(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 569 033**

(51) Int. Cl.:

C12P 7/14 (2006.01)
C12N 9/34 (2006.01)
C12N 9/30 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2011** **E 11768432 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016** **EP 2558584**

(54) Título: **Procesos para producir productos de fermentación**

(30) Prioridad:

14.04.2010 WO PCT/CN2010/071753

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.05.2016

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

DEINHAMMER, RANDALL;
COWARD-KELLY, GUILLERMO;
LI, MING;
DUAN, JUNXIN;
LIU, ZHENG;
FUKUYAMA, SHIRO y
AYABE, KEIICHI

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 569 033 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

Procesos para producir productos de fermentación

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a procesos para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón.

Antecedentes de la invención

[0002] La producción de productos de fermentación, tales como etanol, a partir de material que contiene almidón es bien conocida en la técnica. Industrialmente, hoy se usan principalmente dos tipos diferentes de procesos. El proceso que más habitualmente se usa, frecuentemente denominado "proceso convencional" incluye almidón gelatinizado de licuefacción a alta temperatura que utiliza una alfa-amilasa bacteriana seguida de sacarificación y fermentación simultánea realizada en presencia de una glucoamilasa y un organismo fermentador. Otro tipo de proceso bien conocido frecuentemente denominado proceso de "hidrólisis de almidón crudo" (proceso “RSH”) incluye simultáneamente sacarificación y fermentación de almidón granulado por debajo de la temperatura de gelatinización inicial, típicamente en presencia de una glucoamilasa y una alfa-amilasa fúngica ácida.

[0003] La WO 2010/008841 divulga procesos para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón que comprenden simultáneamente sacarificación y fermentación de material que contiene almidón utilizando una enzima generadora de una fuente de carbohidratos, en particular una glucoamilasa, y un organismo fermentador a una temperatura inferior a la temperatura de gelatinización inicial de dicho material que contiene almidón en presencia de una metalo proteasa.

[0004] A pesar de la mejora significativa de los procesos de producción del producto de fermentación durante la pasada década, una cantidad significativa de material con almidón residual no se convierte en el producto de fermentación deseado, tal como etanol. Al menos algunos de los materiales de almidón residuales no convertidos, por ejemplo, azúcares y dextrinas, están en la forma de productos de Maillard no fermentables.

[0005] Por lo tanto, sigue siendo un deseo y una necesidad proporcionar procesos para producir productos de fermentación, tales como etanol, a partir de material que contiene almidón que puedan proporcionar un rendimiento de producto de fermentación más alto en comparación con un proceso convencional.

Resumen de la invención

[0006] La presente invención se refiere a procesos para producir productos de fermentación, tales como etanol, a partir de material que contiene almidón utilizando un organismo fermentador.

[0007] En el primer aspecto, la invención se refiere a procesos para producir productos de fermentación, tales como etanol, a partir de material que contiene almidón que incluyen las etapas de:

i) licuefacción del material que contiene almidón utilizando una alfa-amilasa;
ii) sacarificación utilizando una glucoamilasa que tiene al menos 80% de identidad con el polipéptido maduro mostrado en SEC ID n.º: 9;
iii) fermentación utilizando un organismo fermentador.

Descripción detallada de la invención

[0008] La presente invención se refiere a procesos para producir productos de fermentación, tales como etanol, a partir de material que contiene almidón utilizando un organismo fermentador.

[0009] Los inventores han descubierto que un proceso de la invención tiene un número de ventajas en comparación con un proceso convencional. Como se muestra en, por ejemplo, el ejemplo 5, un proceso donde una glucoamilasa, tal como la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*, que tiene una termoestabilidad a 70ºC, pH 5,3, de al menos 70% de la actividad relativa (determinada como se describe en el ejemplo 4) es añadida durante la presacarificación (pH 5,0 a 70ºC) da como resultado un nivel de glucosa más alto en comparación con la adición de la misma glucoamilasa durante la licuefacción (pH 4,5 a 85ºC). Cuando la misma glucoamilasa se añade durante la licuefacción no se realiza bien en ausencia de glucoamilasa adicional adicionada durante la fermentación, dando lugar a un índice de fermentación significativamente más lento y un título de etanol inferior. Sin embargo, cuando se añade durante la presacarificación, la glucoamilasa funciona bien en ausencia de glucoamilasa adicional siendo adicionada durante la fermentación con el potencial para reducir la necesidad de proteína enzimática. Además, debido a la mayor termoestabilidad de la enzima usada, la dosis enzimática puede ser reducida. Un proceso de la invención requiere cambios limitados en el proceso existente y en el equipo del proceso y por lo tanto una inversión de capital limitada.

[0010] En el primer aspecto, la invención se refiere a procesos para producir productos de fermentación, tal como etanol, a partir de material que contiene almidón que incluyen las etapas de:

i) licuefacción del material que contiene almidón utilizando una alfa-amilasa;
ii) sacarificación utilizando una glucoamilasa con al menos 80% de identidad con el polipéptido maduro mostrado en SEC ID n.º: 9;
iii) fermentación utilizando un organismo fermentador.

Etapa de licuefacción i)

[0011] La etapa de licuefacción i) se puede realizar en presencia de una alfa-amilasa en condiciones bien conocidas en la técnica.

[0012] En una forma de realización, el proceso de la invención comprende además, antes de la etapa de licuefacción i), las etapas de:

a) reducción del tamaño de partícula del material que contiene almidón;
b) formación de un lodo que comprende el material que contiene almidón y agua.

[0013] La materia prima que contiene almidón, tal como granos enteros, se puede reducir en tamaño de partícula, por ejemplo, por molienda, para descubrir la estructura y permitir más tratamiento. Generalmente hay dos tipos de procesos de molienda: molienda en seco y en húmedo. En la molienda en seco los granos enteros se muelen y usan. La molienda en húmedo da una buena separación del germen y la harina (gránulos de almidón y proteína) y se aplica frecuentemente en lugares donde el hidrolizado de almidón se usa para la producción de, por ejemplo, jarabes. Tanto la molienda en húmedo y como en seco son bien conocidas en la técnica. Según la invención, se prefiere la molienda en seco. En una forma de realización, el tamaño de partícula se reduce entre 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente 0,1-0,5 mm, o de modo que al menos 30%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 70%, aún más preferiblemente al menos 90% del material que contiene almidón pase por una criba con una pantalla de 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente una pantalla de 0,1-0,5 mm. En otra forma de realización, al menos 50%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, especialmente al menos 90% del material que contiene almidón pasa a través de una criba con una pantalla de # 6-8.

[0014] El lodo acuoso puede contener de 10-55 p/p-% de sólidos secos (DS), preferiblemente 25-45 p/p-% de sólidos secos (DS), más preferiblemente 30-40 p/p-% de sólidos secos (DS) de material que contiene almidón.

[0015] El lodo se calienta por encima de la temperatura de gelatinización. En una forma de realización, el lodo se calienta por encima de la temperatura de gelatinización, preferiblemente entre 80-90ºC, pH 4,5-4,8 durante alrededor de 15-60 minutos.

[0016] En una forma de realización, el lodo se cuece a chorro a una temperatura entre 95-140°C, preferiblemente 105-125°C, durante 1-15 minutos, preferiblemente durante 3-10 minutos, especialmente alrededor de 5 minutos, antes de la etapa i).

[0017] En una forma de realización, el pH durante licuefacción está entre aproximadamente 4,0 y 7,0, tal como entre 4,5 y 6,0, tal como alrededor de 5,8 o entre 4,5-4,8.

[0018] En una forma de realización, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa bacteriana o una alfa-amilasa fúngica.

[0019] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa de *Bacillus*. Alfa-amilasas adecuadas se pueden encontrar en la sección "Alfa-amilasa presente y/o añadida durante la licuefacción" más adelante.

[0020] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa termoestable. En una forma de realización específica, la alfa-amilasa bacteriana es una alfa-amilasa de *Bacillus*, preferiblemente derivada de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (a veces denominada *Geobacillus stearothermophilus*) o una variante de la misma que comprende una eliminación doble tal como: R179* y G180* o I181*+G182*, especialmente I181*+G182*+N193F. La alfa-amilasa bacteriana se añade típicamente en una cantidad entre 0,0005-5 KNU por g DS, preferiblemente entre 0,001-1 KNU por g DS, tal como alrededor de 0,06 KNU por g DS o 0,0005-5 KNU(S) por g DS, preferiblemente entre 0,001-1 KNU(S) por g DS, tal como alrededor de 0,060 KNU(S) por g DS si es una alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*.

[0021] Una proteasa puede opcionalmente estar presente durante la etapa de licuefacción i), la etapa de sacarificación ii) y/o la etapa de fermentación iii), tal como SSF. En una forma de realización, la proteasa, tal como una proteasa termoestable, se añade durante la etapa de sacarificación ii) y/o la etapa de fermentación iii), tal como

durante la SSF. Ejemplos de proteasas, incluyendo proteasas termoestables, se pueden encontrar en la sección "Proteasa añadida durante una etapa de proceso de la invención" más adelante.

[0022] Una pululanasa (incluyendo amilopululanasas) puede opcionalmente estar presente durante la etapa de licuefacción i), la etapa de sacarificación ii) y/o la etapa de fermentación iii), tal como durante la SSF. En una forma de realización, la pululanasa es una pululanasa termoestable adicionada durante la etapa de licuefacción i). Ejemplos de pululanasas, incluyendo pululanasas termoestables, se pueden encontrar en la sección "Pululanasa presente y/o añadida durante una etapa de proceso de la invención" más adelante.

Etapa de sacarificación ii) y/o etapa de fermentación iii)

[0023] La etapa de sacarificación ii) y la etapa de fermentación iii) se pueden realizar separadamente (consecutivamente) o simultáneamente.

[0024] En una forma de realización preferida, la sacarificación se realiza como una presacarificación seguida de una etapa de fermentación separada iii) o una etapa donde la sacarificación se completa durante la fermentación (SSF), es decir, la presacarificación está seguida de sacarificación y fermentación simultánea (SSF). En una forma de realización, la etapa de presacarificación se completa antes de la fermentación. En una forma de realización, ninguna enzima generadora de fuente de carbohidratos adicional, tal como glucoamilasa, se añade durante la etapa de fermentación iii), es decir, después de la sacarificación o la presacarificación.

[0025] La presacarificación se realiza en condiciones que son más adecuadas para la(s) enzima(s) adicionada(s) (por ejemplo, condiciones adecuadas para la enzima generadora de fuente de carbohidratos, tal como glucoamilasa), que condiciones de fermentación (es decir, adaptadas al organismo fermentador). La fermentación se realiza típicamente a una temperatura significativamente inferior, por ejemplo, 25- 40°C, tal como alrededor de 32°C, mientras que la sacarificación o la pre-sacarificación se realiza típicamente como se indica más adelante.

[0026] Cuando la etapa de sacarificación ii) se realiza como una etapa de presacarificación o una etapa de sacarificación separada, el pH puede estar en el rango de 4-7, preferiblemente de pH 4,5-5. En una forma de realización, la etapa de sacarificación ii) se realiza a una temperatura de 50-80°C, preferiblemente de 60-75°C, tal como alrededor de 70°C. En una forma de realización, la etapa de sacarificación ii) se realiza durante 10 minutos a 6 horas, preferiblemente de 30 minutos a 3 horas, tal como de 90 minutos a 150 minutos.

[0027] La etapa de sacarificación ii) y la etapa de fermentación iii) se pueden realizar, en una forma de realización, simultáneamente. Esto se usa mucho en procesos de producción de producto de fermentación a escala industrial, tales como procesos de producción de etanol. Cuando se lleva a cabo la SSF, la etapa de sacarificación ii) y la etapa de fermentación iii) se realizan simultáneamente. No hay fase de retención para la sacarificación, lo que significa que un organismo fermentador, tal como levadura, y enzima(s), se pueden añadir juntos. La SSF o una etapa de fermentación separada iii) se realizan conforme a la invención típicamente a una temperatura de 25°C a 40°C, tal como de 28°C a 35°C, tal como de 30°C a 34°C, preferiblemente alrededor de aproximadamente 32°C. En una forma de realización, la etapa de fermentación iii) o SSF se realiza durante 6 a 120 horas, en particular de 24 a 96 horas. En una forma de realización, el pH está entre 3,5 y 5, en particular entre 3,8 y 4,3.

[0028] La glucoamilasa usada en la etapa de sacarificación ii) es una glicoamilasa preferiblemente derivada de *Penicillium oxalicum* que tiene al menos 80% de identidad con el polipéptido maduro mostrado en SEC ID n.º: 9.

[0029] Según la invención, la glucoamilasa se añade en una cantidad de 0,0001-20 AGU/g DS, preferiblemente 0,001-10 AGU/g DS, especialmente entre 0,01-5 AGU/g DS, tal como 0,1-2 AGU/g DS.

Medio de fermentación

[0030] "Medios de fermentación" o "medio de fermentación" que se refiere al entorno en el que la fermentación se realiza y que incluye el sustrato de fermentación, esto es, la fuente de carbohidratos que es metabolizada por el organismo fermentador. El medio de fermentación puede comprender nutrientes y estimulador(es) del crecimiento para fermentar el(los) organismo(s). Nutrientes y estimuladores de crecimiento se usan mucho en la técnica de fermentación e incluyen fuentes de nitrógeno, tales como amoníaco, urea, vitaminas y minerales, o combinaciones de los mismos.

Organismos fermentadores

[0031] El término "organismo fermentador" puede referirse a cualquier organismo, incluyendo organismos bacterianos y fúngicos, adecuados para su uso en un proceso de fermentación y capaces de producir el producto de fermentación deseado. Organismos fermentadores especialmente adecuados son capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares, tales como glucosa o maltosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado, tal como etanol. Ejemplos de organismos fermentadores incluyen organismos fúngicos, tales como levadura. La levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces spp*., en particular, *Saccharomyces cerevisiae*.

[0032] En una forma de realización, el organismo fermentador se añade al medio de fermentación de modo que el recuento de organismo fermentador viable, tal como levadura, por mL de medio de fermentación esté en el rango de 10^5 a 10^{12}, preferiblemente de 10^7 a 10^{10}, especialmente aproximadamente $5x10^7$.

[0033] La levadura disponible comercialmente incluye, por ejemplo, levadura RED STAR™ y ETHANOL RED™ (disponible de Fermentis/Lesaffre, EE.UU.), FALI (disponible de Fleischmann's Yeast, EE.UU.), levadura fresca de SUPERSTART y THERMOSACC™ (disponible de Ethanol Technology, WI, EE.UU.), BIOFERM AFT y XR (disponible de NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, EE.UU.), GERT STRAND (disponible de Gert Strand, AB, Suecia) y FERMIOL (disponible de DSM Specialties).

Materiales que contienen almidón

[0034] Cualquier material que contenga almidón adecuado se puede utilizar según la presente invención. La materia prima se selecciona generalmente en base al producto de fermentación deseado. Ejemplos de materiales que contienen almidón, adecuados para su uso en un proceso de la invención, incluyen granos enteros, maíz, trigo, cebada, centeno, milo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, alubias o patatas dulces, o mezclas derivadas o almidones derivados, o cereales. También se contemplan tipos cerosos y no cerosos de maíz y cebada.

Productos de fermentación

[0035] El término "producto de fermentación" se refiere a un producto producido por un proceso que incluye un paso de fermentación que utiliza un organismo fermentador. Productos de fermentación contemplados según la invención incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido succínico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H_2 y CO_2); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B_{12}, beta-caroteno); y hormonas. En una forma de realización preferida, el producto de fermentación es etanol, por ejemplo, etanol combustible; etanol potable, es decir, bebidas espirituosas neutras potables; o etanol industrial o productos usados en la industria del alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), industria lechera (por ejemplo, productos lácteos fermentados), industria del cuero e industria del tabaco. Tipos de cerveza preferidos comprenden cerveza inglesa de malta, cerveza negra, cerveza porter, rubia, amarga, licores de malta, cerveza happoushu, cerveza alta en alcohol, cerveza baja en alcohol, cerveza baja en calorías o cerveza ligera. Procesos de fermentación preferidos usados incluyen procesos de fermentación de alcohol. En una forma de realización, el producto de fermentación obtenido según la invención es etanol. En una forma de realización, el producto de fermentación es etanol combustible, que se mezcla típicamente con gasolina. En una forma de realización, el producto de fermentación es etanol potable.

Recuperación

[0036] Después de la fermentación, el producto de fermentación se puede separar del medio de fermentación. El lodo se puede destilar para extraer el producto de fermentación deseado. Alternativamente, el producto de fermentación deseado se puede extraer del medio de fermentación por micro o técnicas de filtración de membrana. El producto de fermentación también se puede recuperar por extracción u otro método bien conocido en la técnica.

Alfa-amilasa presente y/o añadida durante la licuefacción

[0037] Según el proceso de la invención, cualquier alfa-amilasa puede ser utilizada. En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es de origen bacteriano o fúngico. En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa de *Bacillus*.

[0038] En otra forma de realización, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, tal como especialmente una alfa-amilasa fúngica ácida.

[0039] El término "alfa-amilasa ácida" se refiere a una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que añadida en una cantidad eficaz tiene una actividad óptima en un rango de pH de 3 a 7, preferiblemente de 3,5 a 6, o más preferiblemente de 4-5.

Alfa-amilasas bacterianas

[0040] Según la invención, la alfa-amilasa bacteriana se deriva preferiblemente del género *Bacillus*.

[0041] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa de *Bacillus* (o *Geobacillus*) se deriva de una cepa de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus stearothermophilus* (*Geobacillus stearothermophilus*), pero también se puede derivar de otra especie de *Bacillus*. Ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en SEC ID n.º: 4 en la WO 99/19467, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* mostrada en SEC ID n.º: 5 en la WO 99/19467 y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en SEC ID n.º: 3 en la WO 99/19467. En una forma de realización,

la alfa-amilasa puede ser una enzima con un grado de identidad de al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferido al menos 80%, aún más preferido al menos 90%, tal como al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% con cualquiera de las secuencias mostradas en la SEC ID N.º: 1, 2 o 3, respectivamente, en la WO 99/19467.

[0042] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o un híbrido, especialmente uno descrito en cualquiera de la WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059 y WO 02/10355. Variantes de alfa-amilasa contempladas específicamente se describen en las patentes de EE.UU. n.º: 6.093.562, 6.297.038 o patente de EE.UU. n.º: 6.187.576 e incluyen variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (es decir, alfa-amilasa BSG) que tienen una deleción de un o dos aminoácidos en las posiciones R179 a G182, preferiblemente una deleción doble descrita en la WO 1996/023873 - véase por ejemplo, la página 20, líneas 1-10, preferiblemente correspondientes a delta(181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en SEC ID n.º: 3 descrita en la WO 99/19467 o la deleción de los aminoácidos R179 y G180 que usan SEC ID n.º: 3 en la WO 99/19467 para numeración. Aún más preferidas son las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, que tiene una deleción doble que corresponde con delta(181-182) y además comprende una sustitución N193F (también denominada I181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa BSG de tipo salvaje expuesta en la SEC ID n.º: 3 descrita en la WO 99/19467.

