(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 627 987**

(51) Int. Cl.:
C12P 7/06 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.10.2012 PCT/US2012/059335**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.04.2013 WO13055676**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2012 E 12778002 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2017 EP 2766490**

(54) Título: **Proceso de licuefacción para producir productos de fermentación**

(30) Prioridad:

11.10.2011 US 201161545865 P
02.12.2011 US 201161566165 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.08.2017

(73) Titular/es:

NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC. (50.0%)
77 Perry Chapel Church Road P.O. Box 576
Franklinton, NC 27525, US y
NOVOZYMES A/S (50.0%)

(72) Inventor/es:

DEINHAMMER, RANDALL;
HJULMAND, ANNE GLUD;
CRAIG, JOYCE;
COWARD-KELLY, GUILLERMO;
MATSUI, TOMOKO;
TAKAGI, SHINOBU;
CLARK, SUZANNE y
MATTHEWS, JOHN

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 627 987 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso de licuefacción para producir productos de fermentación.

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a procesos para producir productos de fermentación de material que contiene almidón.
La invención también se refiere a composiciones adecuadas para usar en procesos de la invención.

Antecedentes de la invención

[0002] La producción de productos de fermentación, tales como etanol, de material que contiene almidón se conoce bien en la técnica. Industrialmente se usan hoy dos tipos diferentes de procesos.
El proceso usado más común, frecuentemente referido como un "proceso convencional", que incluye la licuefacción de almidón gelatinizado a alta temperatura (típicamente entre 80-90 °C a un pH entre 5 y 6) utilizando una alfa-amilasa bacteriana, seguida de la sacarificación simultánea y fermentación (SSF) realizada en presencia de una glucoamilasa y un organismo de fermentación.
Otro proceso bien conocido, frecuentemente referido como un proceso de "hidrólisis de almidón crudo" (proceso RSH) incluye simultáneamente la sacarificación y fermentación de almidón granulado por debajo de la temperatura de gelatinización inicial típicamente en presencia de una alfa-amilasa fúngica ácida y una glucoamilasa.

[0003] A pesar de mejoras significativas de procesos de producción de producto de fermentación a lo largo de la pasada década una cantidad significativa de material de almidón residual no se convierte en el producto de fermentación deseado, tal como etanol.
Por lo tanto, sigue existiendo un deseo y necesidad de suministrar procesos para producir productos de fermentación, tal como etanol, de material que contiene almidón que puede proporcionar un rendimiento de producto de fermentación más alto en comparación con un proceso convencional.

Resumen de la invención

[0004] La presente invención se refiere a procesos de producción de productos de fermentación, tal como especialmente etanol de material que contiene almidón utilizando un organismo fermentador.

[0005] La invención también se refiere a composiciones adecuadas para usar en procesos de la invención.

[0006] En el primer aspecto, la invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación, tal como etanol, que incluye las etapas de:

(a) licuefacción de un material que contiene almidón a una temperatura en el rango de 70-80 °C usando:
- la alfa-amilasa bacteriana con al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 1;
- la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo con al menos un 60 % de identidad con la SEC ID N.º: 14;
- la glucoamilasa con al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 9 y que además tiene una termoestabilidad a 70 °C, pH 5,3, de al menos un 70 %;

(b) sacarificación utilizando una enzima que genera una fuente de carbohidratos;
(c) fermentación que utiliza un organismo fermentador.

[0007] En una forma de realización, también está presente una proteasa, tal como una metalo proteasa y/o se añade durante la licuefacción en la etapa a).

[0008] En una forma de realización, una pululanasa también está presente y/o se añade durante la licuefacción en la etapa a).

[0009] En una forma de realización, la alfa-amilasa bacteriana se deriva de una cepa del género Bacillus, preferiblemente, una cepa de *Bacillus stearothermophilus*.
La alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* puede ser truncada.
En una forma de realización, la alfa-amilasa bacteriana se deriva de *Bacillus stearothermophilus* (SEC ID N.º: 3 en la WO 99/019467 o la SEC ID N.º: 1 aquí) que se puede truncar para tener aproximadamente 491 aminoácidos.
En una forma de realización, la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* se trunca como se ha indicado anteriormente y además tiene deleciones I181*+G182* (con respecto a la SEC ID N.º: 3 en la WO 99/019467 o la SEC ID N.º: 1 aquí) o deleciones I181*+G182* y una sustitución N193F.
En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa bacteriana se deriva de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (SEC ID N.º: 3 en la WO 99/019467 o la SEC ID N.º: 1 aquí) que está truncada, por ejemplo, para tener aproximadamente 491 aminoácidos.
La alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* truncaa también puede tener mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en:

- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+I181*+G182*+N193F+H208Y+K220P+N224L+Q254S;
- E129V+K177L+R179E+I181*+G182*+N193F; y
- E129V+K177L+R179E+I181*+G182*+N193F+K220P+N224L+S242Q+Q254S.

