ala Ile Thr Gly Met Leu Asp 245 250 255	864
tac atg gcc cag aac aca gac gtc tgg act ggc gcc atc tgg tgg gcg Tyr Met Ala Gln Asn Thr Asp Val Trp Thr Gly Ala Ile Trp Trp Ala 260 265 270	912
gcc ggg ccg tgg tgg gga gac tac ata ttc tcc atg gag ccg gac aat Ala Gly Pro Trp Trp Gly Asp Tyr Ile Phe Ser Met Glu Pro Asp Asn 275 280 285 290	960
ggc atc gcg tat cag cag ata ctt cct att ttg act ccg tat ctt tga Gly Ile Ala Tyr Gln Gln Ile Leu Pro Ile Leu Thr Pro Tyr Leu 295 300 305	1008

ES 2 551 711 T3

<210> 14
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Thermoascus aurantiacus

5

<400> 14

Met Lys Leu Gly Ser Leu Val Leu Ala Leu Ser Ala Ala Arg Leu Thr
 -30 -25 -20 -15

Leu Ser Ala Pro Leu Ala Asp Arg Lys Gln Glu Thr Lys Arg Ala Lys
 -10 -5 -1 1

Val Phe Gln Trp Phe Gly Ser Asn Glu Ser Gly Ala Glu Phe Gly Ser
 5 10 15

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

Asn Thr Ile Asp Thr Leu Ile Ser Lys Gly Met Asn Ile Phe Arg Val
 35 40 45 50

Pro Phe Met Met Glu Arg Leu Val Pro Asn Ser Met Thr Gly Ser Pro
 55 60 65

Asp Pro Asn Tyr Leu Ala Asp Leu Ile Ala Thr Val Asn Ala Ile Thr
 70 75 80

Gln Lys Gly Ala Tyr Ala Val Val Asp Pro His Asn Tyr Gly Arg Tyr
 85 90 95

Tyr Asn Ser Ile Ile Ser Ser Pro Ser Asp Phe Gln Thr Phe Trp Lys
 100 105 110

Thr Val Ala Ser Gln Phe Ala Ser Asn Pro Leu Val Ile Phe Asp Thr
 115 120 125 130

Asn Asn Glu Tyr His Asp Met Asp Gln Thr Leu Val Leu Asn Leu Asn
 135 140 145

Gln Ala Ala Ile Asp Gly Ile Arg Ser Ala Gly Ala Thr Ser Gln Tyr

ES 2 551 711 T3

[illegible]

REVINDICACIONES

1. Proceso para producir un mosto de cerveza que comprende la formación de un macerado a partir de una molienda, y la puesta en contacto de dicho macerado con una pululanasa, donde dicha pululanasa tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 98 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID nº 4.
2. Proceso según la reivindicación 1, donde la pululanasa es derivada de *Bacillus acidopullulyticus*.
3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, que comprende además la puesta en contacto de dicho macerado con una glucoamilasa y/o alfa-amilasa.
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la glucoamilasa y/o alfa-amilasa es derivada de *Aspergillus niger* o *Talaromyces emersonii*.
5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la puesta en contacto del macerado con una enzima seleccionada del grupo consistente en celulasa, isoamilasa, xilanasas y proteasa.
6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la molienda comprende grano malteado y/o no malteado.
7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el grano no malteado y/o el grano malteado es seleccionado a partir de la lista consistente en cebada, trigo, centeno, sorgo, milla, maíz y arroz.
8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el grano malteado comprende grano malteado seleccionado a partir de cebada, trigo, centeno, sorgo, milla, maíz, y arroz malteados.
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el mosto es concentrado y/o seco.
10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además la fermentación del mosto para obtener una bebida alcohólica.
11. Proceso según la reivindicación 10, donde la bebida alcohólica es una cerveza.
12. Proceso según la reivindicación 11, donde la cerveza es ale, strong ale, amarga, stout, porter, lager, cerveza de exportación, licor de malta, vino de cebada, cerveza happoushu, cerveza de alta graduación alcohólica, cerveza de baja graduación alcohólica, cerveza baja en calorías o cerveza light.
13. Composición adecuada para su uso en el método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, dicha composición comprende una pululanasa, una glucoamilasa y opcionalmente una alfa-amilasa, donde dicha pululanasa tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID nº 4.
14. Composición según la reivindicación 13, donde la glucoamilasa y/o la alfa-amilasa es derivada de *Aspergillus niger* o *Talaromyces emersonii*.