[0043] En una forma de realización, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* que comprende una sustitución en la posición S242, preferiblemente S242A, E o Q, especialmente S242Q, o cualquiera de las sustituciones reivindicadas en la patente de EE.UU. n.º 7.713.723 (Novozymes), WO 2010/036515 (Danisco) o patente de EE.UU. n.º 7.541.026 (Danisco).

Alfa-amilasas híbridas bacterianas

[0044] Una alfa-amilasa híbrida específicamente contemplada comprende 445 residuos de aminoácidos C-terminales de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada en SEC ID n.º: 4 de la WO 99/19467) y los 37 residuos de aminoácidos N-terminales de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada en SEC ID n.º: 5 de la WO 99/19467), con una o más, especialmente todas, de la siguiente sustitución:

G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S (utilizando la numeración de *Bacillus licheniformis* en SEC ID n.º: 4 de la WO 99/19467). También se prefieren variantes que tengan una o más de las siguientes mutaciones (o mutaciones correspondientes en otras estructuras de alfa-amilasa de *Bacillus*): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o deleción de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferiblemente deleción de E178 y G179 (utilizando la numeración de SEC ID n.º: 5 de la WO 99/19467).

[0045] En una forma de realización, la alfa-amilasa bacteriana se dosifica en una cantidad de 0,0005-5 KNU por g DS, preferiblemente 0,001-1 KNU por g DS, tal como alrededor de 0,050 KNU por g DS o 0,0005-5 KNU(S) por g DS, preferiblemente entre 0,001-1 KNU(S) por g DS, tal como alrededor de 0,060 KNU(S) por g DS si es una alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*.

Productos de alfa-amilasa comercial

[0046] Composiciones comerciales preferidas que comprenden alfa-amilasa incluyen MYCOLASE™ de DSM (Gist Brocades), BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X, LIQUOZYME™ SC, LIQUOZYMET™ SCDS y SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE™ L-40,000, DEX-LOT™, SPEZYME® FRED-L, SPEZYME® HPA, SPEZYME® ALPHA, SPEZYME® XTRA, SPEZYME® AA, SPEZYME® DELTA AA y GC358, SPEZYME RSL (Danisco); FUELZYME™-LF (Verenium Inc), y la alfa-amilasa fúngica ácida vendida bajo el nombre comercial SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

Alfa-amilasa termoestable a bajo pH

[0047] Según la invención, la alfa-amilasa usada en la etapa i) puede ser una alfa-amilasa termoestable a bajo pH (es decir, pH 4,5-5,0). Según la invención, la alfa-amilasa tiene alta actividad hacia la solubilización de almidón en la licuefacción a pH 4,5 a 5,0 y alta termoestabilidad a pH 4,5-5,0 y 80-90°C, preferiblemente 4,5-4,8, 85°C.

[0048] Más específicamente, la alfa-amilasa usada en la etapa de licuefacción i) puede preferiblemente tener una T½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM de $CaCl_2$ de al menos 10.

[0049] En una forma de realización preferida, la T½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM de $CaCl_2$, es al menos 15, tal como al menos 20, tal como al menos 25, tal como al menos 30, tal como al menos 40, tal como al menos 50, tal como al menos 60, tal como entre 10-70, tal como entre 15-70, tal como entre 20-70, tal como entre 25-70, tal como entre 30-70, tal como entre 40-70, tal como entre 50-70, tal como entre 60-70.

[0050] En una forma de realización de la invención, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa bacteriana, preferiblemente derivada del género *Bacillus*, especialmente una cepa de *Bacillus stearothermophilus*, en particular el *Bacillus stearothermophilus* como se describe en la WO 99/019467 como SEC ID n.º: 3 (SEC ID n.º: 1 aquí) con la deleción doble I181 + G182 y la sustitución N193F, que comprende además las siguientes mutaciones:

- V59A+Q89R+G112D+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+D269E+D281N;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+I270L;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+H274K;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+Y276F;
- V59A+E129V+R157Y+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- V59A+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- 59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+H274K;
- V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+Y276F;
- V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+D281N;
- V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+M284T;
- V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+G416V;
- V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;
- V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+M284T;
- A91L+M961+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- E129V+K177L+R179E;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+Y276F+L427M;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+M284T;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+N376*+I377*;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+M284T;
- E129V+K177L+R179E+S242Q;
- E129V+K177L+R179V+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- K220P+N224L+S242Q+Q254S; o
- M284V.

Proteasas añadidas durante una etapa de proceso de la invención

[0051] Según la invención, una proteasa puede opcionalmente estar presente y/o añadirse durante una etapa de proceso de la invención. Debido a la alta temperatura relativa generalmente usada durante la licuefacción, se prefiere añadir una proteasa termoestable durante la etapa de licuefacción i) junto con una alfa-amilasa como se ha descrito anteriormente. En otra forma de realización, una proteasa se añade durante la etapa de sacarificación ii) y/o la etapa de fermentación iii), tal como SSF.

[0052] Según la presente invención, el material que contiene almidón se puede tratar con una proteasa, tal como una proteasa termoestable, de cualquier origen. Proteasas adecuadas pueden ser de origen fúngico, bacteriano, incluyendo hongos filamentosos y levadura, y origen vegetal.

[0053] Según la invención, una peptidasa y otras enzimas degradadoras de proteína están abarcadas con el término "proteasa". En una forma de realización, la proteasa es una endoproteasa y/o una exoproteasa.

[0054] En una forma de realización, la proteasa, tal como proteasa termoestable, es una proteasa ácida, es decir, una proteasa caracterizada por la capacidad para hidrolizar proteínas bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7, por ejemplo, a un pH entre 2-7. En una forma de realización, la proteasa ácida tiene un pH óptimo en el rango de 2,5 y 3,5 (determinado en sustrato de caseína alto en nitrógeno a 0,7% p/v a 37°C) y una temperatura óptima entre 5 a 50°C en una concentración enzimática de 10 mg/mL a 30°C durante una hora en 0,1 M de tampón de piperacina/acetato/glicina).

[0055] En otra forma de realización, la proteasa, o proteasa termoestable, es una proteasa alcalina, es decir, una proteasa caracterizada por la capacidad para hidrolizar proteínas bajo condiciones alcalinas por encima de pH 7, por ejemplo, a un pH entre 7-11. En una forma de realización, la proteasa alcalina se deriva de una cepa de *Bacillus*, preferiblemente *Bacillus licheniformis*. En una forma de realización, la proteasa alcalina tiene una temperatura óptima en el rango de 7 y 11 y una temperatura óptima de aproximadamente 70°C determinada a pH 9.

[0056] En otra forma de realización, la proteasa, o proteasa termoestable, es una proteasa neutra, es decir, una proteasa caracterizada por la capacidad para hidrolizar proteínas bajo condiciones entre pH 5 y 8. En una forma de realización, la proteasa alcalina se deriva de una cepa de *Bacillus*, preferiblemente *Bacillus amyloliquefaciens*. En una forma de realización, la proteasa alcalina tiene un pH óptimo en el rango de entre 7 y 11 (determinado a 25°C,

10 minutos de tiempo de reacción con una concentración enzimática de 0,01-0,2 AU/L) y una temperatura óptima entre 50°C y 70°C (determinado a pH 8,5, 10 minutos de tiempo de reacción y 0,03-0,3 AU/L de concentración enzimática.

[0057] Proteasas vegetales adecuadas se pueden derivar de cebada.

[0058] Proteasas bacterianas adecuados incluyen proteasas de *Bacillus* derivadas de *Bacillus licheniformis* y *Bacillus amyloliquefaciens*. Proteasas bacterianas filamentosas adecuadas se pueden derivar de una cepa de *Nocardiopsis*, preferiblemente proteasa de *Nocardiopsis prasina* NRRL 18262 (o *Nocardiopsis sp.* 10R) y *Nocardiopsis dassonavilla* NRRL 18133 (*Nocardiopsis dassonavilla* M58-1) ambas descritas en la WO 1988/003947 (Novozymes).

[0059] Proteasas fúngicas ácidas adecuadas incluyen proteasas fúngicas derivadas de *Aspergillus, Mucor, Rhizomucor, Rhizopus, Candida, Coriolus, Endothia, Enthomophtra, Irpex, Penicillium, Sclerotium, Thermoaccus* y *Torulopsis*. Especialmente se contemplan proteasas derivadas de *Aspergillus niger* (véase, por ejemplo, Koaze *et al*., (1964), Agr. Biol. Chem. Japan, 28, 216), *Aspergillus saitoi* (véase, por ejemplo, Yoshida, (1954) J. Agr. Chem. Soc. Japan, 28, 66), *Aspergillus awamori* (Hayashida *et al*., (1977) Agric. Biol. Chem., 42(5), 927-933, *Aspergillus aculeatus* (WO 95/02044) o *Aspergillus oryzae*; proteasas de *Mucor pusillus* o *Mucor miehei* descritas en la patente de EE.UU. n.º 4.357.357 y la patente de EE.UU. n.º 3.988.207; y *Rhizomucor pusillus* o *Rhizomucor mehei* descritas en, por ejemplo, la WO 94/24880.

[0060] Proteasas de ácido aspártico son descritas en, por ejemplo, Handbook of Proteolytic Enzymes, editado por A.J. Barrett, N.D. Rawlings and J.F. Woessner, Aca-demic Press, San Diego, 1998, capítulo 270). Ejemplos adecuados de proteasa de ácido aspártico incluyen, por ejemplo, los descritos en R.M. Berka *et al*. Gene, 96, 313 (1990)); (R.M. Berka *et al*. Gene, 125, 195-198 (1993)); y Gomi *et al*. Biosci. Biotech. Biochem. 57, 1095-1100 (1993).

[0061] Productos disponibles comercialmente incluyen ALCALASE®, ESPERASE™, NEUTRASE®, RENILASE®, NOVOZYM™ FM 2.0L y NOVOZYM™ 50006 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca) y GC106™ y SPEZYME™ FAN de Genencor Int., Inc., EE.UU.

[0062] La proteasa o proteasa termoestable puede estar presente en concentraciones en el rango de 0,0001 a 1,0 % en peso de TS, preferiblemente 0,001 a 0,1 % en peso de TS.

[0063] En una forma de realización, la proteasa es una metaloproteasa. En una forma de realización preferida, la proteasa se deriva de una cepa del género *Thermoascus*, preferiblemente una cepa de *Thermoascus aurantiacus*, especialmente Thermoaccus *aurantiacus* CGMCC nº 0670 que tiene la secuencia mostrada en la parte madura de SEC ID n.º: 2 en la WO 03/048353. La proteasa de *Thermoaccus aurantiacus* es activa de 20-90°C, con una temperatura óptima alrededor de 70°C. Además, la enzima tiene actividad entre pH 5-10 con un pH óptimo alrededor de 6.

[0064] La proteasa usada en un proceso de la invención, preferiblemente añadida durante la etapa de licuefacción i), puede ser una proteasa termoestable que tenga:

i) un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C; y/o
ii) un valor de termoestabilidad superior al 10% determinado como actividad relativa a 85°C/70°C.

En una forma de realización, la proteasa tiene un valor de termoestabilidad:

- superior al 30%, superior al 40%, superior al 50%, superior al 60%, superior al 70%, superior al 80%, superior al 90% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C, y/o
- superior al 12%, superior al 14%, superior al 16%, superior al 18%, superior al 20%, determinado como actividad relativa a 85°C/70°C;
- y/o superior al 20%, superior al 30%, superior al 40%, superior al 50%, superior al 60%, superior al 70%, superior al 80%, superior al 90% determinado como actividad restante a 80°C; y/o

superior al 20%, superior al 30%, superior al 40%, superior al 50%, superior al 60%, superior al 70%, superior al 80%, superior al 90% determinado como actividad restante a 84°C y/o.

[0065] Variantes purificadas pueden tener una termoestabilidad por encima de 90, por encima de 100 a 85°C como se determina utilizando el ensayo ceína-BCA como se describe en el ejemplo 3.

[0066] Determinación de "actividad relativa" y "actividad restante" se determina como se describe en el ejemplo 2.

[0067] Las proteasas se clasifican basándose en su mecanismo catalítico en los siguientes grupos: serina proteasas (S), cisteína proteasas (C), proteasas aspárticas (A), metalo proteasas (M) y proteasas (U) desconocidas, o aún sin

clasificar, véase el manual Proteolytic Enzymes, A.J. Barrett, N.D. Rawlings, J.F. Woessner (eds.), Academic Press (1998), en particular la parte de introducción general.

[0068] En una forma de realización preferida, la proteasa termoestable usada en un proceso de la invención es una "metaloproteasa" definida como una proteasa de EC 3.4.24 (metaloendopeptidasas); preferiblemente EC 3.4.24.39 (metalo proteinasas ácidas).

[0069] Para determinar si una proteasa dada es una metalo proteasa o no, se hace referencia al "Handbook of Proteolytic Enzymes" anterior y los principios indicados en éste. Tal determinación puede llevarse a cabo para cualquier tipo de proteasa, ya sean proteasas de origen natural o de tipo salvaje; o proteasas genéticamente modificadas o sintéticas.

[0070] La actividad de proteasa se puede medir utilizando cualquier ensayo adecuado, donde se emplea un sustrato, que incluya enlaces de péptido pertinentes para la especificidad de la proteasa en cuestión. PH de ensayo y temperatura de ensayo tienen también que ser adaptados a la proteasa en cuestión. Ejemplos de valores de pH de ensayo son pH 6, 7, 8, 9, 10 u 11. Ejemplos de temperatura de ensayos son 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 u 80°C.

[0071] Ejemplos de sustratos de proteasa son caseína, tal como caseína reticulada con azurina (caseína AZCL). Dos ensayos de proteasa se describen más adelante, en la sección "Materiales y métodos", de los cuales el denominado "ensayo de caseína AZCL" es el ensayo preferido.

[0072] La proteasa de termoestabilidad puede ser una variante de, por ejemplo, una proteasa de tipo salvaje siempre y cuando la proteasa tenga las propiedades de termoestabilidad definidas anteriormente. En una forma de realización preferida, la proteasa es una variante de una metalo proteasa tal como se ha definido anteriormente. En una forma de realización, la proteasa usada en un proceso de la invención es de origen fúngico, tal como una metalo proteasa fúngica, tal como una metalo proteasa fúngica derivada de una cepa del género *Thermoascus*, preferiblemente una cepa de *Thermoascus aurantiacus*, especialmente *Thermoascus aurantiacus* CGMCC nº 0670 (clasificada como EC 3.4.24.39).

[0073] En una forma de realización, la proteasa es una variante de la parte madura de la metaloproteasa mostrada en SEC ID n.º: 2 descrita en la WO 2003/048353 o la parte madura de SEC ID n.º: 1 en la WO 2010/008841 y mostrada como SEC ID n.º: 3 aquí con las siguientes mutaciones:

- S5*+D79L+S87P+A112P+D142L
- D79L+S87P+A112P+T124V+D142L
- S5*+N26R+D79L+S87P+A112P+D142L
- N26R+T46R+D79L+S87P+A112P+D142L
- T46R+D79L+S87P+T116V+D142L
- D79L+P81R+S87P+A112P+D142L
- A27K+D79L+S87P+A112P+T124V+D142L
- D79L+Y82F+S87P+A112P+T124V+D142L
- D79L+Y82F+S87P+A112P+T124V+D142L
- D79L+S87P+A112P+T124V+A126V+D142L
- D79L+S87P+A112P+D142L
- D79L+Y82F+S87P+A112P+D142L
- S38T+D79L+S87P+A112P+A126V+D142L
- D79L+Y82F+S87P+A112P+A126V+D142L
- A27K+D79L+S87P+A112P+A126V+D142L
- D79L+S87P+N98C+A112P+G135C+D142L
- D79L+S87P+A112P+D142L+T141C+M161C
- S36P+D79L+S87P+A112P+D142L
- A37P+D79L+S87P+A112P+D142L
- S49P+D79L+S87P+A112P+D142L
- S50P+D79L+S87P+A112P+D142L
- D79L+S87P+D104P+A112P+D142L
- D79L+Y82F+S87G+A112P+D142L
- S70V+D79L+Y82F+S87G+Y97W+A112P+D142L
- D79L+Y82F+S87G+Y97W+D104P+A112P+D142L
- S70V+D79L+Y82F+S87G+A112P+D142L
- D79L+Y82F+S87G+D104P+A112P+D142L
- D79L+Y82F+S87G+A112P+A126V+D142L
- Y82F+S87G+S70V+D79L+D104P+A112P+D142L
- Y82F+S87G+D79L+D104P+A112P+A126V+D142L
- A27K+D79L+Y82F+S87G+D104P+A112P+A126V+D142L
- A27K+Y82F+S87G+D104P+A112P+A126V+D142L

- A27K+D79L+Y82F+ D104P+A112P+A126V+D142L
- A27K+Y82F+D104P+A112P+A126V+D142L
- A27K+D79L+S87P+A112P+D142L.

Glucoamilasa presente y/o añadida durante la sacarificación o la SSF

[0074] Según la invención, una glucoamilasa que tiene al menos 80% de identidad con el polipéptido maduro mostrada en SEC ID n.º: 9 está presente y/o se añade durante la etapa de sacarificación ii) y/o la etapa de fermentación iii) tal como la SSF. Opcionalmente, una proteasa, tal como una proteasa termoestable está también presente o se añade. Como se ha mencionado anteriormente, una pululanasa también puede estar presente y/o añadirse durante la etapa de sacarificación ii) y/o la etapa de fermentación iii) tal como la SSF.

[0075] En una forma de realización preferida la glucoamilasa se añade junto con o separadamente de la alfa-amilasa y opcionalmente la proteasa y/o la pululanasa.

[0076] En una forma de realización, la glucoamilasa tiene una termoestabilidad a 85°C de al menos 20%, al menos 30%, preferiblemente al menos 35% de actividad relativa. En una forma de realización, la glucoamilasa tiene una actividad relativa a pH 4,5 de al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, preferiblemente al menos 95%.

[0077] En una forma de realización específica y preferida las glucoamilasas derivadas de una cepa del género *Penicillium*, especialmente una cepa de *Penicillium oxalicum* descrita como SEC ID n.º: 9 aquí.