[0010] En una forma de realización, la alfa-amilasa que hidroliza el almidón crudo es de origen fúngico.
En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa que hidroliza el almidón crudo se deriva de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD.
En una forma de realización específica, la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo es una variante de alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD con una o varias de las siguientes sustituciones: G128D, D143N, K192R, tal como G128D+D143N o G128D+D143N+K192R (usando la SEC ID N.º: 14 de aquí para la numeración).

[0011] En otra forma de realización, la alfa-amilasa que hidroliza el almidón crudo se deriva de *Aspergillus*, tal como alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con enlazador de *Aspergillus kawachii* y SBD o la alfa-amilasa misma de *Aspergillus kawachii.*

[0012] La glucoamilasa presente y/o añadida durante la licuefacción es diferente de la enzima que genera la fuente de carbohidratos presente y/o añadida durante la sacarificación y/o fermentación.

[0013] Las enzimas generadoras de fuente de carbohidratos contempladas especialmente son glucoamilasas.
En una forma de realización preferida, la glucoamilasa añadida durante la licuefacción es del género *Penicillium*, especialmente, una cepa de *Penicillium oxalicum* descrita como la SEC ID N.º: 2 en PCT/CN10/071753 publicada como la WO 2011/127802 y mostrada en la SEC ID N.º: 9 o 15 de aquí, o una variante diseñada de proteína estable de proteasa de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* con una sustitución K79V.

[0014] En una forma de realización preferida, la glucoamilasa es una variante de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* descrita como la SEC ID N.º: 2 en PCT/CN10/071753 publicada como la WO 2011/127802 y mostrada en la SEC ID N.º: 9 y 15 de aquí, con una sustitución K79V (utilizando la secuencia madura mostrada en la SEC ID N.º: 15 para la numeración).
La variante de glucoamilasa K79V ha reducido la sensibilidad para la degradación de proteasa relativa al progenitor.

[0015] En una forma de realización preferida, la enzima generadora de fuente de carbohidratos presente y/o añadida durante la sacarificación y/o fermentación, tal como SSF, es una glucoamilasa de origen fúngico, preferiblemente a partir de una cepa de *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* o *Aspergillus oryzae*; o una cepa de *Trichoderma*, preferiblemente *T. Reesei*; o una cepa de *Talaromyces*, preferiblemente *T. Emersonii*.
En una forma de realización, la glucoamilasa presente y/o añadida durante la sacarificación y/o fermentación se puede derivar de una cepa del género *Pycnoporus*, en particular, una cepa de *Pycnoporus* como se describe en la WO 2011/066576 (Novozymes) o a partir de una cepa del género *Gloephyllum*, en particular, una cepa de *Gloephyllum* como se describe en la WO 2011/068803 (Novozymes) o una cepa del género *Nigrofomes*, en particular, una cepa de *Nigrofomes* sp. descrita en PCT/US10/058375 publicada como la WO 2012/064351 (Novozymes).

[0016] En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende
- la alfa-amilasa bacteriana con al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 1;
- la alfa-amilasa que hidroliza el almidón crudo con al menos un 60 % de identidad con la SEC ID N.º: 14;
- la glucoamilasa con al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 9 y además con una termoestabilidad a 70 °C, pH 5,3, de al menos un 70 %.

[0017] En una forma de realización de la invención, una proteasa, tal como una metalo proteasa y/o una pululanasa se incluye en la composición.
Otras enzimas también se pueden incluir.

[0018] Ejemplos de alfa-amilasas bacterianas adecuadas, alfa-amilasas que hidrolizan almidón crudo y glucoamilasas se pueden encontrar abajo en la sección de "enzimas".

Breve descripción de las figuras
[0019] La Fig. 1 muestra la concentración de etanol después de la licuefacción a 75 °C, pH 4,8, con una variante de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, una variante de alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo derivada de *Rhizomucor pusillus* y una variante de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* seguida de SSF durante 54 horas utilizando una glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* y una levadura de *Saccharomyces cerevisae*.

Descripción detallada de la invención

[0020] La presente invención se refiere a procesos para la producción de los productos de fermentación, tal como especialmente etanol, de material que contiene almidón utilizando un organismo fermentador.

[0021] La invención también se refiere a composiciones adecuadas para usar en procesos de la invención.

[0022] Los inventores han mostrado que un proceso de la invención tiene un número de ventajas.
El ejemplo 5 muestra que el rendimiento aumenta en un proceso de etanol donde una combinación de alfa-amilasa bacteriana, la alfa-amilasa que degrada almidón crudo y la glucoamilasa están presentes durante la licuefacción a 75 °C, pH 4,8, seguida de 54 horas de sacarificación simultánea y fermentación (SSF) con levadura de *Saccharomyces cerevisae*.

[0023] En el primer aspecto, la invención se refiere a procesos para producir productos de fermentación, tal como etanol, de material que contiene almidón que incluye las etapas de:

(a) licuefacción de un material que contiene almidón a una temperatura en el rango de 70-80 °C usando:
- la alfa-amilasa bacteriana con al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 1;
- la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo con al menos un 60 % de identidad con la SEC ID N.º: 14;
- la glucoamilasa con al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 9 y que además tiene una termoestabilidad a 70 °C, pH 5,3 de al menos un 70 %;

(b) sacarificación utilizando una enzima generadora de fuente de carbohidratos;
(c) fermentación utilizando un organismo fermentador.

[0024] En una forma de realización, el proceso de la invención comprende además, antes de la etapa de licuefacción a), los pasos de:

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

[0025] El lodo puede contener de 10-55 p/p-% sólidos secos (DS), preferiblemente 25-45 p/p-% sólidos secos (DS), más preferiblemente 30-40 p/p-% sólidos secos (DS) de material que contiene almidón.

[0026] El material que contiene almidón usado como materia prima típicamente se reduce en tamaño de partícula, por ejemplo, por el fresado, para descubrir la estructura y permitir otro tratamiento.

[0027] Generalmente, hay dos tipos de fresado: molienda en seco y húmeda.
En la molienda en seco se muelen y se usan los granos enteros.
La molienda en húmedo proporciona una buena separación de germen y alimento (gránulos de almidón y proteína), y frecuentemente se aplica en ubicaciones donde el almidón hidrolizado se usa en la producción de, por ejemplo, jarabes.
Ambas moliendas en húmedo y en seco se conocen bien 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 pasa por una criba con un 0,05 a 3,0 mm de pantalla, preferiblemente 0,1-0,5 mm de pantalla.
En otra forma de realización, al menos 50 %, preferiblemente al menos 70 %, más preferiblemente al menos 80 %, especialmente al menos 90 % del ajuste de material que contiene almidón pasa por una criba con # 6 pantalla.

[0028] El pH durante la etapa de licuefacción a) está típicamente en el rango de 4-6, preferiblemente de 4,5-5,0 o 4,5-4,8 o entre 5 y 6.
La temperatura durante la licuefacción puede estar en el rango entre de 70-80 °C, tal como entre 75-80 °C, preferiblemente alrededor de 75 °C.
Típicamente, el material que contiene almidón se calienta durante la etapa de licuefacción a) durante 0,1-10 horas, tales como 1-3 horas, tal como alrededor de 1,5 horas.

[0029] La alfa-amilasa bacteriana, la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo y glucoamilasa, y la proteasa opcional y/o pululanasa se pueden añadir al lodo acuoso para iniciar la licuefacción (diluyendo).
En una forma de realización, una parte de la mezcla enzimática se añade al lodo acuoso, mientras el resto de la enzima se añade durante el paso de licuefacción a).

[0030] El lodo acuoso, en una forma de realización, se puede cocer a chorro para gelatinizar adicionalmente el lodo antes de ser sometido a la etapa de licuefacción a).
La cocción por chorro se puede realizar a una temperatura entre 95-145 °C, tal como 105-125 °C, por ejemplo, 110-145 °C, preferiblemente 120-140 °C, tal como 125-135 °C, preferiblemente, alrededor de 130 °C durante aproximadamente 1-15 minutos, preferiblemente, durante aproximadamente 3-10 minutos, especialmente alrededor de aproximadamente 5 minutos.

[0031] En una forma de realización, los pasos de sacarificación b) y la etapa de fermentación c) se realizan bien consecutivamente o simultáneamente.
En una forma de realización preferida, los pasos b) y c) se realizan simultáneamente (SSF proceso).

En una forma de realización preferida, se añade una enzima generadora de fuente de carbohidratos, preferiblemente, una glucoamilasa.
La enzima generadora de fuente de carbohidratos, tal como una glucoamilasa, puede ser diferente de la enzima añadida durante el paso de licuefacción a).

[0032] En una forma de realización, la etapa de sacarificación b) se realiza a una temperatura de 20-75 °C, preferiblemente de 40-70 °C, tal como alrededor de 60 °C y a un pH entre 4 y 5, tal como alrededor de pH 4,5.

[0033] Además, las etapas de fermentación c) o sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) se pueden realizar a una temperatura de 25-40 °C, tal como de 28-35 °C, tal como de 30-34 °C, preferiblemente, alrededor de aproximadamente 32 °C, donde la fermentación está en curso durante 6-120 horas, en particular, 24-96 horas, tal como alrededor de 54 horas.