[0078] En una forma de realización, la glucoamilasa termoestable usada en un proceso de la invención tiene al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 91%, más preferiblemente al menos 92%, aún más preferiblemente al menos 93%, de la forma más preferible al menos 94%, e incluso de la forma más preferible al menos 95%, tal como incluso al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% de identidad con el polipéptido maduro mostrado en SEC ID n.º: 2 en PCT/CN10/071753 o SEC ID n.º: 9 aquí.

Pululanasa presente y/o añadida durante una etapa del proceso de la invención

[0079] Opcionalmente, una pululanasa (incluyendo amilopululanasas) puede estar presente o añadirse durante la etapa de licuefacción i), la etapa de sacarificación ii) y/o la etapa de fermentación iii), tal como SSF. En una forma de realización, la pululanasa es una pululanasa termoestable añadida durante la etapa de licuefacción i). Una pululanasa termoestable puede estar presente y/o añadirse durante la etapa de licuefacción i) junto con una alfa-amilasa y opcionalmente una proteasa termoestable.

[0080] La pululanasa puede estar presente y/o añadirse durante una etapa del proceso de la invención, tal como la etapa de licuefacción i), la etapa de sacarificación ii), la etapa de fermentación iii) y/o la sacarificación y fermentación simultánea (SSF).

[0081] Pululanasas (E.C. 3.2.1.41, pululano 6-glucano-hidrolasa), son enzimas desramificantes caracterizadas por su capacidad para hidrolizar los enlaces alfa-1,6-glicosídicos, por ejemplo, amilopectina y pululano.

[0082] Pululanasas contempladas según la presente invención incluyen las pululanasas de *Bacillus amyloderamificans* descritas en la patente de EE.UU. n.º: 4.560.651, la pululanasa descrita como SEC ID n.º: 2 en la WO 01/151620, el *Bacillus deramificans* descrito como SEC ID n.º: 4 en la WO 01/151620 y la pululanasa de *Bacillus acidopullulyticus* descrita como SEC ID n.º: 6 en la WO 01/151620 y también descrita en FEMS Mic. Let. (1994) 115, 97-106.

[0083] Pululanasas adicionales contempladas según la presente invención incluyen las pululanasas de *Pyrococcus woesei*, específicamente de *Pyrococcus woesei* DSM nº 3773 descritas en la WO 92/02614.

[0084] En una forma de realización, la pululanasa es una pululanasa de la familia GH57. En una forma de realización, la pululanasa incluye un dominio X47 como se describe en la PCT/US10/061761. Más específicamente, la pululanasa puede ser derivada de una cepa del género *Thermococcus*, incluyendo *Thermococcus litoralis* y *Thermococcus hydrothermalis*, tal como la pululanasa de *Thermococcus hydrothermalis* mostrada en SEC ID n.º: 11 truncada en el sitio X4 justo después del dominio X47 (es decir, aminoácidos 1-782 en la SEC ID n.º: 11 y 12). La pululanasa también puede ser un híbrido de las pululanasas de *Thermococcus litoralis* y de *Thermococcus hydrothermalis* o una enzima híbrida de *T. hydrothermalis/T. litoralis* con sitio de truncamiento X4 descrita en la PCT/US10/061761 y descrita en SEC ID n.º: 12.

[0085] La pululanasa puede añadirse, según la invención, en una cantidad eficaz que incluya la cantidad preferida de aproximadamente 0,0001-10 mg de proteína enzimática por gramo de DS, preferiblemente 0,0001-0,10 mg de proteína enzimática por gramo de DS, más preferiblemente 0,0001-0,010 mg de proteína enzimática por gramo de

DS. La actividad de pululanasa se puede determinar como NPUN. Un ensayo para determinar NPUN se describe en la sección "Materiales y métodos" más adelante.

[0086] Productos de pululanasa disponibles comercialmente adecuados incluyen PROMOZYME D, PROMOZYME™ D2 (Novozymes A/S, Dinamarca), OPTIMAX L-300 (Genencor Int., EE.UU.) y AMANO 8, (Amano Japón).

[0087] Enzima generadora de fuente de carbohidratos adicional presente y/o añadida durante la sacarificación y/o la fermentación

[0088] Según la invención, una enzima generadora de fuente de carbohidratos adicional, preferiblemente una glucoamilasa adicional, puede estar presente y/o añadirse durante la etapa de sacarificación ii) y/o la etapa de fermentación iii). La enzima generadora de fuente de carbohidratos adicional también puede ser una enzima seleccionada del grupo que consiste en: beta-amilasa, amilasa maltogénica y alfa-glucosidasa.

[0089] En una forma de realización preferida, la enzima generadora de fuente de carbohidratos adicional es una glucoamilasa de origen fúngico, preferiblemente de una mancha de *Aspergillus*, preferiblemente *A. niger, A. awamori* o *A. oryzae*; o una cepa de *Trichoderma*, preferiblemente *T. reesei*; o una cepa de *Talaromyces*, preferiblemente *T. emersonii*.

[0090] Glucoamilasa adicional presente y/o añadida durante la sacarificación y/o la fermentación

[0091] Según la invención, una glucoamilasa adicional puede estar presente y/o añadirse durante la etapa de sacarificación ii) y/o la etapa de fermentación iii), tal como la SSF. La glucoamilasa adicional puede ser derivada de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, derivada de un microorganismo o una planta. Glucoamilasas adicionales preferidas son de origen fúngico o bacteriano, seleccionadas del grupo que consiste en glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular glucoamilasa de *Aspergillus niger* G1 o G2 (Boel *et al*. (1984), EMBO J. 3 (5), p. 1097-1102), o variantes de las mismas, tal como las descritas en la WO 92/00381, WO 00/04136 y WO 01/04273 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa de *A. awamori* descrita en la WO 84/02921, la glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* (Agric. Biol. Chem. (1991), 55 (4), p. 941-949), o variantes o fragmentos de la misma. Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes con termoestabilidad mejorada: G137A y G139A (Chen *et al*. (1996), Prot. Eng. 9, 499-505); D257E y D293E/Q (Chen *et al*. (1995), Prot. Eng. 8, 575-582); N182 (Chen *et al*. (1994), Biochem. J. 301,275-281); enlaces de disulfuro, A246C (Fierobe *et al*. (1996), bioquímica, 35,8698-8704; e introducción de Pro residuos en la posición A435 y S436 (Li *et al*. (1997), proteína Eng. 10,1199-1204.

[0092] Otras glucoamilasas adicionales incluyen glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (previamente denominada *Corticium rolfsii*) (véase la patente de EE.UU. nº 4.727.026 y (Nagasaka *et al*. (1998) "Purification and properties of the raw-starch-degrading glucoamylases from Corticium rolfsii, Appl Microbiol Biotechnol 50:323-330), glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular derivadas de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente de EE.UU. nº Re. 32.153), *Talaromyces duponti*, *Talaromyces thermophilus* (patente de EE.UU. nº 4.587.215). En una forma de realización preferida, la glucoamilasa usada durante la sacarificación y/o la fermentación es la glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* descrita en la WO 99/28448.

[0093] Glucoamilasas bacterianas adicionales contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135.138) y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831) y *Trametes cingulata*, *Pachykytospora papyracea* y *Leucopaxillus giganteus* todas descritas en la WO 2006/069289; o *Peniophora rufomarginata* descrita en la WO2007/124285; o una mezcla de las mismas. También se contemplan glucoamilasas híbridas según la invención. Ejemplos de glucoamilasas híbridas descritos en la WO 2005/045018. Ejemplos específicos incluyen la glucoamilasa híbrida descrita en la tabla 1 y 4 del ejemplo 1. En una forma de realización, la glucoamilasa adicional se deriva de una cepa del género *Pycnoporus*, en particular una cepa de *Pycnoporus* como se describe en la US 61/264.977, o de una cepa del género *Gloephyllum*, en particular una cepa de *Gloephyllum* como se describe en la US 61/406.741 o una cepa del género *Nigrofomes*, en particular una cepa de *Nigrofomes sp*. descrita en la US 61/411.044.

[0094] También se contemplan glucoamilasas adicionales que muestran una identidad alta con cualquiera de las glucoamilasas anteriormente mencionadas, es decir, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o incluso 100% de identidad con las secuencias de enzimas maduras mencionadas anteriormente.

[0095] Las glucoamilasas adicionales se pueden añadir en una cantidad de 0,0001-20 AGU/g DS, preferiblemente 0,001-10 AGU/g DS, especialmente entre 0,01-5 AGU/g DS, tal como 0,1-2 AGU/g DS.

[0096] Composiciones disponibles comercialmente que comprenden glucoamilasa adicional incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L, SPIRIZYME™ PLUS, SPIRIZYME™ FUEL, SPIRIZYME™ B4U, SPIRIZYME™ ULTRA y AMG™ E (de Novozymes A/S); OPTIDEX™ 300, GC480, GC417 (de Genencor Int.); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME™ G900, G-ZYME™ y G990 ZR (de Genencor Int.).

Amilasa maltogénica

[0097] La enzima generadora de fuentes de carbohidratos adicionales presente y/o añadida durante la etapa de sacarificación ii) y/o la etapa de fermentación iii) puede ser una alfa-amilasa maltogénica. Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa E.C. 3.2.1.133) es capaz de hidrolizar amilosa y amilopectina en maltosa en la configuración alfa. Una amilasa maltogénica de la cepa de *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está comercialmente disponible de Novozymes A/S. Alfa-amilasas maltogénicas se describen en las patentes de EE.UU. números 4.598.048, 4.604.355 y 6.162.628.

[0098] La amilasa maltogénica se puede añadir, en una forma de realización preferida, en una cantidad de 0,05-5 mg de proteína total/gramos de DS o 0,05-5 MANU/g de DS.

Materiales y métodos

Materiales:

[0099]

Alfa-amilasa A: alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones I181*+G182*+N193F truncada a 491 aminoácidos (SEC ID n.º: 1 aquí)

Glucoamilasa T: glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* descrita en la WO 99/28448 como SEC ID n.º: 7 y glucoamilasa de *Trametes cingulata* descrita en la WO 06/069289 en una proporción de aproximadamente 9:1.

Levadura: RED STAR ETHANOL RED™ disponible de Red Star/Lesaffre, EE.UU.

Métodos

[0100] Identidad: la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro "identidad".

[0101] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos, al igual que el grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos, se puede determinar por el programa "align" que es un alineamiento de Needleman-Wunsch (es decir un alineamiento global). El programa se usa para el alineamiento del polipéptido, al igual que secuencias de nucleótidos. La matriz de puntuación por defecto BLOSUM50 se usa para alineamientos de polipéptidos, y la matriz de identidad predeterminada se usa para alineamientos de nucleótidos. La penalización para el primer residuo de un espacio es -12 para polipéptidos y -16 para nucleótidos. Las penalizaciones para otros residuos de un espacio son -2 para polipéptidos, y -4 para nucleótidos.

[0102] "Align" es parte del paquete FASTA versión v20u6 (véase W. R. Pearson and D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448 y W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA," " Methods in Enzymology 183:63- 98). Los alineamientos de proteína FASTA usan el algoritmo de Smith-Waterman sin limitación en el tamaño del espacio (véase "Smith-Waterman algorithm", T. F. Smith and M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197).

Ensayos de proteasa

Ensayo de AZCL-caseína

[0103] Una solución de 0,2% del sustrato azul de AZCL-caseína se suspende en tampón Borax/NaH_2PO_4 pH9 durante la agitación. La solución se distribuye mientras se agita en placas de microtitulación (100 microL en cada pocillo), 30 microL de muestra enzimática se añade y las placas se incuban en un termomezclador Eppendorf durante 30 minutos a 45° C y 600 r.p.m. La muestra de enzima desnaturalizada (100°C a ebullición durante 20 min) se usa como un blanco. Tras la incubación, la reacción se detiene por transferencia de la placa de microtitulación sobre hielo y la solución coloreada se separa del sólido por centrifugación a 3.000 rpm durante 5 minutos a 4° C. 60 microL de sobrenadante se transfiren a una placa de microtitulación y la absorbancia a 595 nm se mide utilizando un lector de microplacas BioRad.

Ensayo de pNA

[0104] 50 microL de muestra que contiene proteasa se añade a una placa de microtitulación y el ensayo se inicia añadiendo 100 microL 1mM de sustrato pNA (5 mg disuelto en 100 microL DMSO y se diluye luego a 10 mL con tampón Borax/NaH_2PO_4 pH 9,0). El aumento en OD_{405} a temperatura ambiente se monitoriza como una medida de la actividad de proteasa.

Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0105] La actividad de glucoamilasa se puede medir en Unidades de Glucoamilasa (AGU).

[0106] La Unidad Novo de Glucoamilasa (AGU) es definida como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándar 37°C, pH 4,3, sustrato: maltosa 23,2 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

[0107] Un sistema autoanalizador se puede utilizar. Se añade mutarotasa al reactivo de glucosa deshidrogenasa de modo que cualquier alfa-D-glucosa presente se convierta en beta-D-glucosa. La glucosa deshidrogenasa reacciona específicamente con beta-D-glucosa en la reacción mencionada anteriormente, formando NADH que es determinada usando un fotómetro a 340 nm como una medida de la concentración de glucosa original.

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

[0108] Una carpeta (EB-SM-0131.02/01) que describe este método analítico con más detalle está disponible en la solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca, esta carpeta se incluye en la presente por referencia.

Actividad de alfa-amilasa (KNU)

[0109] La actividad de alfa-amilasa se puede determinar utilizando 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 por 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 azul se aclara y gradualmente se vuelve marrón rojizo, que se compara con un vidrio coloreado estándar.

[0110] Una Unidad Kilo Novo de amilasa alfa (KNU) se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (es decir, a 37°C +/- 0,05; 0,0003 M Ca^{2+}; y pH 5,6) dextriniza 5260 mg de sustancia seca de almidón Merck Amylum soluble.

[0111] Una carpeta EB-SM-0009.02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible bajo pedido en Novozymes A/S, Dinamarca, esta carpeta es incluida por la presente por referencia.

Actividad de KNU(S)

[0112] La(s) KNU(S) se utiliza(n) para determinar la actividad de *Bacillus stearothermophilus* y se describe(n) en Determinación de la actividad de pululanasa (NPUN)
La actividad de endo-pululanasa en NPUN se mide con respecto a una pululanasa de Novozymes estándar. Una unidad de pululanasa (NPUN) se define como la cantidad de enzima que libera 1 micro mol de glucosa por minuto bajo las condiciones estándar (0,7% de pululano rojo (Megazyme), pH 5, 40°C, 20 minutos). La actividad se mide en NPUN/ml usando pululano rojo.

[0113] 1 mL de muestra diluida o estándar se incuba a 40°C durante 2 minutos. 0,5 mL 2% de pululano rojo, 0,5 M KCl, 50 mM de ácido cítrico, pH 5 se agrega y se mezcla. Los tubos se incuban a 40°C durante 20 minutos y se

detienen añadiendo 2,5 ml 80% de etanol. Los tubos se dejan en reposo a temperatura ambiente durante 10-60 minutos seguidos de centrifugación 10 minutos a 4000 r.p.m. OD de los sobrenadantes se miden luego a 510 nm y la actividad se calcula utilizando una curva estándar.

Determinación de la actividad amilasa maltogénica (MANU)

[0114] Una MANU (Unidad Novo de amilasa maltogénica) se puede definir como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micro mol de maltosa por minuto a una concentración de 10 mg de sustrato de maltotriosa (Sigma M 8378) por ml de 0,1 M tampón de citrato, pH 5,0 a 37°C durante 30 minutos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Estabilidad de variantes de alfa-amilasa

[0115] La estabilidad de una alfa-amilasa de referencia (alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones I181*+G182*+N193F truncadas en 491 aminoácidos (SEC ID n.º: 1)) y variantes de alfa-amilasa de las mismas fue determinada por incubación de la alfa-amilasa de referencia y variantes a pH 4,5 y 5,5 y temperaturas de 75°C y 85°C con 0,12 mM de $CaCl_2$ seguidas de determinación de actividad residual utilizando el sustrato EnzChek® (kit de ensayo de Ultra amilasa EnzChek®, E33651, sondas moleculares).

[0116] Muestras de enzima purificada fueron diluidas en concentraciones de trabajo de 0,5 y 1 o 5 y 10 ppm (microgramos/ml) en el tampón de dilución enzimática (10 mM de acetato, 0,01% de Tritón X100, 0,12 mM de $CaCl_2$, pH 5,0). Una muestra de enzima de 20 microlitros fue transferida a PCR MTP de 48 pocillos y tampón de estabilidad de 180 microlitros (150 mM de acetato, 150 mM de MES, 0,01% de Tritón X100, 0,12 mM de $CaCl_2$, pH 4,5 o 5,5) se añadió a cada pocillo y se mezcló. El ensayo se realizó utilizando dos concentraciones de enzima por duplicado. Antes de la incubación a 75°C u 85°C, 20 microlitros fueron retirados y almacenados en hielo como muestras de control. La incubación fue realizada en una máquina de PCR a 75°C y 85°C. Después de que las muestras de incubación fueran diluidas a 15 ng/mL en el tampón de actividad residual (100 mM de acetato, 0,01% de Tritón X100, 0,12 mM de $CaCl_2$, pH 5,5) y 25 microlitros de enzima diluida fue transferido a 384-MTP negro. La actividad residual fue determinada utilizando el sustrato de EnzChek añadiendo 25 microlitros de solución de sustrato (100 microgramos/ml) en cada pocillo. La fluorescencia fue determinada cada minuto durante 15 minutos usando filtro de excitación a 485-P nm y filtro de emisión a 555 nm (lector de fluorescencia es Polarstar, BMG). La actividad residual fue normalizada para controlar las muestras para cada configuración. Asumiendo que el tiempo de vida media de deterioro logarítmico (T½ (min)) fue calculada utilizando la ecuación: T½ (min) = T(min)*LN(0,5)/LN(%RA/100), donde T es el período de incubación del ensayo en minutos, y %RA es % de actividad residual determinada en el ensayo.