[0034] Los ejemplos de alfa-amilasas bacterianas adecuadas se pueden encontrar en la sección "alfa amilasas bacterianas" de abajo.
En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa bacteriana es una alfa-amilasa de Bacillus, preferiblemente derivada de una cepa de *Bacillus stearothermophilus*, en particular, la mostrada en la SEC ID N.º: 3 en la WO 99/019467 o la SEC ID N.º: 1 de aquí, tal como una que ha sido truncada, por ejemplo, para tener alrededor de 491 aminoácidos, por ejemplo, de 485-495 aminoácidos.
La alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* también puede ser una variante, por ejemplo, una de aquellas enumeradas abajo y/o descritas en la WO 2011/082425.

[0035] Los ejemplos de alfa-amilasas que hidrolizan almidón crudo se pueden encontrar en la sección "alfa amilasas que hidrolizan almidón crudo" de abajo.
En una forma de realización, la alfa-amilasa que hidroliza el almidón crudo es de origen fúngico.
En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo se deriva de alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* y tiene un enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD.
En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo es una variante de arriba que además tiene una de las siguientes sustituciones: G128D+D143N o G128D+D143N+K192R (usando la SEC ID N.º: 14 de aquí para la numeración).

[0036] Los ejemplos de glucoamilasas se pueden encontrar en la sección "enzimas que generan una fuente de carbohidratos" de abajo.
La glucoamilasa tiene una termoestabilidad a 70 °C, pH 5,3, de al menos 70 %, tal como al menos 75 %, preferiblemente, al menos 80 %, preferiblemente, al menos 85 %.

[0037] En una forma de realización preferida, la glucoamilasa es del género Penicillium, especialmente una cepa de *Penicillium oxalicum* descrita como la SEC ID N.º: 2 en PCT/CN10/071753 publicada como la WO 2011/127802 y mostrada en la SEC ID N.º: 9 y 15 de aquí o una variante diseñada de proteína estable de proteasa de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* con una sustitución K79V.

[0038] En una forma de realización, una proteasa también está presente durante el paso de licuefacción a).
Los ejemplos de proteasas se pueden encontrar en la sección de "proteasas" de abajo.
En una forma de realización, la proteasa es una metalo proteasa.
En una forma de realización preferida, la proteasa se deriva del género Termoascus, preferiblemente, una cepa de *Thermoascus aurantiacus*, especialmente, *Thermoascus aurantiacus* CGMCC nº 0670 (clasificado como EC 3.4.24.39) descrita en la SEC ID N.º: 3 de aquí o aminoácidos 1 a 177 (el polipéptido maduro) de la SEC ID N.º: 1 de la WO 2010/008841.

Materiales que contienen almidón

[0039] 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.
Los ejemplos de materiales que contienen almidón, adecuados para usar en procesos de la invención, incluyen granos enteros, maíz, trigo, cebada, centeno, millo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, alubias o patatas dulces, o mezclas derivadas o almidones derivados de estos o cereales.
También se contemplan los tipos cerosos y no cerosos de maíz y cebada.
Los materiales que contienen almidón preferidos son maíz y trigo.

Sacarificación y fermentación

[0040] Una o más enzimas generadoras de fuente de carbohidratos, en particular, glucoamilasas están presentes y/o se añaden durante la etapa de sacarificación ii) y/o etapa de fermentación iii).
La enzima generadora de fuente de carbohidratos puede preferiblemente ser una glucoamilasa, pero también puede ser una enzima seleccionada del grupo que consiste en: beta-amilasa, amilasa maltogénica y alfa-glucosidasa.

[0041] Ejemplos de enzimas generadoras de fuente de carbohidratos, incluyendo glucoamilasas, se pueden encontrar en la sección "enzimas generadoras de una fuente de carbohidratos que están presentes y/o se añaden durante la sacarificación y/o fermentación" de abajo.

[0042] Cuando se realiza la sacarificación y fermentación secuencial, la sacarificación en la etapa b) se puede realizar utilizando condiciones bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la etapa de sacarificación b) puede durar de aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas.
Sin embargo, resulta común hacer solo una pre-sacarificación de típicamente 40-90 minutos a una temperatura entre 30-65 °C, típicamente aproximadamente 60 °C, seguida de sacarificación durante la fermentación en la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF).
La sacarificación se puede realizar a temperaturas de 20-75 °C, preferiblemente de 40-70 °C, típicamente alrededor de 60 °C y a un pH entre 4 y 5, normalmente en alrededor de pH 4,5.