[0117] Usando esta configuración de ensayo el tiempo de vida media fue determinado para la alfa-amilasa de referencia y variante de la misma como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

Mutaciones	T½ (min) (pH 4,5, 75°C, 0,12 mM $CaCl_2$)	T½ (min) (pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$)	T½ (min) (pH 5,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$)
Alfa-amilasa de referencia A	21	4	111
Alfa-amilasa de referencia A con la sustitución V59A	32	6	301
Alfa-amilasa de referencia A con la sustitución V59E	28	5	230
Alfa-amilasa de referencia A con la sustitución V59I	28	5	210
Alfa-amilasa de referencia A con la sustitución V59Q	30	6	250
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones V59A+Q89R+ G112D+E129V+K177L+R179E+ K220P+N224L+Q254S	149	22	ND
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+ N224L+Q254S	>180	28	ND
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones V59A+Q89R+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ Q254S+D269E+D281N	112	16	ND

Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones V59A+Q89R+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ Q254S+1270L	168	21	ND
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones V59A+Q89R+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ Q254S+H274K	>180	24	ND
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones V59A+Q89R+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ Q254S+Y276F	91	15	ND
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones V59A+E129V+ R157Y+K177L+R179E+K220P+ N224L+S242Q+Q254S	141	41	ND
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+H208Y+K220P+ N224L+S242Q+Q254S	>180	62	ND
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ S242Q+Q254S	>180	49	>480
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ S242Q+Q254S+H274K	>180	53	ND
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ S242Q+Q254S+Y276F	>180	57	ND
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ S242Q+Q254S+D281N	>180	37	ND
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ S242Q+Q254S+M284T	>180	51	ND
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ S242Q+Q254S+G416V	>180	45	ND
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ Q254S	143	21	>480
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ Q254S+M284T	>180	22	ND
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones A91L+M961+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ S242Q+Q254S	>180	38	ND
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones E129V+K177L+ R179E	57	11	402
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones E129V+K177L+ R179E+K220P+N224L+S242Q+ Q254S	174	44	>480
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+ Q254S+Y276F+L427M	>180	49	>480
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones E129V+K177L+ R179E+K220P+N224L+S242Q+ Q254S+M284T	>180	49	>480
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones E129V+K177L+ R179E+K220P+N224L+S242Q+ Q254S+N376*+I377*	177	36	>480
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones E129V+K177L+ R179E+K220P+N224L+Q254S	94	13	>480
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones E129V+K177L+ R179E+K220P+N224L+Q254S+ M284T	129	24	>480
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones E129V+K177L+ R179E+S242Q	148	30	>480
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones E129V+K177L+ R179V	78	9	>480
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones E129V+K177L+R179V+K220P+N224L+S242Q+ Q254S	178	31	>480
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones K220P+N224L+ S242Q+Q254S	66	17	>480
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones K220P+N224L+ Q254S	30	6	159
Alfa-amilasa de referencia A con la sustitución M284T	35	7	278
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones M284V	59	13	ND
ND no determinado			

[0118] Los resultados demuestran que las variantes de alfa-amilasa tienen una vida media y una estabilidad significativamente superior a las de la alfa-amilasa de referencia.

Ejemplo 2

Preparación de variantes de proteasa y prueba de termoestabilidad

[0119] Los productos químicos usados fueron productos comerciales de al menos calidad reactiva.

Cepas y plásmidos:

[0120] *E. coli* DH12S (disponible de Gibco BRL) fue usado para rescatar plásmido de levadura. pJTP000 es un vector transportador de *S. cerevisiae* y *E. coli* bajo el control del promotor TPI, construido a partir de pJC039 descrito en la WO 01/92502, donde el gen de proteasa de *Thermoascus aurantiacus* M35 (WO 03048353) se ha insertado.

[0121] Células competentes de *Saccharomyces cerevisiae* YNG318: MATa Dpep4[cir+]] ura3-52, leu2-D2, his 4-539 se usaron para la expresión de variantes de proteasa. Se describe en J. Biol. Chem. 272 (15), págs 9720-9727, 1997.

Medios y sustratos

[0122]

10X Solución basal: base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco) 66,8 g/L, succinato 100 g/l, NaOH 60 g/l.
SC-glucosa: 20 % glucosa (es decir, una concentración final de 2% = 2 g/100 mL)) 100 mL/L, 5 % de treonina 4 mL/L, 1% de troptófano 10 ml/l, 20 % de ácidos de casamino 25 ml/l, 10 X solución basal 100 ml/l. La solución se esteriliza utilizando un filtro de un tamaño de poro de 0,20 micrómetros. Agar (2%) y H_2O (aprox. 761 mL) se somete a autoclave juntos, y la solución de SC-glucosa esterilizada por separado se añade a la solución de agar.
YPD: bacto-peptona 20 g/l, extracto de levadura 10 g/L, 20 % glucosa 100 mL/L.
YPD+Zn: YPD+0,25 mM $ZnSO_4$.
PEG/LiAc solución: 40 % PEG4000 50 ml, 5 M acetato de litio 1 mL.
Placa de microtítulo de ceína de 96 pocillos:
Cada pocillo contiene 200 microL de 0,05-0,1 % de ceína (Sigma), 0,25 mM de $ZnSO_4$ y 1 % de agar en 20 mM de tampón de acetato sódico, pH 4,5.

Manipulaciones de ADN

[0123] A menos que se especifique lo contrario, se realizaron manipulaciones de ADN y transformaciones utilizando métodos estándar de biología molecular como se describe en Sambrook *et al*. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab. Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. *et al*. (eds.) "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R. and Cutting, S. M. (Eds.).

Transformación de levadura

[0124] La transformación de levadura fue realizada utilizando el método de acetato de litio. 0,5 microL de vector (digerido por endonucleasas de restricción) y 1 microL de fragmentos de PCR se mezclan. La mezcla de ADN, 100 microL de células competentes YNG318, y 10 microL de ADN portador fabricante de levadura (Clontech) se añade a un tubo de 12 mL de polipropileno (Falcon 2059). Añadir 0,6 mL de solución de PEG/LiAc y mezclar suavemente. Incubar durante 30 min a 30°C y 200 r.p.m. seguido de 30 min a 42°C (choque térmico). Transferencia a un tubo Eppendorf y centrifugar durante 5 seg. Eliminar el sobrenadante y redisolver en 3 mL de YPD. Incubar la suspensión de células durante 45 min a 200 r.p.m. a 30°C. Echar la suspensión en placas de SC-glucosa e incubar a 30°C durante 3 días para crecer colonias. ADN total de levadura se extrae mediante el kit Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep Kit (ZYMO research).

Secuenciación del ADN

[0125] La transformación de *E. coli* para secuenciación de ADN se efectuó por electroporación (BIO-RAD Gene Pulser). Los plásmidos de ADN fueron preparados por el método alcalino (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor) o con el kit de plásmido de Qiagen®. Fragmentos de ADN fueron recuperados de gel de agarosa por el kit de extracción en gel de Qiagen. PCR se realizó utilizando un motor de ADN PTC-200. El analizador genético ABI PRISMTM 310 se usó para determinar todas las secuencias de ADN.

Construcción del vector de expresión de proteasa

[0126] El gen de proteasa de Themoascus M35 fue amplificado con el par de cebador Prot F (SEC ID n.º: 4) y Prot R (SEC ID n.º: 5). Los fragmentos de la PCR resultantes fueron introducidos en el *S. cerevisiae* YNG318 con el vector pJC039 (descrito en la WO 2001/92502) digerido con enzimas de restricción para eliminar el gen de cutinasa de *Humicola insolens*.

[0127] El plásmido de los clones de levadura en las placas de SC-glucosa fue recuperado para confirmar la secuencia interna y se denominó pJTP001.

Construcción de biblioteca de levadura y variantes dirigidas al sitio

[0128] Se construyó una biblioteca de levadura y variantes dirigidas al sitio por el método de SOE PCR (empalme por extension de superposición, "PCR: A practical approach", p. 207-209, Oxford University press, eds. McPherson, Quirke, Taylor), seguido de recombinación *in vivo* con levadura.

Cebadores generales para amplificación y secuenciación

[0129] Los cebadores AM34 (SEC ID n.º: 6) y AM35 (SEC ID NO:7) fueron usados para crear fragmentos de ADN que contenían cualquier fragmento mutado por el método SOE junto con cebadores degenerados (AM34 + cebador antisentido y AM35 + cebador sentido) o sólo para amplificar un gen de proteasa entero (AM34 + AM35).

Sistema de reacción por PCR:	Condiciones:	
48,5 microL H_2O	1	94 °C 2 min
2 microesferas puRe Taq Ready-To-Go PCR (Amersham Biosciences)	2	94 °C 30 seg
0,5 MicroL X 2 100 pmole/microL de cebadores	3	55 °C 30 seg
0,5 MicroL modelo ADN	4	72 °C 90 seg
	2-4	25 ciclos
	5	72 °C 10 min

[0130] Fragmentos de ADN se recuperaron del gel de agarosa mediante el equipo de extracción en gel Quiagen. Los fragmentos purificados resultantes fueron mezclados con la asimilación del vector. La solución mezclada fue introducida en el *Saccharomyces cerevisiae* para construir bibliotecas o variantes dirigidas al sitio por recombinación *in vivo*.

Ensayo de actividad relativa

[0131] Clones de levadura en SC-glucosa fueron inoculadas a un pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos que contenía medio YPD+Zn y cultivados a 28°C durante 3 días. Los sobrenadantes del cultivo fueron aplicados a una placa de microtitulación de ceína de 96-pocillos e incubados a al menos 2 temperaturas (ej. 70 °C y 80°C) durante más de 4 horas o durante toda la noche. La turbidez de la ceína en la placa fue medida como A630 y la actividad relativa (temperaturas superior/inferiores) fue determinada como un indicador de mejora de la termoactividad. Los clones con actividad relativa más alta que la variante parental fueron seleccionados y la secuencia fue determinada.

Ensayo de actividad restante

[0132] Clones de levadura en SC-glucosa fueron inoculadas a un pocillo de una placa de microtitulación de 96-pocillos y cultivados a 28 °C durante 3 días. La actividad de proteasa fue medida a 65°C usando azocaseína (Megazyme) después de incubación del sobrenadante del cultivo en 20 mM de tampón de acetato sódico, pH 4,5, durante 10 min a una temperatura determinada (80°C u 84°C con 4°C como una referencia) para determinar la actividad restante. Los clones con mayor actividad restante que la variante parental fueron seleccionados y la secuencia fue determinada.

Ensayo de azocaseína

[0133] 20 microL de muestras fueron mezclados con 150 microL de solución de sustrato (4 mL de azocaseína al 12,5% en etanol en 96 mL de 20 mM de acetato sódico, pH 4,5, que contenía 0,01 % de tritón-100 y 0,25 mM $ZnSO_4$) e incubados durante 4 horas o más tiempo.

[0134] Después de añadir 20 microL/pocillo de 100 % de solución de ácido tricloroacético (ATC), la placa fue centrifugada y 100 microL de sobrenadantes se sacaron con pipeta para la medida A440.

Expresión de variantes de proteasa en *Aspergillus oryzae*

[0135] Los constructos que comprendían los genes de variante de proteasa fueron usados para construir vectores de expresión para *Aspergillus*. Los vectores de expresión de *Aspergillus* consisten en un casete de expresión basado en el promotor de amilasa II neutra de *Aspergillus niger* fusionado con la secuencia líder no traducida de triosa fosfato isomerasa de Aspergillus nidulans (Pna2/tpi) y el terminador de amiloglicosidasa de *Aspergillus niger* (Tamg). También estaba presente en el plásmido el marcador selectivo de *Aspergillus* amdS de *Aspergillus nidulans* que permite el crecimiento en la acetamida como única fuente de nitrógeno. Los plásmidos de expresión para variantes de proteasa fueron transformados en *Aspergillus* como se describe en Lassen *et al*. (2001), Appl. Environ. Microbiol.

67, 4701-4707. Para cada uno de los constructos, 10-20 cepas fueron aisladas, purificadas y cultivadas en frascos de agitación.

Purificación de variantes expresadas

[0136]

1. Ajustar el pH de la muestra de fermentación filtrada en 0,22 µm a 4,0.

2. Poner la muestra en un baño de hielo con agitación magnética. Añadir $(NH_4)_2SO_4$ en pequeñas partes alícuotas (correspondientes a aprox. 2,0-2,2 M $(NH_4)_2SO_4$ sin tener en cuenta el aumento en volumen cuando se añade el compuesto).

3. Después de la adición final de $(NH_4)_2SO_4$, incubar la muestra en el baño de hielo con agitación magnética suave durante 45 min.

4. Centrifugación: centrifugadora refrigerada de alta velocidad Hitachi himac CR20G equipada con cabeza de rotor R20A2, 5°C, 20.000 r.p.m., 30 min.

5. Disolver el precipitado formado en 200 mL 50 mM de Na-acetato pH 4,0.

6. Filtrar la muestra por succión de vacío utilizando una membrana PES PLUS de 0,22 micras (IWAKI).

7. Desalar/cambiar el tampón de la muestra a 50 mM de Na-acetato pH 4,0 usando ultrafiltración (Vivacell 250 de Vivascience equipado con membrana PES MWCO de 5 kDa) durante toda la noche en una cámara fría. Diluir el retenido de la muestra a 200 ml utilizando 50 mM de Na-acetato pH 4,0. La conductividad de la muestra es preferiblemente menor de 5 mS/cm.

8. Cargar la muestra en una columna de intercambio de cationes equilibrada con 50 mM de Na-acetato pH 4,0. Lavar la muestra no unida fuera de la columna utilizando 3 volúmenes de columna de tampón de unión (50 mM de Na-acetato pH 4,0), y eluir la muestra utilizando un gradiente lineal, 0-100% de tampón de elución (50 mM Na-acetato + 1 M de NaCl pH 4,0) en 10 volúmenes de columna.

9. Las fracciones recogidas se analizan por un ensayo de endoproteasa (véase más adelante) seguido de SDS-PAGE estándar (condiciones reductoras) en fracciones seleccionadas. Las fracciones se agrupan basadas en el ensayo de endoproteasa y SDS-PAGE.

Ensayo de endoproteasa

[0137]

1. Tableta de Protazyme OL/5 ml 250 mM de Na-acetato pH 5,0 se disuelve por agitación magnética (sustrato: tableta Protazyme AK de endoproteasa de Megazyme - cat. # PRAK 11/08).

2. Con agitación, 250 microL de solución de sustrato se transfiere a un tubo de 1,5 mL Eppendorf.

3. 25 microL de muestra se añaden a cada tubo (blanco es el tampón de muestra).

4. Los tubos se incuban en un termomezclador con agitación (1.000 r.p.m.) a 50°C durante 15 minutos.

5. 250 microL de 1 M NaOH se añade a cada tubo, seguido de agitación en vórtex.

6. Centrifugación durante 3 min. a 16,100 × G y 25°C.

7. 200 microL del sobrenadante se transfiere a un MTP, y la absorbancia a 590 nm se registra.

Tabla 2. Actividad relativa de variantes de proteasa. Numeración de sustitución(es) comienza de N-terminal del péptido maduro en los aminoácidos 1 a 177 de SEC ID n.º: 3.

Variante	Sustitución(es) y/o deleción(es)	Actividad restante	
		80°C	84°C
JTP082	ΔS5/D79L/S87P/A112P/D142L		53%
JTP091	D79L/S87P/A112P/T124V/D142L	43%	
JTP092	ΔS5/N26R/D79L/S87P/A112P/D142L		60%

JTP095	N26R/T46R/D79L/S87P/A112P/D142L		62%
JTP096	T46R/D79L/S87P/T116V/D142L		67%
JTP099	D79L/P81R/S87P/A112P/D142L		80%
JTP101	A27K/D79L/S87P/A112P/T124V/D142L	81%	
JTP116	D79L/Y82F/S87P/A112P/T124V/D142L	59%	
JTP117	D79L/Y82F/S87P/A112P/T124V/D142L	94%	
JTP127	D79L/S87P/A112P/T124V/A126V/D142L	53%	
JTP050	D79L S87P A112P D142L	23%	9%
JTP134	D79L Y82F S87P A112P D142L	40%	
JTP135	S38T D79L S87P A112P A126V D142L	62%	
JTP136	D79L Y82F S87P A112P A126V D142L	59%	
JTP137	A27K D79L S87P A112P A126V D142L	54%	
JTP145	S49P D79L S87P A112P D142L	59%	
JTP146	S50P D79L S87P A112P D142L	63%	
JTP148	D79L S87P D104P A112P D142L	64%	
JTP161	D79L Y82F S87G A112P D142L	30%	12%
JTP180	S70V D79L Y82F S87G Y97W A112P D142L	52%	
JTP181	D79L Y82F S87G Y97W D104P A112P D142L	45%	
JTP187	S70V D79L Y82F S87G A112P D142L	45%	
JTP188	D79L Y82F S87G D104P A112P D142L	43%	
JTP189	D79L Y82F S87G A112P A126V D142L	46%	
JTP193	Y82F S87G S70V D79L D104P A112P D142L		15%
JTP194	Y82F S87G D79L D104P A112P A126V D142L		22%
JTP196	A27K D79L Y82F S87G D104P A112P A126V D142L		18%

Tabla 4. Actividad relativa de variantes de proteasa. Numeración de sustitución(es) comienza desde N-terminal del péptido maduro en los aminoácidos 1 a 177 de SEC ID n.º: 3.

Variante	Sustituciones	Actividad relativa 80°C/70°C
JTP196	A27K D79L Y82F S87G D104P A112P A126V D142L	55%
JTP210	A27K Y82F S87G D104P A112P A126V D142L	36%
JTP211	A27K D79L Y82F D104P A112P A126V D142L	44%
JTP213	A27K Y82F D104P A112P A126V D142L	37%

Ejemplo 3

Perfil de temperatura de variantes de proteasa seleccionadas utilizando enzimas purificadas

[0138] Las variantes de proteasa seleccionadas que mostraron buena termoestabilidad fueron purificadas y las enzimas purificadas fueron usadas en un ensayo de ceína-BCA se describe más adelante. La actividad de la proteasa restante fue determinada a 60°C tras la incubación de la enzima a temperaturas elevadas como se indica durante 60 min.

Ensayo de ceína-BCA:

[0139] El ensayo de ceína-BCA fue realizado para detectar cuantificación de proteína soluble liberada de la ceína por proteasas variantes a varias temperaturas.

Protocolo:

[0140]

1) Mezclar 10 microL de 10 micro g/mL de soluciones enzimáticas y 100 microL de 0,025% de solución de ceína en una placa de microtitulación (MTP).
2) Incubar a varias temperaturas durante 60 min.
3) Añadir 10 microL de 100% de solución de ácido tricloroacético (ATC).
4) Centrifugar MTP a 3.500 rpm durante 5 min.
5) Extraer 15 microL a una nueva MTP conteniendo 100 microL de solución de ensayo BCA (Pierce Cat#:23225, equipo de ensayo de proteína BCA).
6) Incubar durante 30 min. a 60°C.
7) Medida A562.

[0141] Los resultados se muestran en la tabla 5. Todas las variantes de proteasa evaluadas mostraron una termoestabilidad mejorada en comparación con la proteasa de tipo salvaje (peso).