[0043] Sacarificación y fermentación (SSF) simultáneas se usan mucho en procesos de producción de productos de fermentación a escala industrial, especialmente procesos de producción de etanol.
Cuando se hace SSF, la etapa de sacarificación b) y la etapa de fermentación c) se realizan simultáneamente.
No hay fase de retención para la sacarificación, lo que significa que se puede añadir un organismo fermentador, tal como levadura y enzima(s).
SSF está según la invención típicamente realizada 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 fermentación está en curso durante 6 a 120 horas, en particular, 24 a 96 horas.
En una forma de realización, el pH es entre 3,5-5, en particular, entre 3,8 y 4,3.

Medio de fermentación

[0044] "Fermentation media" o "fermentation medium" se refiere al ambiente donde la fermentación se realiza y que incluye el sustrato de fermentación, que es la fuente de carbohidrato que se metaboliza por el organismo fermentador.
El medio de fermentación puede comprender nutrientes y estimulador(es) de crecimiento para el organismo(s) de fermentación.
Estimuladores de nutrientes y crecimiento son muy usados en la técnica de fermentación e incluyen fuentes de nitrógeno, tales como amoníaco; urea, vitaminas y minerales o combinaciones de los mismos.

Organismos fermentadores

[0045] El término "organismo fermentador" se refiere cualquier organismo, incluyendo organismos bacterianos y fúngicos, adecuados para su uso para fermentación en un proceso de la invención.
El organismo fermentador es capaz de producir el producto de fermentación deseado.
Los organismos fermentadores adecuados especialmente 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.
Los ejemplos de organismos fermentadores incluyen organismos fúngicos, tal como levadura.
La levadura preferida, especialmente, para producción de etanol, incluye cepas de *Saccharomyces* spp., en particular, *Saccharomyces cerevisiae*.

[0046] En una forma de realización, el organismo fermentador se añade al medio de fermentación de modo que el organismo fermentador viable, tal como levadura, contado por mL de medio de fermentación está en el rango de 10^5 a 10^{12}, preferiblemente, de 10^7 a 10^{10}, especialmente, aproximadamente $5x10^7$.

[0047] La levadura disponible comercialmente incluye, por ejemplo, levadura de RED STAR ETANOL RED™ (disponible de Fermentis/Lesaffre, EE.UU), FALI (disponible de Fleischmann's Yeast, EE.UU), SUPERSTART y levadura fresca de THERMOSACC™ (disponible de Ethanol Technollogy, 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).

Productos de fermentación

[0048] El término "producto de fermentación" significa un producto producido por un proceso que incluye un paso de fermentación utilizando un organismo fermentador.
Los 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, alcoholes neutrales potables; o etanol industrial o productos usados en la industria de alcohol

consumible (por ejemplo, cerveza y vino), industria láctea (por ejemplo, productos lácteos fermentados), industria de cuero e industria de tabaco.
Los tipos de cerveza preferidos comprenden cerveza inglesa de malta, cerveza negra, portador cerveza rubia, amarga, soluciones de malta, cerveza happoushu, cerveza alta en alcohol, cerveza baja en alcohol, cerveza baja en calorías o cerveza ligera.
Los procesos de fermentación preferidos usados incluyen procesos de fermentación de alcohol.
El producto de fermentación es preferiblemente etanol.
Los productos de fermentación obtenidos según el proceso de la invención pueden ser etanol.
El producto de fermentación, tal como especialmente etanol, se puede utilizar como combustible que es típicamente mezclado con gasolina.
Sin embargo, en el caso de etanol este también se puede usar como etanol potable.
En una forma de realización preferida, el producto de fermentación es etanol combustible.

Recuperación

[0049] 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 puede ser extraído del medio de fermentación por micro o técnicas de filtración de membrana.
El producto de fermentación también se puede recuperar por desorción u otro método bien conocido en la técnica.

Enzimas

Alfa-amilasas bacterianas

[0050] La alfa-amilasa bacteriana está presente y/o se añade durante la licuefacción con la enzima que hidroliza el almidón crudo y la enzima generadora de fuente de carbohidratos (la glucoamilasa) con una termoestabilidad a 70 °C, pH 5,3, de al menos 70 %, tal como al menos 75 %, preferiblemente al menos 80 %, preferiblemente al menos 85 %.

[0051] Opcionalmente, una proteasa y/o una pululanasa está presente o se añade también durante la licuefacción.

[0052] El término "alfa amilasa bacteriana" significa cualquier alfa-amilasa bacteriana clasificada bajo EC 3.2.1.1.
Una alfa-amilasa bacteriana usada, según la invención, puede por ejemplo derivar de una cepa del género Bacillus, que es a veces también referida como el género *Geobacillus*.
En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa de Bacillus se deriva de una cepa de Bacillus amyloliquefaciens, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*, pero también se puede derivar de otra especie de *Bacillus*.

[0053] En las formas de realización de la invención, la alfa-amilasa bacteriana tiene un grado de identidad de al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% o al menos 100% con cualquiera de las secuencias mostradas en la SEC ID N.º: 1 de aquí.

[0054] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrido, en tanto que esta cumple el requisito de identidad anterior.
Ejemplos de tal variante se pueden encontrar en cualquiera de WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059, y WO 02/10355.
Las variantes de alfa-amilasa específicas se describe en la patente EEUU Nos. 6,093,562, 6,187,576, 6,297,038, y 7,713,723 e incluyen variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (frecuentemente referida como alfa-amilasa BSG) con una deleción de uno o dos aminoácidos en posiciones R179; G180; I181 y/o G182, preferiblemente, una deleción doble descrita en la WO 96/23873 - ver, por ejemplo, página 20, líneas 1-10, preferiblemente correspondientes a la deleción de posiciones 181 y 182 en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* expuesta en la SEC ID N.º: 3 descrita en la WO 99/19467 o SEC ID N.º: 1 aquí o la deleción de aminoácidos R179 y G180 usando la SEC ID N.º: 3 en la WO 99/19467 o SEC ID N.º: 1 de aquí para la numeración.
Aún más preferidas son las alfa-amilasas de Bacillus, especialmente, alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus*, que tienen una deleción doble que corresponde con una deleción de posiciones 181 y 182 y además comprende una sustitución N193F (denominada también I181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos alfa-amilasa de tipo salvaje BSG expuesta en la SEC ID N.º: 3 descrita en la WO 99/19467 o SEC ID N.º: 1 de aquí.
La alfa-amilasa bacteriana también puede tener una sustitución en una posición que corresponde con S239 en la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en la SEC ID N.º: 4 en la WO 99/19467 o una variante S242 de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* de la SEC ID N.º: 3 en la WO 99/19467 o la SEC ID N.º: 1 de aquí.
En una forma de realización preferida, la variante es un S242A, E o Q variante, preferiblemente, una S242Q variante de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (que usa la SEC ID N.º: 1 para la numeración).

[0055] En una forma de realización ,la variante tiene una mutación E188, tal como una sustitución E188P en la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (que usa la SEC ID N.º: 1 para la numeración).

[0056] La alfa-amilasa bacteriana puede en una forma de realización preferida ser truncada, de modo que la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEC ID N.º: 3 en la WO 99/19467 o SEC ID N.º: 1 aquí, es alrededor de 491 aminoácidos de larga.

[0057] En una forma de realización, la alfa-amilasa bacteriana termoestable se deriva de una cepa del género Bacillus (o Geobacillus), especialmente una cepa de *Bacillus stearothermophilus*, en particular el *Bacillus stearothermophilus* como se ha descrito en la WO 99/019467 como la SEC ID N.º: 3 o la SEC ID N.º: 1 de aquí, con la deleción doble I181 + G182 y sustitución N193F, que comprende además otras mutaciones:

- V59A+Q89R+G108A+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S+M284V;
- V59A+Q89R+G112D+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S+M284V;
- 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+G108A;
- V59A+G108A+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+S242Q+Q254S+M284V;
- V59A+G108A+S242Q+M284V;
- V59A+G108A+M284V;
- V59A+E129V+R157Y+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- V59A+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- V59A+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+S242Q+Q254S+M284V;
- V59A+E129V+K177L+R179E+H208Y+M284V;
- V59A+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;
- 9A+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;
- V59A+H208Y+K220P+N224L+Q254S+M284V;
- V59A+M284V;
- A91L+M96I+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- G108A+M284V;
- 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+R179E+M284V;
- E129V+K177L+R179V+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- K220P+N224L+Q254S;
- S242Q+M284V;
- M284V.

[0058] En una forma de realización, la variante de alfa-amilasa bacteriana es una enzima con un grado de identidad de al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 %, pero menos del 100 % con cualquiera de las secuencias mostradas en la SEC ID N.º: 3 en la WO 99/19467 o la SEC ID N.º: 1 de aquí.

[0059] En una forma de realización, la alfa-amilasa bacteriana tiene un T ½ (min) a pH 4,5, 75 °C, 0,12 mM $CaCl_2$) de 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 al menos 70, tal como al menos 80, tal como al menos 90, tal como al menos 100, tal como al menos 110, tal como al menos 120, tal como al menos 130, tal como al menos 140, tal como al menos 150, tal como al menos 160, tal como al menos 170, tal como al menos 180 tal como entre 20-300, tal como entre 50-300, tal como

entre 60-300, tal como entre 70-300, tal como entre 80-300, tal como entre 90-300, tal como entre 100-300, tal como entre 120-300, tal como entre 140-300 tal como entre 160-300, tal como entre 180-300.

[0060] La alfa-amilasa bacteriana es típicamente adicionada 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*.