Tabla 5. Ensayo de ceína-BCA

Peso/variante	Muestra incubada 60 min a temperaturas indicadas (°C) (micro g/mL péptido equivalente de albúmina de suero bovino liberado)						
	60°C	70°C	75°C	80°C	85°C	90°C	95°C
Peso	94	103	107	93	58	38	
JTP050 (D79L+S87P+A112P+D142L)	86	101	107	107	104	63	36
JTP077 (A27K+D79L+S87P+A112P+D142L)	82	94	104	105	99	56	31
JTP188 (D79L+Y82F+S87G+D104P+A112P+D142L)	71	83	86	93	100	75	53
JTP196 (A27K+D79L+Y82F+S87G+D104P+A112P+A126V+D142L)	87	99	103	106	117	90	38

Ejemplo 4

Caracterización de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*

[0142] La glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se describe en SEC ID n.º: 9 aquí.
Sustrato. Sustrato: 1% de almidón soluble (Sigma S-9765) en agua desionizada
Tampón de reacción: 0,1 M de tampón de acetato a pH 5,3
Equipo de determinación de concentración de glucosa: equipo de ensayo de glucosa Wako (glucosa de LabAssay, WAKO, Cat# 298-65701).

[0143] Condición de reacción. 20 microL de almidón soluble y 50 microL de tampón de acetato a pH 5,3 fueron mezclados. 30 microL de solución enzimática (50 micro g de proteína enzimática/ml) se añadió a un volumen final de 100 microL seguido de incubación a 37°C durante 15 min.

[0144] La concentración de glucosa fue determinada por equipos Wako.

[0145] Todo el trabajo se realizó en paralelo.

[0146] Temperatura óptima. Para valorar la temperatura óptima de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* el ensayo de "condición de reacción" anteriormente descrito se realizó a 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90 y 95°C. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6 Temperatura óptima

Temperatura (°C)	20	30	40	50	60	70	80	85	90	95
Actividad	63,6	71,7	86,4	99,4	94,6	100,0	92,9	92,5	82,7	82,8

relativa (%)										

De los resultados se puede observar que la temperatura óptima para la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en las condiciones dadas es entre 50°C y 70°C y la glucoamilasa mantiene más del 80% de la actividad a 95°C.

[0147] Termoestabilidad. Para valorar la termoestabilidad de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* el ensayo de condición de reacción fue modificado en que la solución enzimática y el tampón de acetato fue preincubado durante 15 min a 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90 y 95°C. Después de la incubación, 20 microL de almidón se añadió a la solución y el ensayo fue realizado como se ha descrito anteriormente.

[0148] Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7 Termoestabilidad

Temperatura (°C)	20	30	40	50	60	70	80	85	90	95
Actividad relativa (%)	91,0	92,9	88,1	100,0	96,9	86,0	34,8	36,0	34,2	34,8

De los resultados se puede observar que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* es estable hasta 70 °C después de la preincubación durante 15 min en que mantiene más del 80% de la actividad.

[0149] PH óptimo. Para valorar el pH óptimo de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*, el ensayo de condición de reacción anteriormente descrito fue realizado a pH 2,0, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 y 11,0. En vez de usar el tampón de acetato descrito en el ensayo de condición de reacción, se usó el siguiente tampón 100mM de ácido succínico, HEPES, CHES, CAPSO, 1mM $CaCl_2$,150mM KCl, 0,01% Tritón X-100, pH ajustado a 2,0, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0 7,0, 8,0, 9,0,10,0 o 11,0 con HCl o NaOH.

[0150] Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8 pH óptimo

pH	2,0	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0
Actividad relativa (%)	71,4	78,6	77,0	91,2	84,2	100,0	55,5	66,7	30,9	17,8	15,9	16,1

De los resultados se puede observar que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en las condiciones dadas tiene la actividad máxima en pH 5,0. La glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* es activa en un margen de pH amplio en el que mantiene más del 50% de la actividad de pH 2 a 7.

[0151] Estabilidad de pH. Para valorar la termoestabilidad de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*, el ensayo de condición de reacción fue modificado en que la solución enzimática (50 micro g/mL) fue preincubada durante 20 horas en tampones con pH 2,0, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0 7,0, 8,0, 9,0,10,0 y 11,0 utilizando los tampones descritos bajo pH óptimo. Después de la preincubación, 20 microL de almidón soluble a un volumen final de 100 microL se añadió a la solución y el ensayo fue realizado como se ha descrito anteriormente.

[0152] Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9 estabilidad de pH

pH	2,0	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0
Actividad relativa (%)	17,4	98,0	98,0	103,2	100,0	93,4	71,2	90,7	58,7	17,4	17,0	17,2

De los resultados se puede observar que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* es estable de pH 3 a pH 7 después de la preincubación durante 20 horas y reduce su actividad a pH 8.

Ejemplo 5: evaluación de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en la pre-sacarificación a pH 5,0 y 70°C

[0153] Este ejemplo describe un proceso de producción de etanol donde la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* termoestable se usa en un proceso de pre-sacarificación seguido de un proceso de fermentación sin usar glucoamilasa adicional. Este proceso se compara con un proceso de producción de etanol tradicional donde el proceso de licuefacción es seguido de un proceso de SSF utilizando una glucoamilasa no termoestable.

[0154] Muestra de lodo. Una muestra de lodo preparada en la planta de ensayo del *National Corn to Ethanol Research Center* (NCERC) durante mayo de 2008 fue usada como materia prima para este estudio. La muestra fue preparada utilizando maíz molido completo (sin agua de proceso) en un % de sólidos secos objetivo de 32,0%. Se licuó a pH 5,80, 85°C durante 30 minutos utilizando 0,0246 KNU-s/g DS de alfa-amilasa A.

[0155] Tratamiento de licuefacción. Una pasta de maíz completamente licuada se preparó utilizando la muestra de lodo del NCERC anteriormente descrita como materia prima. En resumen, aproximadamente 400g de la pasta de lodo fueron ponderados en una botella de Nalgene de 1 L; la muestra de pasta de lodo fue ajustada a pH 5,80 utilizando 40% de H_2SO_4. 0,0740 KNU-s/g DS de alfa-amilasa A fue adicionado a la pasta que fue luego incubada a 85°C durante 1,5 horas más en un baño maría precalentado, con mezcla periódica.

[0156] Pre-sacarificación. Tras la incubación, la pasta fue dividida en partes alícuotas en dos botellas de Nalgene de 100mL, enfriadas hasta 70°C al baño maría y partes alícuotas de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* fueron adicionadas a cada pasta para alcanzar enzima final de 0 y 0,24 AGU/gDS. Las pastas fueron incubadas a 70°C durante 2 horas más en el baño maría, con mezcla periódica. Tras la incubación, las pastas fueron inmediatamente enfriadas a temperatura ambiente. Las pastas fueron ajustadas a pH 5,0 utilizando 10% de NaOH y se añadieron urea y penicilina para alcanzar concentraciones finales de 1.000 ppm y 3 ppm, respectivamente. Muestras pequeñas de cada pasta se tomaron para análisis de HPLC.

[0157] Los resultados se muestran en la tabla 10. Los resultados muestran que el porcentaje de almidón convertido en glucosa en la pre-sacarificación fue mejorado por la adición de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*.

Tabla 10

Pasta	Glucosa (g/l)	% almidón a glucosa
Control, sin glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en la pre-sacarificación	8,43	3,6%
0,24 AGU /g DS de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en la pre-sacarificación	136,91	58,5%

[0158] Fermentaciones. Antes de añadir aproximadamente 5g de pasta en cada tubo, cada tubo vacío fue pesado. Después de añadir las pastas en los tubos apropiados, todos los tubos fueron pesados nuevamente para medir los pesos de pasta iniciales. Luego se añadió solución madre de glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* al tubo de control para una dosis inicial de 0,50 AGU/g DS mientras que no se añadió glucoamilasa adicional a la muestra que recibió glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en la pre-sacarificación.

[0159] Levadura Red Star Ethanol Red de LeSaffre Corp. fue rehidratada en agua del grifo a 32°C durante 30 minutos (5,50 g en 100mLs de agua del grifo), y luego 100 microL de esta suspensión se añadió a cada tubo utilizando una pipeta repetidora. Agua desionizada fue también añadida a cada tubo para mantener un % de DS inicial constante. Después de la glucoamilasa de *Talaromyces emersonii*, agua, y levadura fueron adicionadas a cada tubo, fueron repesados y luego colocados en una cámara a temperatura constante de 32°C durante un total de 54 horas. Dos veces al día, los tubos fueron retirados de la cámara, agitados en vórtex para mezcla, repesados, y luego vueltos a colocar en la cámara para continuar las fermentaciones.

[0160] Después de 54 horas de fermentación, todos los tubos fueron agitados en vórtex, repesados y luego las fermentaciones fueron detenidas por adición de 50 microL de 40% de H_2SO_4 en cada tubo, seguido de agitación en vórtex profunda para mezclar. Los tubos fueron centrifugados a 1500xg durante 10 minutos y luego los sobrenadantes fueron filtrados por jeringa a través de filtros de nilón de 0,45 µm en viales de HPLC etiquetados. Las muestras fueron luego analizadas por HPLC para su contenido de etanol.

[0161] Los resultados se muestran en la tabla 11. Se puede observar que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* cuando se usa en la etapa de pre-sacarificación a pH 5,80 a 70 °C produjo una cantidad de etanol equivalente a la cantidad de etanol producida por el proceso convencional (control). Este es un resultado óptimo teniendo en cuenta que solo la mitad de la cantidad de la actividad de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se usó en comparación con la actividad de glucoamilasa de glucoamilasa T (0,5 AGU/g DS).

Tabla 11

Tratamiento	Etanol, g/L
Control, sin glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en la pre-	110,14

sacarificación, pero 0,5 AGU/g DS de glucoamilasa T glucoamilasa en la fermentación	
0,24 AGU /g DS glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en la pre-sacarificación	110,86

LISTADO DE SECUENCIAS

[0162]

<110> Novozymes A/S Deinhammer, Randy Li, Ming Duan, Junxin Lieu, Zheng Fukuyama, Shiro Ayabe, Keiichi Coward-Kelly, Guillermo
<120> Procesos para producir productos de fermentación
<130> 12134-CN-PCT
<160> 12
<170> Versión de PatentIn 3.5
<210> 1
<211> 515
<212> PRT
<213> *Bacillus stearothermophilus*
<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(515)
<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg Ile Tyr
165 170 175

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr
485 490 495

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

Ala Trp Pro
515

<210> 2
<211> 1068
<212> ADN
<213> *Thermoascus* aurantiacus
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1065)
<220>
<221> misc_signal
<222> (1)..(57)
<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(534)
<220>
<221> mat_peptide
<222> (535)..(1068)
<400> 2

```
atg cgg ctc gtt  gct tcc cta acg gcc  ttg gtg gcc ttg tcc  gta          45
Met Arg Leu Val  Ala Ser Leu Thr Ala  Leu Val Ala Leu Ser  Val
            -175                 -170                 -165

cct gtc ttt ccc  gct gct gtc aac gtg  aag cgt gct tcg tcc  tac          90
Pro Val Phe Pro  Ala Ala Val Asn Val  Lys Arg Ala Ser Ser  Tyr
            -160                 -155                 -150

ctg gag atc act  ctg agc cag gtc agc  aac act ctg atc aag  gcc         135
```

```
Leu Glu Ile Thr  Leu Ser Gln Val Ser  Asn Thr Leu Ile Lys  Ala
            -145                 -140                 -135

gtg gtc cag aac  act ggt agc gac gag  ttg tcc ttc gtt cac  ctg        180
Val Val Gln Asn  Thr Gly Ser Asp Glu  Leu Ser Phe Val His  Leu
            -130                 -125                 -120

aac ttc ttc aag  gac ccc gct cct gtc  aaa aag gta tcg gtc  tat        225
Asn Phe Phe Lys  Asp Pro Ala Pro Val  Lys Lys Val Ser Val  Tyr
            -115                 -110                 -105

cgc gat ggg tct  gaa gtg cag ttc gag ggc att ttg agc cgc tac aaa      273
Arg Asp Gly Ser  Glu Val Gln Phe Glu Gly Ile Leu Ser Arg Tyr Lys
            -100                 -95                  -90

tcg act ggc ctc tct cgt gac gcc ttt act tat ctg gct ccc gga gag       321
Ser Thr Gly Leu Ser Arg Asp Ala Phe Thr Tyr Leu Ala Pro Gly Glu
        -85                 -80                 -75

tcc gtc gag gac gtt ttt gat att gct tcg act tac gat ctg acc agc       369
Ser Val Glu Asp Val Phe Asp Ile Ala Ser Thr Tyr Asp Leu Thr Ser
    -70                 -65                 -60

ggc ggc cct gta act atc cgt act gag gga gtt gtt ccc tac gcc acg       417
Gly Gly Pro Val Thr Ile Arg Thr Glu Gly Val Val Pro Tyr Ala Thr
-55                 -50                 -45                 -40

gct aac agc act gat att gcc ggc tac atc tca tac tcg tct aat gtg       465
Ala Asn Ser Thr Asp Ile Ala Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Ser Asn Val
                -35                 -30                 -25

ttg acc att gat gtc gat ggc gcc gct gct gcc act gtc tcc aag gca       513
Leu Thr Ile Asp Val Asp Gly Ala Ala Ala Ala Thr Val Ser Lys Ala
            -20                 -15                 -10

atc act cct ttg gac cgc cgc act agg atc agt tcc tgc tcc ggc agc       561
Ile Thr Pro Leu Asp Arg Arg Thr Arg Ile Ser Ser Cys Ser Gly Ser
        -5              -1  1               5

aga cag agc gct ctt act acg gct ctc aga aac gct gct tct ctt gcc       609
Arg Gln Ser Ala Leu Thr Thr Ala Leu Arg Asn Ala Ala Ser Leu Ala
10                  15                  20                  25

aac gca gct gcc gac gcg gct cag tct gga tca gct tca aag ttc agc       657
Asn Ala Ala Ala Asp Ala Ala Gln Ser Gly Ser Ala Ser Lys Phe Ser
                30                  35                  40

gag tac ttc aag act act tct agc tct acc cgc cag acc gtg gct gcg       705
Glu Tyr Phe Lys Thr Thr Ser Ser Ser Thr Arg Gln Thr Val Ala Ala
            45                  50                  55

cgt ctt cgg gct gtt gcg cgg gag gca tct tcg tct tct tcg gga gcc       753
Arg Leu Arg Ala Val Ala Arg Glu Ala Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ala
        60                  65                  70

acc acg tac tac tgc gac gat ccc tac ggc tac tgt tcc tcc aac gtc       801
Thr Thr Tyr Tyr Cys Asp Asp Pro Tyr Gly Tyr Cys Ser Ser Asn Val
    75                  80                  85

ctg gct tac acc ctg cct tca tac aac ata atc gcc aac tgt gac att       849
Leu Ala Tyr Thr Leu Pro Ser Tyr Asn Ile Ile Ala Asn Cys Asp Ile
90                  95                  100                 105

ttc tat act tac ctg ccg gct ctg acc agt acc tgt cac gct cag gat       897
Phe Tyr Thr Tyr Leu Pro Ala Leu Thr Ser Thr Cys His Ala Gln Asp
```

```
                    110                 115                 120

caa gcg acc act gcc ctt cac gag ttc acc cat gcg cct ggc gtc tac        945
Gln Ala Thr Thr Ala Leu His Glu Phe Thr His Ala Pro Gly Val Tyr
            125                 130                 135

agc cct ggc acg gac gac ctg gcg tat ggc tac cag gct gcg atg ggt        993
Ser Pro Gly Thr Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Tyr Gln Ala Ala Met Gly
        140                 145                 150

ctc agc agc agc cag gct gtc atg aac gct gac acc tac gct ctc tat       1041
Leu Ser Ser Ser Gln Ala Val Met Asn Ala Asp Thr Tyr Ala Leu Tyr
    155                 160                 165

gcg aat gcc ata tac ctt ggt tgc taa                                   1068
Ala Asn Ala Ile Tyr Leu Gly Cys
170                 175
```

<210> 3
<211> 355
<212> PRT
<213> *Thermoascus* aurantiacus
<400> 3

Met Arg Leu Val Ala Ser Leu Thr Ala Leu Val Ala Leu Ser Val
-175 -170 -165

Pro Val Phe Pro Ala Ala Val Asn Val Lys Arg Ala Ser Ser Tyr
-160 -155 -150

Leu Glu Ile Thr Leu Ser Gln Val Ser Asn Thr Leu Ile Lys Ala
-145 -140 -135

Val Val Gln Asn Thr Gly Ser Asp Glu Leu Ser Phe Val His Leu
-130 -125 -120

Asn Phe Phe Lys Asp Pro Ala Pro Val Lys Lys Val Ser Val Tyr
-115 -110 -105

Arg Asp Gly Ser Glu Val Gln Phe Glu Gly Ile Leu Ser Arg Tyr Lys
-100 -95 -90

Ser Thr Gly Leu Ser Arg Asp Ala Phe Thr Tyr Leu Ala Pro Gly Glu
-85 -80 -75

Ser Val Glu Asp Val Phe Asp Ile Ala Ser Thr Tyr Asp Leu Thr Ser
-70 -65 -60

Gly Gly Pro Val Thr Ile Arg Thr Glu Gly Val Val Pro Tyr Ala Thr
-55 -50 -45 -40

Ala Asn Ser Thr Asp Ile Ala Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Ser Asn Val
-35 -30 -25

Leu Thr Ile Asp Val Asp Gly Ala Ala Ala Ala Thr Val Ser Lys Ala
-20 -15 -10

Ile Thr Pro Leu Asp Arg Arg Thr Arg Ile Ser Ser Cys Ser Gly Ser
-5 -1 1 5

Arg Gln Ser Ala Leu Thr Thr Ala Leu Arg Asn Ala Ala Ser Leu Ala
10 15 20 25

Asn Ala Ala Ala Asp Ala Ala Gln Ser Gly Ser Ala Ser Lys Phe Ser
30 35 40

Glu Tyr Phe Lys Thr Thr Ser Ser Ser Thr Arg Gln Thr Val Ala Ala
45 50 55

Arg Leu Arg Ala Val Ala Arg Glu Ala Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ala
60 65 70