[0061] Ejemplos de composiciones comerciales que comprenden alfa-amilasas bacterianas incluyen BAN™, TERMAMYL™ SC, LIQUOZYME™ X, LIQUOZYME™ SC, (Novozymes), SPEZYME™ Federico, SPEZYME™ AA, SPEZYME™ DELTA AA, GC358; GC980, y SPEZYME™ RSL (Danisco A/S), y FUELZYME™ de Verenium, EE.UU.

Alfa-amilasas que hidrolizan almidón crudo

[0062] Tal y como se define en la reivindicación 1, una alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo está presente durante la etapa de licuefacción a) en un proceso de la invención junto con una alfa-amilasa bacteriana y una glucoamilasa con una termoestabilidad a 70 °C, pH 5,3, de al menos 70 %, tal como al menos 75 %, preferiblemente al menos 80 %, preferiblemente, al menos 85 %.

[0063] Opcionalmente, una proteasa y/o una pululanasa está presente o también se añade durante la licuefacción.

[0064] Como se utiliza en este caso, una "alfa amilasa que hidroliza almidón crudo" se refiere una alfa-amilasa que puede directamente degradar gránulos de almidón crudo por debajo de la temperatura de gelatinización de almidón.
La temperatura de gelatinización de almidón puede variar de 51 °C a 78 °C, ya que la temperatura de iniciación de gelatinización puede variar de aproximadamente 51 °C a 68 °C.

[0065] La alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo puede ser de cualquier origen, en tanto que este cumpla el requisito de identidad de secuencia.
En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo se deriva de un organismo fúngico tal como un hongo filamentoso.

[0066] En una forma de realización, la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo se deriva de una cepa de Aspergillus, tal como *Aspergillus niger* o *Aspergillus kawachii*.

[0067] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo de ácido fúngico es una alfa-amilasa híbrida.

[0068] En una forma de realización, la enzima que hidroliza almidón crudo es una enzima híbrida que comprende una secuencia de aminoácidos de un módulo catalítico con actividad de alfa-amilasa y una secuencia de aminoácidos de un módulo de unión a carbohidratos y opcionalmente un enlazador, donde el módulo catalítico es de origen fúngico.
Los ejemplos específicos de tales enzimas son las siguientes enzimas descritas especialmente en las tablas 3 y 4 en la WO 2005/003311.
Las enzimas que hidrolizan el almidón crudo incluyen aquellas de la siguiente tabla:

Variante	Módulo catalítico	Enlazador	SBD
JA001	*Aspergillus niger* AA (SP288)	*Aspergillus kawachii* AA	*Aspergillus kawachii* AA
JA002	SP288	*A. Kawachii AA*	*Aspergillus niger* AMG
JA003	SP288	*A. Kawachii AA*	*Talaromyces emersonii* AMG
JA004	SP288	*A. Kawachii AA*	AMG *Athelia rolfsii*
JA005	SP288	*A. Kawachii AA*	*Bacillus MA*
JA007	*Aspergillus kawachii* AA	*A. Kawachii AA*	*A. Kawachii AA*
JA008	SP288	*A. AMG niger*	*A. AMG niger*
JA009	SP288	*A. AMG rolfsii*	*A. AMG niger*
JA010	SP288	PEPT	*A. AMG niger*
JA011	SP288	*A. AMG rolfsii*	*A. Rolfsii AM G*
JA012	SP288	*A. Kawachii AA*	AMG *A.niger* + A. AMG *rolfsii*

[0069] En una forma de realización preferida la enzima que hidroliza el almidón crudo tiene el dominio catalítico de *Aspergillus niger* y una alfa-amilasa de *Aspergillus kawachii* (AA) o glucoamilasa *Athelia rolfsii* (AMG) SBD.

[0070] En otra forma de realización preferida, la enzima que degrada almidón crudo es alfa-amilasa de *Aspergillus kawachii*.

[0071] Los ejemplos específicos de otras alfa-amilasas híbridas que hidrolizan almidón crudo contemplado incluyen aquellas descritas en la WO 2006/069290, especialmente, la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de AMG *Athelia rolfsii* y SBD (SEC ID N.º: 101 en la solicitud EEUU nº 60/638,614 (US 2006/0148054)).

[0072] Otra alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo contemplado es la alfa-amilasa híbrida que consiste en alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD descrita como V039 en la tabla 5 en la WO 2006/069290 (Novozymes A/S).

[0073] Contemplada también está la alfa-amilasa *Meripilus giganteus* con enlazador de glucoamilasa *Athelia rolfsii* y SBD (SEC ID N.º: 102 en la solicitud EEUU nº 60/638,614 (US 2006/0148054)).