Thr Thr Tyr Tyr Cys Asp Asp Pro Tyr Gly Tyr Cys Ser Ser Asn Val
75 80 85

Leu Ala Tyr Thr Leu Pro Ser Tyr Asn Ile Ile Ala Asn Cys Asp Ile
90 95 100 105

Phe Tyr Thr Tyr Leu Pro Ala Leu Thr Ser Thr Cys His Ala Gln Asp
110 115 120

Gln Ala Thr Thr Ala Leu His Glu Phe Thr His Ala Pro Gly Val Tyr
125 130 135

Ser Pro Gly Thr Asp Asp Leu Ala Tyr Gly Tyr Gln Ala Ala Met Gly
140 145 150

Leu Ser Ser Ser Gln Ala Val Met Asn Ala Asp Thr Tyr Ala Leu Tyr
155 160 165

Ala Asn Ala Ile Tyr Leu Gly Cys
170 175

<210> 4
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Constructo sintético
<400> 4

aacgacggta cccggggatc ggatccatgc ggctcgttgc ttccctaac 49

<210> 5
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Constructo artificial
<400> 5
ctaattacat gatgcggccc ttaattaatt agcaaccaag gtatatgg 48
<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Constructo artificial
<400> 6
taggagttta gtgaacttgc 20
<210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Constructo artificial
<400> 7
ttcgagcgtc ccaaaacc 18
<210> 8
<211> 1851
<212> ADN
<213> *Penicillium oxalicum*
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1851)
<400> 8

```
atg cgt ctc act cta tta tca ggt gta gcc ggc gtt ctc tgc gca gga      48
Met Arg Leu Thr Leu Leu Ser Gly Val Ala Gly Val Leu Cys Ala Gly
1               5                   10                  15

cag ctg acg gcg gcg cgt cct gat ccc aag ggt ggg aat ctg acg ccg      96
Gln Leu Thr Ala Ala Arg Pro Asp Pro Lys Gly Gly Asn Leu Thr Pro
            20                  25                  30

ttc atc cac aaa gag ggc gag cgg tcg ctc caa ggc atc ttg gac aat     144
Phe Ile His Lys Glu Gly Glu Arg Ser Leu Gln Gly Ile Leu Asp Asn
        35                  40                  45

ctc ggt ggg cga ggt aag aaa aca ccc ggc act gcc gca ggg ttg ttt     192
Leu Gly Gly Arg Gly Lys Lys Thr Pro Gly Thr Ala Ala Gly Leu Phe
    50                  55                  60

att gcc agt cca aac aca gag aat cca aac tat tat tat aca tgg act     240
Ile Ala Ser Pro Asn Thr Glu Asn Pro Asn Tyr Tyr Tyr Thr Trp Thr
```

```
65                  70                  75                  80

cgt gac tca gct ttg act gcc aag tgc ttg atc gac ctg ttc gaa gac      288
Arg Asp Ser Ala Leu Thr Ala Lys Cys Leu Ile Asp Leu Phe Glu Asp
                85                  90                  95

tct cgg gca aag ttt cca att gac cgc aaa tac ttg gaa aca gga att      336
Ser Arg Ala Lys Phe Pro Ile Asp Arg Lys Tyr Leu Glu Thr Gly Ile
            100                 105                 110

cgg gac tac gtg tcg tcc caa gca atc ctc cag agt gtg tct aat cct      384
Arg Asp Tyr Val Ser Ser Gln Ala Ile Leu Gln Ser Val Ser Asn Pro
        115                 120                 125

tct gga acc ctg aag gat ggc tct ggt ctg ggt gaa ccc aag ttt gag      432
Ser Gly Thr Leu Lys Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu
    130                 135                 140

att gac ctg aat ccc ttt tcg ggt gcc tgg ggt cgg cct cag cgg gat      480
Ile Asp Leu Asn Pro Phe Ser Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp
145                 150                 155                 160

ggc cca gcg ctg cga gcg acc gct atg atc acc tac gcc aac tac ctg      528
Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile Thr Tyr Ala Asn Tyr Leu
                165                 170                 175

ata tcc cat ggt cag aaa tcg gat gtg tca cag gtc atg tgg ccg att      576
Ile Ser His Gly Gln Lys Ser Asp Val Ser Gln Val Met Trp Pro Ile
            180                 185                 190

att gcc aat gat cta gca tat gtt ggt caa tac tgg aat aat acc gga      624
Ile Ala Asn Asp Leu Ala Tyr Val Gly Gln Tyr Trp Asn Asn Thr Gly
        195                 200                 205

ttt gac ctg tgg gaa gag gtg gat ggg tca agc ttt ttc acg att gcg      672
Phe Asp Leu Trp Glu Glu Val Asp Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile Ala
    210                 215                 220

gtc cag cac cga gcc ctt gtt gaa ggc tcg caa ctg gcg aaa aag ctc      720
Val Gln His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser Gln Leu Ala Lys Lys Leu
225                 230                 235                 240

ggc aag tcc tgc gat gcc tgt gat tct cag cct ccc cag ata ttg tgt      768
Gly Lys Ser Cys Asp Ala Cys Asp Ser Gln Pro Pro Gln Ile Leu Cys
                245                 250                 255

ttc ctg cag agt ttc tgg aac gga aag tac atc acc tcc aac atc aac      816
Phe Leu Gln Ser Phe Trp Asn Gly Lys Tyr Ile Thr Ser Asn Ile Asn
            260                 265                 270

acg caa gca agc cgc tct ggt atc gac ctg gac tct gtc ctg gga agc      864
Thr Gln Ala Ser Arg Ser Gly Ile Asp Leu Asp Ser Val Leu Gly Ser
        275                 280                 285

att cat acc ttt gat ccc gaa gca gcc tgt gac gat gca act ttc cag      912
Ile His Thr Phe Asp Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp Ala Thr Phe Gln
    290                 295                 300

cct tgt tct gcc cgc gct ctg gcg aac cac aag gtc tat gtg gat tcc      960
Pro Cys Ser Ala Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Val Tyr Val Asp Ser
305                 310                 315                 320

ttc cgc tct atc tac aag att aat gcg ggt ctt gca gag gga tcg gct     1008
Phe Arg Ser Ile Tyr Lys Ile Asn Ala Gly Leu Ala Glu Gly Ser Ala
                325                 330                 335
```

gcc aac gtt ggc cgc tac ccc gag gat gtt tac caa gga ggc aat cca 1056
Ala Asn Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Gln Gly Gly Asn Pro
340 345 350

tgg tat ctc gcc acc cta ggc gca tct gaa ttg ctt tac gac gcc ttg 1104
Trp Tyr Leu Ala Thr Leu Gly Ala Ser Glu Leu Leu Tyr Asp Ala Leu
355 360 365

tac cag tgg gac aga ctt ggc aaa ctt gaa gtc tcg gag acc tcg ttg 1152
Tyr Gln Trp Asp Arg Leu Gly Lys Leu Glu Val Ser Glu Thr Ser Leu
370 375 380

tca ttc ttc aaa gac ttt gac gcg acc gtg aaa att ggc tcg tac tcg 1200
Ser Phe Phe Lys Asp Phe Asp Ala Thr Val Lys Ile Gly Ser Tyr Ser
385 390 395 400

agg aac agc aag acc tac aag aaa ttg acc cag tcc atc aag tcg tac 1248
Arg Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Lys Leu Thr Gln Ser Ile Lys Ser Tyr
405 410 415

gcg gac ggg ttc atc cag tta gtg cag cag tac act cct tct aat gga 1296
Ala Asp Gly Phe Ile Gln Leu Val Gln Gln Tyr Thr Pro Ser Asn Gly
420 425 430

tct ctg gcc gag caa tac gat cgc aat acg gct gct cct ctc tct gca 1344
Ser Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Arg Asn Thr Ala Ala Pro Leu Ser Ala
435 440 445

aac gat ctg act tgg tca ttt gcc tct ttc ttg acg gct acg caa cgc 1392
Asn Asp Leu Thr Trp Ser Phe Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Gln Arg
450 455 460

cgc gat gcc gtg gtt cct ccc tcc tgg ggc gca aag tcg gca aac aaa 1440
Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Ser Trp Gly Ala Lys Ser Ala Asn Lys
465 470 475 480

gtc cca acc act tgt tca gcc tcc cct gtt gtg ggt act tat aag gcg 1488
Val Pro Thr Thr Cys Ser Ala Ser Pro Val Val Gly Thr Tyr Lys Ala
485 490 495

ccc acg gca act ttc tca tcc aag act aag tgc gtc ccc gct aaa gat 1536
Pro Thr Ala Thr Phe Ser Ser Lys Thr Lys Cys Val Pro Ala Lys Asp
500 505 510

att gtg cct atc acg ttc tac ctg att gag aac act tac tat gga gag 1584
Ile Val Pro Ile Thr Phe Tyr Leu Ile Glu Asn Thr Tyr Tyr Gly Glu
515 520 525

aac gtc ttc atg agt ggc aac att act gcg ctg ggt aac tgg gac gcc 1632
Asn Val Phe Met Ser Gly Asn Ile Thr Ala Leu Gly Asn Trp Asp Ala
530 535 540

aag aaa ggc ttc cca ctc acc gca aac ctc tac acg caa gat caa aac 1680
Lys Lys Gly Phe Pro Leu Thr Ala Asn Leu Tyr Thr Gln Asp Gln Asn
545 550 555 560

ttg tgg ttc gcc agt gtc gag ttc atc cca gca ggc aca ccc ttt gag 1728
Leu Trp Phe Ala Ser Val Glu Phe Ile Pro Ala Gly Thr Pro Phe Glu
565 570 575

tac aag tac tac aag gtc gag ccc aat ggc gat att act tgg gag aag 1776
Tyr Lys Tyr Tyr Lys Val Glu Pro Asn Gly Asp Ile Thr Trp Glu Lys
580 585 590

```
ggt ccc aac cgg gtg ttc gtc gct ccc acg gga tgc cca gtt cag cct      1824
Gly Pro Asn Arg Val Phe Val Ala Pro Thr Gly Cys Pro Val Gln Pro
        595                 600                 605

cac tcc aac gac gtg tgg cag ttt tga                                  1851
His Ser Asn Asp Val Trp Gln Phe
    610                 615
```

<210> 9
<211> 616
<212> PRT
<213> *Penicillium oxalicum*
<400> 9

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

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

Phe Ile His Lys Glu Gly Glu Arg Ser Leu Gln Gly Ile Leu Asp Asn
35 40 45

Leu Gly Gly Arg Gly Lys Lys Thr Pro Gly Thr Ala Ala Gly Leu Phe
50 55 60

Ile Ala Ser Pro Asn Thr Glu Asn Pro Asn Tyr Tyr Tyr Thr Trp Thr
65 70 75 80

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

Ser Arg Ala Lys Phe Pro Ile Asp Arg Lys Tyr Leu Glu Thr Gly Ile
100 105 110

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

Ser Gly Thr Leu Lys Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu
130 135 140

Ile Asp Leu Asn Pro Phe Ser Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp
145 150 155 160

Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile Thr Tyr Ala Asn Tyr Leu
165 170 175

Ile Ser His Gly Gln Lys Ser Asp Val Ser Gln Val Met Trp Pro Ile
180 185 190

Ile Ala Asn Asp Leu Ala Tyr Val Gly Gln Tyr Trp Asn Asn Thr Gly

195 200 205

Phe Asp Leu Trp Glu Glu Val Asp Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile Ala
210 215 220

Val Gln His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser Gln Leu Ala Lys Lys Leu
225 230 235 240

Gly Lys Ser Cys Asp Ala Cys Asp Ser Gln Pro Pro Gln Ile Leu Cys
245 250 255

Phe Leu Gln Ser Phe Trp Asn Gly Lys Tyr Ile Thr Ser Asn Ile Asn
260 265 270

Thr Gln Ala Ser Arg Ser Gly Ile Asp Leu Asp Ser Val Leu Gly Ser
275 280 285

Ile His Thr Phe Asp Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp Ala Thr Phe Gln
290 295 300

Pro Cys Ser Ala Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Val Tyr Val Asp Ser
305 310 315 320

Phe Arg Ser Ile Tyr Lys Ile Asn Ala Gly Leu Ala Glu Gly Ser Ala
325 330 335

Ala Asn Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Gln Gly Gly Asn Pro
340 345 350

Trp Tyr Leu Ala Thr Leu Gly Ala Ser Glu Leu Leu Tyr Asp Ala Leu
355 360 365

Tyr Gln Trp Asp Arg Leu Gly Lys Leu Glu Val Ser Glu Thr Ser Leu
370 375 380

Ser Phe Phe Lys Asp Phe Asp Ala Thr Val Lys Ile Gly Ser Tyr Ser
385 390 395 400

Arg Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Lys Leu Thr Gln Ser Ile Lys Ser Tyr
405 410 415

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

Ser Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Arg Asn Thr Ala Ala Pro Leu Ser Ala
435 440 445

Asn Asp Leu Thr Trp Ser Phe Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Gln Arg
450 455 460

Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Ser Trp Gly Ala Lys Ser Ala Asn Lys
465 470 475 480

Val Pro Thr Thr Cys Ser Ala Ser Pro Val Val Gly Thr Tyr Lys Ala
485 490 495

Pro Thr Ala Thr Phe Ser Ser Lys Thr Lys Cys Val Pro Ala Lys Asp
500 505 510

Ile Val Pro Ile Thr Phe Tyr Leu Ile Glu Asn Thr Tyr Tyr Gly Glu
515 520 525

Asn Val Phe Met Ser Gly Asn Ile Thr Ala Leu Gly Asn Trp Asp Ala
530 535 540

Lys Lys Gly Phe Pro Leu Thr Ala Asn Leu Tyr Thr Gln Asp Gln Asn
545 550 555 560

Leu Trp Phe Ala Ser Val Glu Phe Ile Pro Ala Gly Thr Pro Phe Glu
565 570 575

Tyr Lys Tyr Tyr Lys Val Glu Pro Asn Gly Asp Ile Thr Trp Glu Lys
580 585 590

Gly Pro Asn Arg Val Phe Val Ala Pro Thr Gly Cys Pro Val Gln Pro
595 600 605

His Ser Asn Asp Val Trp Gln Phe
610 615

<210> 10
<211> 4014
<212> DNA
<213> Thermococcus hydrothermalis

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(4011)

<220>
<221> misc_signal
<222> (1)..(81)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (82)..(4014)

<400> 10
atg agg cgg gtg gtt gcc ctc ttc att gca att ttg atg ctt gga agc
Met Arg Arg Val Val Ala Leu Phe Ile Ala Ile Leu Met Leu Gly Ser
-25 -20 -15

```
atc gtt gga gcg aac gtt aag agc gtt ggc gcg gcg gag ccg aag ccg        96
Ile Val Gly Ala Asn Val Lys Ser Val Gly Ala Ala Glu Pro Lys Pro
    -10                 -5              -1  1               5

ctc aac gtc ata ata gtc tgg cac cag cac cag ccc tac tac tac gac       144
Leu Asn Val Ile Ile Val Trp His Gln His Gln Pro Tyr Tyr Tyr Asp
                10                  15                  20

cct gtc cag gac gtc tac acc agg ccc tgg gtc agg ctc cac gcg gcg       192
Pro Val Gln Asp Val Tyr Thr Arg Pro Trp Val Arg Leu His Ala Ala
            25                  30                  35

aac aac tac tgg aag atg gcc cac tac ctg agc cag tac ccg gag gtt       240
Asn Asn Tyr Trp Lys Met Ala His Tyr Leu Ser Gln Tyr Pro Glu Val
        40                  45                  50

cac gcc acc att gac ctc tcg ggt tcg ctg ata gcc cag ctt gcc gac       288
His Ala Thr Ile Asp Leu Ser Gly Ser Leu Ile Ala Gln Leu Ala Asp
    55                  60                  65

tac atg aac ggc aag aag gac acc tac cag ata atc acc gag aag ata       336
Tyr Met Asn Gly Lys Lys Asp Thr Tyr Gln Ile Ile Thr Glu Lys Ile
70                  75                  80                  85

gcc aac ggg gaa ccc ctc acc gtc gac gag aag tgg ttc atg ctc cag       384
Ala Asn Gly Glu Pro Leu Thr Val Asp Glu Lys Trp Phe Met Leu Gln
                90                  95                  100

gca ccg gga ggg ttc ttc gac aac acc atc ccc tgg aac ggt gaa ccg       432
Ala Pro Gly Gly Phe Phe Asp Asn Thr Ile Pro Trp Asn Gly Glu Pro
            105                 110                 115

ata acc gac ccc aac ggc aac ccg ata agg gac ttc tgg gac cgc tac       480
Ile Thr Asp Pro Asn Gly Asn Pro Ile Arg Asp Phe Trp Asp Arg Tyr
        120                 125                 130

acg gag ctg aag aac aag atg ctc agc gca aag gcc aag tac gca aac       528
Thr Glu Leu Lys Asn Lys Met Leu Ser Ala Lys Ala Lys Tyr Ala Asn
    135                 140                 145

ttc gtg act gag agc cag aag gtc gct gtg acg aac gag ttc aca gag       576
Phe Val Thr Glu Ser Gln Lys Val Ala Val Thr Asn Glu Phe Thr Glu
150                 155                 160                 165

cag gac tac ata gac cta gcg gtt ctc ttc aat ctc gct tgg att gac       624
Gln Asp Tyr Ile Asp Leu Ala Val Leu Phe Asn Leu Ala Trp Ile Asp
                170                 175                 180

tac aat tac atc acg agc acg ccg gag ttc aag gcc ctc tac gac aag       672
Tyr Asn Tyr Ile Thr Ser Thr Pro Glu Phe Lys Ala Leu Tyr Asp Lys
            185                 190                 195

gtt gac gag ggc ggc tat aca agg gcg gac gtc aaa acc gtt ctc gac       720
Val Asp Glu Gly Gly Tyr Thr Arg Ala Asp Val Lys Thr Val Leu Asp
        200                 205                 210

gcc cag atc tgg ctt ctc aac cac acc ttc gag gag cac gag aag ata       768
Ala Gln Ile Trp Leu Leu Asn His Thr Phe Glu Glu His Glu Lys Ile
    215                 220                 225

aac ctc ctc ctc gga aac ggc aac gtc gag gtc acg gtc gtt ccc tac       816
Asn Leu Leu Leu Gly Asn Gly Asn Val Glu Val Thr Val Val Pro Tyr
230                 235                 240                 245

gcc cac ccg ata ggc ccg ata ctc aac gac ttc ggc tgg gac agc gac       864
```

```
Ala His Pro Ile Gly Pro Ile Leu Asn Asp Phe Gly Trp Asp Ser Asp
                250                 255                 260

ttc aac gac cag gtc aag aag gcc gac gaa ctg tac aag ccg tac ctc        912
Phe Asn Asp Gln Val Lys Lys Ala Asp Glu Leu Tyr Lys Pro Tyr Leu
            265                 270                 275

ggc ggc ggc acc gcg gtt cca aaa ggc gga tgg gcg gct gag agc gcc        960
Gly Gly Gly Thr Ala Val Pro Lys Gly Gly Trp Ala Ala Glu Ser Ala
        280                 285                 290

ctc aac gac aaa act ctg gag atc ctc gcc gag aac ggc tgg gag tgg       1008
Leu Asn Asp Lys Thr Leu Glu Ile Leu Ala Glu Asn Gly Trp Glu Trp
    295                 300                 305

gtc atg acc gac cag atg gtt ctc gga aag ctc ggc att gag gga acc       1056
Val Met Thr Asp Gln Met Val Leu Gly Lys Leu Gly Ile Glu Gly Thr
310                 315                 320                 325

gtc gag aac tac cac aag ccc tgg gtg gcc gag ttc aac gga aag aag       1104
Val Glu Asn Tyr His Lys Pro Trp Val Ala Glu Phe Asn Gly Lys Lys
                330                 335                 340

ata tac ctc ttc cca aga aat cac gat cta agt gac aga gtt ggc ttt       1152
Ile Tyr Leu Phe Pro Arg Asn His Asp Leu Ser Asp Arg Val Gly Phe
            345                 350                 355

acc tac agc gga atg aac cag cag cag gcc gtt gag gac ttc gtc aac       1200
Thr Tyr Ser Gly Met Asn Gln Gln Gln Ala Val Glu Asp Phe Val Asn
        360                 365                 370

gag ctc ctc aag ctc cag aag cag aac tac gat ggc tcg ctg gtt tac       1248
Glu Leu Leu Lys Leu Gln Lys Gln Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Val Tyr
    375                 380                 385

gtg gtc acg ctc gac ggc gag aac ccc gtg gag aac tac ccc tac gac       1296
Val Val Thr Leu Asp Gly Glu Asn Pro Val Glu Asn Tyr Pro Tyr Asp
390                 395                 400                 405

ggg gag ctc ttc ctc acc gaa ctc tac aag aag ctg acc gaa ctc cag       1344
Gly Glu Leu Phe Leu Thr Glu Leu Tyr Lys Lys Leu Thr Glu Leu Gln
                410                 415                 420

gag cag ggt ctc ata aga acc ctc acc ccg agc gag tac atc cag ctc       1392
Glu Gln Gly Leu Ile Arg Thr Leu Thr Pro Ser Glu Tyr Ile Gln Leu
            425                 430                 435

tac ggc gac aag gcc aac aag ctc aca cct cgg atg atg gag cgc ctt       1440
Tyr Gly Asp Lys Ala Asn Lys Leu Thr Pro Arg Met Met Glu Arg Leu
        440                 445                 450

gac ctc acc gga gac aac gtt aac gcc ctc ctc aag gcc cag agc ctc       1488
Asp Leu Thr Gly Asp Asn Val Asn Ala Leu Leu Lys Ala Gln Ser Leu
    455                 460                 465

ggc gaa ctc tac gac atg acc ggc gtt aag gag gag atg cag tgg ccc       1536
Gly Glu Leu Tyr Asp Met Thr Gly Val Lys Glu Glu Met Gln Trp Pro
470                 475                 480                 485

gag agc agc tgg ata gac gga acc ctc tcc acg tgg ata ggc gag ccc       1584
Glu Ser Ser Trp Ile Asp Gly Thr Leu Ser Thr Trp Ile Gly Glu Pro
                490                 495                 500

cag gag aac tac ggc tgg tac tgg ctc tac atg gcc agg aag gcc ctt       1632
Gln Glu Asn Tyr Gly Trp Tyr Trp Leu Tyr Met Ala Arg Lys Ala Leu
```

```
            505                 510                 515

atg gag aac aag gat aaa atg agc cag gcg gac tgg gag aag gcc tac      1680
Met Glu Asn Lys Asp Lys Met Ser Gln Ala Asp Trp Glu Lys Ala Tyr
        520                 525                 530

gag tac ctg ctc cgc gcc gag gca agc gac tgg ttc tgg tgg tac gga      1728
Glu Tyr Leu Leu Arg Ala Glu Ala Ser Asp Trp Phe Trp Trp Tyr Gly
    535                 540                 545

agc gac cag gac agc ggc cag gac tac acc ttc gac cgc tac ctg aag      1776
Ser Asp Gln Asp Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Asp Arg Tyr Leu Lys
550                 555                 560                 565

acc tac ctc tac gag atg tac aag ctg gca gga gtc gag ccg ccg agc      1824
Thr Tyr Leu Tyr Glu Met Tyr Lys Leu Ala Gly Val Glu Pro Pro Ser
                570                 575                 580

tac ctc ttc ggc aac tac ttc ccg gac gga gag ccc tac acc acg agg      1872
Tyr Leu Phe Gly Asn Tyr Phe Pro Asp Gly Glu Pro Tyr Thr Thr Arg
            585                 590                 595

ggc ctg gtc gga ctc aag gac ggc gag atg aag aac ttc tcc agc atg      1920
Gly Leu Val Gly Leu Lys Asp Gly Glu Met Lys Asn Phe Ser Ser Met
        600                 605                 610

tcc ccg ctg gca aag ggc gtg agc gtc tat ttc gac ggc gag ggg ata      1968
Ser Pro Leu Ala Lys Gly Val Ser Val Tyr Phe Asp Gly Glu Gly Ile
    615                 620                 625

cac ttc ata gtg aaa ggg aac ctg gac agg ttc gag gtg agc atc tgg      2016
His Phe Ile Val Lys Gly Asn Leu Asp Arg Phe Glu Val Ser Ile Trp
630                 635                 640                 645

gag aag gat gag cgc gtt ggc aac acg ttc acc cgc ctc caa gag aag      2064
Glu Lys Asp Glu Arg Val Gly Asn Thr Phe Thr Arg Leu Gln Glu Lys
                650                 655                 660

ccg gac gag ttg agc tat ttc atg ttc cca ttc tca agg gac agc gtt      2112
Pro Asp Glu Leu Ser Tyr Phe Met Phe Pro Phe Ser Arg Asp Ser Val
            665                 670                 675

ggt ctc ctc ata acc aag cac gtc gtg tac gag aac gga aag gcc gag      2160
Gly Leu Leu Ile Thr Lys His Val Val Tyr Glu Asn Gly Lys Ala Glu
        680                 685                 690

ata tac ggc gcc acc gac tac gag aag agc gag aag ctt ggg gaa gcc      2208
Ile Tyr Gly Ala Thr Asp Tyr Glu Lys Ser Glu Lys Leu Gly Glu Ala
    695                 700                 705

acc gtc aag aac acg agc gaa gga atc gaa gtc gtc ctt ccc ttt gac      2256
Thr Val Lys Asn Thr Ser Glu Gly Ile Glu Val Val Leu Pro Phe Asp
710                 715                 720                 725

tac ata gaa aac ccc tcc gac ttc tac ttc gct gtc tcg acg gtc aaa      2304
Tyr Ile Glu Asn Pro Ser Asp Phe Tyr Phe Ala Val Ser Thr Val Lys
                730                 735                 740

gat gga gac ctt gag gtg ata agc act cct gtg gag ctc aag ctc ccg      2352
Asp Gly Asp Leu Glu Val Ile Ser Thr Pro Val Glu Leu Lys Leu Pro
            745                 750                 755

acc gag gtc aag gga gtc gtc ata gcc gat ata acc gac cca gaa ggc      2400
Thr Glu Val Lys Gly Val Val Ile Ala Asp Ile Thr Asp Pro Glu Gly
        760                 765                 770
```

gac gac cat ggg ccc gga aac tac act tat ccc acg gac aag gtc ttc 2448
Asp Asp His Gly Pro Gly Asn Tyr Thr Tyr Pro Thr Asp Lys Val Phe
775 780 785

aag cca ggt gtt ttc gac ctc ctc cgc ttc agg atg ctc gaa cag acg 2496
Lys Pro Gly Val Phe Asp Leu Leu Arg Phe Arg Met Leu Glu Gln Thr
790 795 800 805

gag agc tac gtc atg gag ttc tac ttc aag gac cta ggt ggt aac ccg 2544
Glu Ser Tyr Val Met Glu Phe Tyr Phe Lys Asp Leu Gly Gly Asn Pro
810 815 820

tgg aac gga ccc aac ggc ttc agc ctc cag ata atc gag gtc tac ctc 2592
Trp Asn Gly Pro Asn Gly Phe Ser Leu Gln Ile Ile Glu Val Tyr Leu
825 830 835

gac ttc aag gac ggt gga aac agt tcg gcc att aag atg ttc ccc gac 2640
Asp Phe Lys Asp Gly Gly Asn Ser Ser Ala Ile Lys Met Phe Pro Asp
840 845 850

gga ccg gga gcc aac gtc aac ctc gac ccc gag cat cca tgg gac gtt 2688
Gly Pro Gly Ala Asn Val Asn Leu Asp Pro Glu His Pro Trp Asp Val
855 860 865

gcc ttc agg ata gcg ggc tgg gac tac gga aac ctc atc atc ctg ccg 2736
Ala Phe Arg Ile Ala Gly Trp Asp Tyr Gly Asn Leu Ile Ile Leu Pro
870 875 880 885

aac gga acg gcc atc cag ggc gag atg cag att tcc gca gat ccg gtt 2784
Asn Gly Thr Ala Ile Gln Gly Glu Met Gln Ile Ser Ala Asp Pro Val
890 895 900

aag aac gcc ata ata gtc aag gtt cca aag aag tac atc gcc ata aac 2832
Lys Asn Ala Ile Ile Val Lys Val Pro Lys Lys Tyr Ile Ala Ile Asn
905 910 915

gag gac tac ggc ctc tgg gga gac gtc ctc gtc ggc tcg cag gac ggc 2880
Glu Asp Tyr Gly Leu Trp Gly Asp Val Leu Val Gly Ser Gln Asp Gly
920 925 930

tac ggc ccg gac aag tgg aga acg gcg gca gtg gat gcg gag cag tgg 2928
Tyr Gly Pro Asp Lys Trp Arg Thr Ala Ala Val Asp Ala Glu Gln Trp
935 940 945

aag ctt gga ggt gcg gac ccg cag gca gtc ata aac ggc gtg gcc ccg 2976
Lys Leu Gly Gly Ala Asp Pro Gln Ala Val Ile Asn Gly Val Ala Pro
950 955 960 965

cgc gtc att gat gag ctg gtt ccg cag ggc ttt gaa ccg acc cag gag 3024
Arg Val Ile Asp Glu Leu Val Pro Gln Gly Phe Glu Pro Thr Gln Glu
970 975 980

gag cag ctg agc agc tac gat gca aac gac atg aag ctc gcc act gtc 3072
Glu Gln Leu Ser Ser Tyr Asp Ala Asn Asp Met Lys Leu Ala Thr Val
985 990 995

aag gcg ctg cta ctc ctc aag cag ggc atc gtt gtg acc gac ccg 3117
Lys Ala Leu Leu Leu Leu Lys Gln Gly Ile Val Val Thr Asp Pro
1000 1005 1010

gag gga gac gac cac ggg ccg gga acg tac acc tat ccg acg gac 3162
Glu Gly Asp Asp His Gly Pro Gly Thr Tyr Thr Tyr Pro Thr Asp
1015 1020 1025

```
aaa gtt ttc  aag ccc ggt gtt ttc  gac ctc ctc aag ttc  aag gtg        3207
Lys Val Phe  Lys Pro Gly Val Phe  Asp Leu Leu Lys Phe  Lys Val
        1030                 1035                 1040

acc gag gga  agc gac gac tgg acg  ctg gag ttc cac ttc  aaa gac        3252
Thr Glu Gly  Ser Asp Asp Trp Thr  Leu Glu Phe His Phe  Lys Asp
        1045                 1050                 1055

ctc ggt gga  aac ccg tgg aac ggg  ccg aac ggc ttc agc  ctg cag        3297
Leu Gly Gly  Asn Pro Trp Asn Gly  Pro Asn Gly Phe Ser  Leu Gln
        1060                 1065                 1070

ata atc gag  gta tac ttc gac ttc  aag gag ggc ggg aac  gtc tcg        3342
Ile Ile Glu  Val Tyr Phe Asp Phe  Lys Glu Gly Gly Asn  Val Ser
        1075                 1080                 1085

gcc att aag  atg ttc ccg gat ggg  ccc gga agc aac gtc  cgt ctt        3387
Ala Ile Lys  Met Phe Pro Asp Gly  Pro Gly Ser Asn Val  Arg Leu
        1090                 1095                 1100

gat cca aat  cac cca tgg gac ctg  gcg ctt agg ata gcc  ggc tgg        3432
Asp Pro Asn  His Pro Trp Asp Leu  Ala Leu Arg Ile Ala  Gly Trp
        1105                 1110                 1115

gac tac gga  aac ctg ata att ctg  ccc gac gga acc gcc  tac caa        3477
Asp Tyr Gly  Asn Leu Ile Ile Leu  Pro Asp Gly Thr Ala  Tyr Gln
        1120                 1125                 1130

ggc gag atg  cag att tcc gca gat  ccg gtt aag aac gcc  ata ata        3522
Gly Glu Met  Gln Ile Ser Ala Asp  Pro Val Lys Asn Ala  Ile Ile
        1135                 1140                 1145

gtc aag gtt  cca aag aag tac ctg  aac ata tcc gac tac  gga ctc        3567
Val Lys Val  Pro Lys Lys Tyr Leu  Asn Ile Ser Asp Tyr  Gly Leu
        1150                 1155                 1160

tac acc gcc  gtc atc gtg ggt tcc  caa gac ggg tac ggc  ccg gac        3612
Tyr Thr Ala  Val Ile Val Gly Ser  Gln Asp Gly Tyr Gly  Pro Asp
        1165                 1170                 1175

aag tgg agg  ccc gtg gcc gct gag  gcc gag cag tgg aag  ctc gga        3657
Lys Trp Arg  Pro Val Ala Ala Glu  Ala Glu Gln Trp Lys  Leu Gly
        1180                 1185                 1190

ggc gca gac  ccc cag gcg gtc ata  gac aac ctc gta cca  agg gtc        3702
Gly Ala Asp  Pro Gln Ala Val Ile  Asp Asn Leu Val Pro  Arg Val
        1195                 1200                 1205

gtt gat gaa  ctc gtg ccg gag ggc  ttc aag cca acg cag  gag gag        3747
Val Asp Glu  Leu Val Pro Glu Gly  Phe Lys Pro Thr Gln  Glu Glu
        1210                 1215                 1220

cag ctg agc  agc tac gac ctt gag  aag aag acc ctg gcg  acg gtg        3792
Gln Leu Ser  Ser Tyr Asp Leu Glu  Lys Lys Thr Leu Ala  Thr Val
        1225                 1230                 1235

ctc atg gta  ccg ctc gtc aat ggg  act ggc ggc gag gaa  cca acg        3837
Leu Met Val  Pro Leu Val Asn Gly  Thr Gly Gly Glu Glu  Pro Thr
        1240                 1245                 1250

ccg acg gag  agc cca acg gaa acg  acg aca acc aca ccc  agc gaa        3882
Pro Thr Glu  Ser Pro Thr Glu Thr  Thr Thr Thr Thr Pro  Ser Glu
        1255                 1260                 1265

aca acc acc  aca act tca acg acc  acc ggc cca agc tca  acg acc        3927
```

```
Thr Thr Thr  Thr Thr Ser Thr Thr  Thr Gly Pro Ser Ser  Thr Thr
        1270                 1275                 1280

acc agc aca  ccc ggc gga gga atc  tgc ggc cca ggc att  ata gcg        3972
Thr Ser Thr  Pro Gly Gly Gly Ile  Cys Gly Pro Gly Ile  Ile Ala
        1285                 1290                 1295

ggc ctg gcc  ctg ata ccg ctc ctc  ctc aag agg agg aac  tga            4014
Gly Leu Ala  Leu Ile Pro Leu Leu  Leu Lys Arg Arg Asn
        1300                 1305                 1310
```

<210> 11
<211> 1337
<212> PRT
<213> *Thermococcus hydrothermalis*
<400> 11

Met Arg Arg Val Val Ala Leu Phe Ile Ala Ile Leu Met Leu Gly Ser
-25 -20 -15

Ile Val Gly Ala Asn Val Lys Ser Val Gly Ala Ala Glu Pro Lys Pro
-10 -5 -1 1 5

Leu Asn Val Ile Ile Val Trp His Gln His Gln Pro Tyr Tyr Tyr Asp
10 15 20

Pro Val Gln Asp Val Tyr Thr Arg Pro Trp Val Arg Leu His Ala Ala
25 30 35

Asn Asn Tyr Trp Lys Met Ala His Tyr Leu Ser Gln Tyr Pro Glu Val
40 45 50

His Ala Thr Ile Asp Leu Ser Gly Ser Leu Ile Ala Gln Leu Ala Asp
55 60 65

Tyr Met Asn Gly Lys Lys Asp Thr Tyr Gln Ile Ile Thr Glu Lys Ile
70 75 80 85

Ala Asn Gly Glu Pro Leu Thr Val Asp Glu Lys Trp Phe Met Leu Gln
90 95 100

Ala Pro Gly Gly Phe Phe Asp Asn Thr Ile Pro Trp Asn Gly Glu Pro
105 110 115

Ile Thr Asp Pro Asn Gly Asn Pro Ile Arg Asp Phe Trp Asp Arg Tyr
120 125 130

Thr Glu Leu Lys Asn Lys Met Leu Ser Ala Lys Ala Lys Tyr Ala Asn
135 140 145

Phe Val Thr Glu Ser Gln Lys Val Ala Val Thr Asn Glu Phe Thr Glu
150 155 160 165

Gln Asp Tyr Ile Asp Leu Ala Val Leu Phe Asn Leu Ala Trp Ile Asp
170 175 180

Tyr Asn Tyr Ile Thr Ser Thr Pro Glu Phe Lys Ala Leu Tyr Asp Lys
185 190 195

Val Asp Glu Gly Gly Tyr Thr Arg Ala Asp Val Lys Thr Val Leu Asp
200 205 210

Ala Gln Ile Trp Leu Leu Asn His Thr Phe Glu Glu His Glu Lys Ile
215 220 225

Asn Leu Leu Leu Gly Asn Gly Asn Val Glu Val Thr Val Val Pro Tyr
230 235 240 245

Ala His Pro Ile Gly Pro Ile Leu Asn Asp Phe Gly Trp Asp Ser Asp
250 255 260

Phe Asn Asp Gln Val Lys Lys Ala Asp Glu Leu Tyr Lys Pro Tyr Leu
265 270 275

Gly Gly Gly Thr Ala Val Pro Lys Gly Gly Trp Ala Ala Glu Ser Ala
280 285 290

Leu Asn Asp Lys Thr Leu Glu Ile Leu Ala Glu Asn Gly Trp Glu Trp
295 300 305

Val Met Thr Asp Gln Met Val Leu Gly Lys Leu Gly Ile Glu Gly Thr
310 315 320 325

Val Glu Asn Tyr His Lys Pro Trp Val Ala Glu Phe Asn Gly Lys Lys
330 335 340

Ile Tyr Leu Phe Pro Arg Asn His Asp Leu Ser Asp Arg Val Gly Phe
345 350 355

Thr Tyr Ser Gly Met Asn Gln Gln Gln Ala Val Glu Asp Phe Val Asn
360 365 370

Glu Leu Leu Lys Leu Gln Lys Gln Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Val Tyr
375 380 385

Val Val Thr Leu Asp Gly Glu Asn Pro Val Glu Asn Tyr Pro Tyr Asp
390 395 400 405

Gly Glu Leu Phe Leu Thr Glu Leu Tyr Lys Lys Leu Thr Glu Leu Gln
410 415 420

Glu Gln Gly Leu Ile Arg Thr Leu Thr Pro Ser Glu Tyr Ile Gln Leu
425 430 435

Tyr Gly Asp Lys Ala Asn Lys Leu Thr Pro Arg Met Met Glu Arg Leu
440 445 450

Asp Leu Thr Gly Asp Asn Val Asn Ala Leu Leu Lys Ala Gln Ser Leu
455 460 465

Gly Glu Leu Tyr Asp Met Thr Gly Val Lys Glu Glu Met Gln Trp Pro
470 475 480 485

Glu Ser Ser Trp Ile Asp Gly Thr Leu Ser Thr Trp Ile Gly Glu Pro
490 495 500

Gln Glu Asn Tyr Gly Trp Tyr Trp Leu Tyr Met Ala Arg Lys Ala Leu
505 510 515

Met Glu Asn Lys Asp Lys Met Ser Gln Ala Asp Trp Glu Lys Ala Tyr
520 525 530

Glu Tyr Leu Leu Arg Ala Glu Ala Ser Asp Trp Phe Trp Trp Tyr Gly
535 540 545

Ser Asp Gln Asp Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Asp Arg Tyr Leu Lys
550 555 560 565

Thr Tyr Leu Tyr Glu Met Tyr Lys Leu Ala Gly Val Glu Pro Pro Ser
570 575 580

Tyr Leu Phe Gly Asn Tyr Phe Pro Asp Gly Glu Pro Tyr Thr Thr Arg
585 590 595

Gly Leu Val Gly Leu Lys Asp Gly Glu Met Lys Asn Phe Ser Ser Met
600 605 610

Ser Pro Leu Ala Lys Gly Val Ser Val Tyr Phe Asp Gly Glu Gly Ile
615 620 625

His Phe Ile Val Lys Gly Asn Leu Asp Arg Phe Glu Val Ser Ile Trp
630 635 640 645

Glu Lys Asp Glu Arg Val Gly Asn Thr Phe Thr Arg Leu Gln Glu Lys
650 655 660

Pro Asp Glu Leu Ser Tyr Phe Met Phe Pro Phe Ser Arg Asp Ser Val
665 670 675

Gly Leu Leu Ile Thr Lys His Val Val Tyr Glu Asn Gly Lys Ala Glu
680 685 690

Ile Tyr Gly Ala Thr Asp Tyr Glu Lys Ser Glu Lys Leu Gly Glu Ala
695 700 705

Thr Val Lys Asn Thr Ser Glu Gly Ile Glu Val Val Leu Pro Phe Asp
710 715 720 725

Tyr Ile Glu Asn Pro Ser Asp Phe Tyr Phe Ala Val Ser Thr Val Lys
730 735 740

Asp Gly Asp Leu Glu Val Ile Ser Thr Pro Val Glu Leu Lys Leu Pro
745 750 755

Thr Glu Val Lys Gly Val Val Ile Ala Asp Ile Thr Asp Pro Glu Gly
760 765 770

Asp Asp His Gly Pro Gly Asn Tyr Thr Tyr Pro Thr Asp Lys Val Phe
775 780 785

Lys Pro Gly Val Phe Asp Leu Leu Arg Phe Arg Met Leu Glu Gln Thr
790 795 800 805

Glu Ser Tyr Val Met Glu Phe Tyr Phe Lys Asp Leu Gly Gly Asn Pro
810 815 820

Trp Asn Gly Pro Asn Gly Phe Ser Leu Gln Ile Ile Glu Val Tyr Leu
825 830 835

Asp Phe Lys Asp Gly Gly Asn Ser Ser Ala Ile Lys Met Phe Pro Asp
840 845 850

Gly Pro Gly Ala Asn Val Asn Leu Asp Pro Glu His Pro Trp Asp Val
855 860 865

Ala Phe Arg Ile Ala Gly Trp Asp Tyr Gly Asn Leu Ile Ile Leu Pro
870 875 880 885

Asn Gly Thr Ala Ile Gln Gly Glu Met Gln Ile Ser Ala Asp Pro Val
890 895 900

Lys Asn Ala Ile Ile Val Lys Val Pro Lys Lys Tyr Ile Ala Ile Asn
905 910 915

Glu Asp Tyr Gly Leu Trp Gly Asp Val Leu Val Gly Ser Gln Asp Gly
920 925 930

Tyr Gly Pro Asp Lys Trp Arg Thr Ala Ala Val Asp Ala Glu Gln Trp

935 940 945

Lys Leu Gly Gly Ala Asp Pro Gln Ala Val Ile Asn Gly Val Ala Pro
950 955 960 965

Arg Val Ile Asp Glu Leu Val Pro Gln Gly Phe Glu Pro Thr Gln Glu
970 975 980

Glu Gln Leu Ser Ser Tyr Asp Ala Asn Asp Met Lys Leu Ala Thr Val
985 990 995

Lys Ala Leu Leu Leu Leu Lys Gln Gly Ile Val Val Thr Asp Pro
1000 1005 1010

Glu Gly Asp Asp His Gly Pro Gly Thr Tyr Thr Tyr Pro Thr Asp
1015 1020 1025

Lys Val Phe Lys Pro Gly Val Phe Asp Leu Leu Lys Phe Lys Val
1030 1035 1040

Thr Glu Gly Ser Asp Asp Trp Thr Leu Glu Phe His Phe Lys Asp
1045 1050 1055

Leu Gly Gly Asn Pro Trp Asn Gly Pro Asn Gly Phe Ser Leu Gln
1060 1065 1070

Ile Ile Glu Val Tyr Phe Asp Phe Lys Glu Gly Gly Asn Val Ser
1075 1080 1085

Ala Ile Lys Met Phe Pro Asp Gly Pro Gly Ser Asn Val Arg Leu
1090 1095 1100

Asp Pro Asn His Pro Trp Asp Leu Ala Leu Arg Ile Ala Gly Trp
1105 1110 1115

Asp Tyr Gly Asn Leu Ile Ile Leu Pro Asp Gly Thr Ala Tyr Gln
1120 1125 1130

Gly Glu Met Gln Ile Ser Ala Asp Pro Val Lys Asn Ala Ile Ile
1135 1140 1145

Val Lys Val Pro Lys Lys Tyr Leu Asn Ile Ser Asp Tyr Gly Leu
1150 1155 1160

Tyr Thr Ala Val Ile Val Gly Ser Gln Asp Gly Tyr Gly Pro Asp
1165 1170 1175

Lys Trp Arg Pro Val Ala Ala Glu Ala Glu Gln Trp Lys Leu Gly
1180 1185 1190

Gly Ala Asp Pro Gln Ala Val Ile Asp Asn Leu Val Pro Arg Val
1195 1200 1205

Val Asp Glu Leu Val Pro Glu Gly Phe Lys Pro Thr Gln Glu Glu
1210 1215 1220

Gln Leu Ser Ser Tyr Asp Leu Glu Lys Lys Thr Leu Ala Thr Val
1225 1230 1235

Leu Met Val Pro Leu Val Asn Gly Thr Gly Gly Glu Glu Pro Thr
1240 1245 1250

Pro Thr Glu Ser Pro Thr Glu Thr Thr Thr Thr Thr Pro Ser Glu
1255 1260 1265

Thr Thr Thr Thr Thr Ser Thr Thr Thr Gly Pro Ser Ser Thr Thr
1270 1275 1280

Thr Ser Thr Pro Gly Gly Gly Ile Cys Gly Pro Gly Ile Ile Ala
1285 1290 1295

Gly Leu Ala Leu Ile Pro Leu Leu Leu Lys Arg Arg Asn
1300 1305 1310

<210> 12
<211> 809
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Pululanasa híbrida de *Thermoccus hydrothermalis* y *Thermococ litoralis*
<220>
<221> señal,
<222> (1)..(27)
<220>
<221> mat_peptide
<222> (28)..(809)
<400> 12

```
Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile
        -25                 -20                 -15

Ser Val Ala Phe Ser Ser Ser Ile Ala Ser Ala Glu Glu Pro Lys Pro
    -10                 -5              -1  1               5

Leu Asn Val Ile Ile Val Trp His Gln His Gln Pro Tyr Tyr Tyr Asp
                10                  15                  20
```

Pro Ile Gln Asp Ile Tyr Thr Arg Pro Trp Val Arg Leu His Ala Ala
25 30 35

Asn Asn Tyr Trp Lys Met Ala Asn Tyr Leu Ser Lys Tyr Pro Asp Val
40 45 50

His Val Ala Ile Asp Leu Ser Gly Ser Leu Ile Ala Gln Leu Ala Asp
55 60 65

Tyr Met Asn Gly Lys Lys Asp Thr Tyr Gln Ile Val Thr Glu Lys Ile
70 75 80 85

Ala Asn Gly Glu Pro Leu Thr Leu Glu Asp Lys Trp Phe Met Leu Gln
90 95 100

Ala Pro Gly Gly Phe Phe Asp His Thr Ile Pro Trp Asn Gly Glu Pro
105 110 115

Val Ala Asp Glu Asn Gly Asn Pro Tyr Arg Glu Gln Trp Asp Arg Tyr
120 125 130

Ala Glu Leu Lys Asp Lys Arg Asn Asn Ala Phe Lys Lys Tyr Ala Asn
135 140 145

Leu Pro Leu Asn Glu Gln Lys Val Lys Ile Thr Ala Glu Phe Thr Glu
150 155 160 165

Gln Asp Tyr Ile Asp Leu Ala Val Leu Phe Asn Leu Ala Trp Ile Asp
170 175 180

Tyr Asn Tyr Ile Ile Asn Thr Pro Glu Leu Lys Ala Leu Tyr Asp Lys
185 190 195

Val Asp Val Gly Gly Tyr Thr Lys Glu Asp Val Ala Thr Val Leu Lys
200 205 210

His Gln Met Trp Leu Leu Asn His Thr Phe Glu Glu His Glu Lys Ile
215 220 225

Asn Tyr Leu Leu Gly Asn Gly Asn Val Glu Val Thr Val Val Pro Tyr
230 235 240 245

Ala His Pro Ile Gly Pro Leu Leu Asn Asp Phe Gly Trp Tyr Glu Asp
250 255 260

Phe Asp Ala His Val Lys Lys Ala His Glu Leu Tyr Lys Lys Tyr Leu
265 270 275

Gly Asp Asn Arg Val Glu Pro Gln Gly Gly Trp Ala Ala Glu Ser Ala
280 285 290

Leu Asn Asp Lys Thr Leu Glu Ile Leu Thr Asn Asn Gly Trp Lys Trp
295 300 305

Val Met Thr Asp Gln Met Val Leu Asp Ile Leu Gly Ile Pro Asn Thr
310 315 320 325

Val Glu Asn Tyr Tyr Lys Pro Trp Val Ala Glu Phe Asn Gly Lys Lys
330 335 340

Ile Tyr Leu Phe Pro Arg Asn His Asp Leu Ser Asp Arg Val Gly Phe
345 350 355

Arg Tyr Ser Gly Met Asn Gln Tyr Gln Ala Val Glu Asp Phe Val Asn
360 365 370

Glu Leu Leu Lys Val Gln Lys Glu Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Val Tyr
375 380 385

Val Val Thr Leu Asp Gly Glu Asn Pro Trp Glu His Tyr Pro Phe Asp
390 395 400 405

Gly Lys Ile Phe Leu Glu Glu Leu Tyr Lys Lys Leu Thr Glu Leu Gln
410 415 420

Lys Gln Gly Leu Ile Arg Thr Val Thr Pro Ser Glu Tyr Ile Gln Met
425 430 435

Tyr Gly Asp Lys Ala Asn Lys Leu Thr Pro Arg Met Met Glu Arg Leu
440 445 450

Asp Leu Thr Gly Asp Asn Val Asn Ala Leu Leu Lys Ala Gln Ser Leu
455 460 465

Gly Glu Leu Tyr Asp Met Thr Gly Val Lys Glu Glu Met Gln Trp Pro
470 475 480 485

Glu Ser Ser Trp Ile Asp Gly Thr Leu Ser Thr Trp Ile Gly Glu Pro
490 495 500

Gln Glu Asn Tyr Gly Trp Tyr Trp Leu Tyr Met Ala Arg Lys Ala Leu
505 510 515

Met Glu Asn Lys Asp Lys Met Ser Gln Ala Asp Trp Glu Lys Ala Tyr
520 525 530

Glu Tyr Leu Leu Arg Ala Glu Ala Ser Asp Trp Phe Trp Trp Tyr Gly

535 540 545

Ser Asp Gln Asp Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Asp Arg Tyr Leu Lys
550 555 560 565

Thr Tyr Leu Tyr Glu Met Tyr Lys Leu Ala Gly Val Glu Pro Pro Ser
570 575 580

Tyr Leu Phe Gly Asn Tyr Phe Pro Asp Gly Glu Pro Tyr Thr Thr Arg
585 590 595

Gly Leu Val Gly Leu Lys Asp Gly Glu Met Lys Asn Phe Ser Ser Met
600 605 610

Ser Pro Leu Ala Lys Gly Val Ser Val Tyr Phe Asp Gly Glu Gly Ile
615 620 625

His Phe Ile Val Lys Gly Asn Leu Asp Arg Phe Glu Val Ser Ile Trp
630 635 640 645

Glu Lys Asp Glu Arg Val Gly Asn Thr Phe Thr Arg Leu Gln Glu Lys
650 655 660

Pro Asp Glu Leu Ser Tyr Phe Met Phe Pro Phe Ser Arg Asp Ser Val
665 670 675

Gly Leu Leu Ile Thr Lys His Val Val Tyr Glu Asn Gly Lys Ala Glu
680 685 690

Ile Tyr Gly Ala Thr Asp Tyr Glu Lys Ser Glu Lys Leu Gly Glu Ala
695 700 705

Thr Val Lys Asn Thr Ser Glu Gly Ile Glu Val Val Leu Pro Phe Asp
710 715 720 725

Tyr Ile Glu Asn Pro Ser Asp Phe Tyr Phe Ala Val Ser Thr Val Lys
730 735 740

Asp Gly Asp Leu Glu Val Ile Ser Thr Pro Val Glu Leu Lys Leu Pro
745 750 755

Thr Glu Val Lys Gly Val Val Ile Ala Asp Ile Thr Asp Pro Glu Gly
760 765 770

Asp Asp His Gly Pro Gly Asn Tyr Thr
775 780

REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye las etapas de:

i) licuefacción del material que contiene almidón utilizando una alfa-amilasa;
ii) sacarificación utilizando una glucoamilasa que tiene al menos 80% de identidad con el polipéptido maduro mostrado en SEC ID n.º: 9;
iii) fermentación utilizando un organismo fermentador.

2. Proceso según la reivindicación 1, donde la glucoamilasa añadida a la etapa de sacarificación ii) es una glucoamilasa fúngica.

3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, donde la glucoamilasa añadida a la etapa de sacarificación ii) tiene una termoestabilidad a 70°C, pH 5,3, de al menos 80%, preferiblemente al menos 85% de actividad relativa.

4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la glucoamilasa añadida a la etapa de sacarificación ii) tiene una actividad relativa a pH 4,5 de al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, preferiblemente al menos 90%.

5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la glucoamilasa añadida a la etapa de sacarificación ii) tiene una estabilidad de pH en pH 4,5 de al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 100% de actividad relativa.

6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la glucoamilasa añadida a la etapa de sacarificación ii) se describe en SEC ID n.º: 9 aquí.

7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la glucoamilasa añadida a la etapa de sacarificación ii) tiene al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 91%, más preferiblemente al menos 92%, aún más preferiblemente al menos 93%, de la forma más preferible al menos 94%, e incluso de la forma más preferible al menos 95%, tal como incluso al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% de identidad con el polipéptido maduro mostrado en SEC ID n.º: 9 aquí.

8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la etapa de sacarificación ii) se realiza a una temperatura de 50°C a 80°C, preferiblemente alrededor de 70°C.

9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la etapa de sacarificación ii) se realiza durante 10 minutos a 6 horas, preferiblemente de 30 minutos a 3 horas.

10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde la etapa de licuefacción i) se realiza utilizando una alfa-amilasa bacteriana o una alfa-amilasa fúngica.

11. Proceso según las reivindicaciones 1-10, que comprende además, antes de la etapa de licuefacción i), las etapas de:

i) molido del material que contiene almidón;
ii) formación de un lodo que comprende el material que contiene almidón molido y agua.

12. Proceso según la reivindicación 11, donde el lodo se calienta por encima de la temperatura de gelatinización inicial.

13. Proceso según la reivindicación 11 o 12, donde el lodo se cuece a chorro a una temperatura entre 95-140°C, preferiblemente 105-125°C, durante 1-15 minutos, preferiblemente durante 3-10 minutos, especialmente alrededor de 5 minutos, antes de la etapa i).

14. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde la alfa-amilasa usada en la etapa de licuefacción i) tiene una T½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM CaCl2) de al menos 10.

15. Proceso según las reivindicaciones 1-14, donde una proteasa, preferiblemente una proteasa fúngica, está presente durante la etapa de licuefacción i) o la etapa de sacarificación ii) y/o fermentación, tal como SSF.

16. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde una proteasa es una proteasa termoestable, que tiene un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C.

17. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, donde la proteasa tiene una termoestabilidad superior al 30%, superior al 40%, superior al 50%, superior al 60%, superior al 70%, superior al 80%, superior al 90% determinada como actividad relativa a 80°C/70°C.

18. Proceso según las reivindicaciones 1-17, donde la proteasa tiene una termoestabilidad superior al 12%, superior al 14%, superior al 16%, superior al 18%, superior al 20%, determinada como actividad relativa a 85°C/70°C.

19. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-18, además donde una pululanasa está presente durante la etapa de licuefacción i) y/o la etapa de sacarificación ii).