[0074] Otra alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo contemplada es la alfa-amilasa híbrida que consiste en alfa-amilasa *Meripillus gigantus* descrita en la WO 2006/069290 (Novozymes A/S).

[0075] Las alfa-amilasas que hidrolizan almidón crudo usadas en el ejemplo 5 de aquí son las variantes de la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus*.

[0076] RSH AA 96 es variante de alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD, y además las sustituciones siguientes: G128D+D143N (usando la SEC ID N.º: 14 de aquí para la numeración).

[0077] RSH AA 101 es una variante de alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD y además las sustituciones siguientes: G128D+D143N+K192R (usando la SEC ID N.º: 14 de aquí para la numeración).

[0078] En una forma de realización, la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo se define como una enzima que tiene un índice de degradación de almidón crudo de al menos 0,2, al menos 0,3, al menos, 0,4, al menos 0,5, al menos 0,6, al menos 0,7, al menos 0,8, al menos 0,9, al menos 1, al menos 1,1, al menos 1,2, al menos 1,3, al menos 1,4, al menos 1,5, al menos 1,6, al menos 1,7, al menos 1,8, al menos 1,9, al menos 2, donde el índice de degradación crudo es una proporción de actividad para degradar almidón crudo para actividad para degradar almidón gelatinizado (Ra/GA).
Preferiblemente, la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo se define como una enzima que tiene un índice de degradación de almidón crudo superior a 1. La actividad en el almidón gelatinizado se mide por la medición de la liberación de glucosa producida por la enzima en un 2 % de mezcla gelatinizada (por ejemplo; maíz) de reacción de almidón.
La actividad se mide por la liberación de azúcares reductores producida en 4 mol por hora por mg de enzima activa pura.
El mismo ensayo puede usarse después para medir la actividad de la enzima en el almidón crudo, sustituyendo el 2 % de almidón gelatinizado (por ejemplo; maíz) por 2 % de almidón crudo (por ejemplo, maíz).
En ambos ensayos, la temperatura es 40 °C, se usa el mismo pH y la solución tamponada y el período de incubación es 6 horas, y se describe posteriormente en la sección "Materiales y métodos" de abajo.

[0079] La alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo para usar en la presente invención incluye alfa-amilasas con al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98% o al menos 99 % de identidad de secuencia con la alfa-amilasa híbrida descrita como V039 en la tabla 5 en la WO 2006/069290 o la SEC ID N.º: 14 de aquí.

[0080] En una forma de realización, la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo se puede añadir durante la etapa de licuefacción a) en una cantidad de 0,01-1000 micro g de proteína enzimática (EP) por g DS, por ejemplo 0,1-500 micro g EP por g DS, tal como 1-200 micro g EP por g DS, tal como 1-100 micro g EP por g DS.

Enzimas generadoras de fuente de carbohidratos

[0081] Según la invención, una glucoamilasa con una termoestabilidad a 70 °C, pH 5,3, de al menos 70 %, tal como al menos 75 %, preferiblemente, al menos 80 %, preferiblemente, al menos 85 % está presente y/o se añade durante la licuefacción junto con una alfa-amilasa bacteriana y una alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo tal y como se define en la reivindicación 1.
Una proteasa y/o una pululanasa también puede estar presente y/o añadirse durante el paso de licuefacción a).

[0082] El término "enzima generadora de fuente de carbohidratos" incluye cualquier enzima que genere azúcares fermentables.
Una enzima generadora de fuente de carbohidratos es capaz de producir un carbohidrato que se puede usar como una fuente de energía por el organismo(s) de fermentación en cuestión, por ejemplo, cuando se usa en un proceso de la invención para producir un producto de fermentación, tal como etanol.

Los carbohidratos generados se pueden convertir directa o indirectamente al producto de fermentación deseado, preferiblemente etanol.
Según la invención, se puede utilizar una mezcla de enzimas generadoras de fuente de carbohidratos.
Los ejemplos específicos incluyen glucoamilasas (que son generadoras de glucosa), beta-amilasa y amilasa maltogénica (que son generadoras de maltosa).

[0083] En todas formas de realización, la glucoamilasa tiene una termoestabilidad de 70 °C, pH 5,3, de al menos 70 %, tal como al menos 75 %, preferiblemente al menos 80 %, preferiblemente al menos 85 %.

[0084] 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 % determinada como se describe en el ejemplo 4 (pH óptimo).

[0085] En una forma de realización, la glucoamilasa tiene una estabilidad de pH a un pH 4,5 de al menos al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 100 % determinada como se describe en el ejemplo 4 (estabilidad de pH).

[0086] En una forma de realización específica y preferida, la glucoamilasa, preferiblemente de origen fúngico, preferiblemente unos hongos filamentosos, tal como a partir de una cepa del género Penicillium, especialmente una cepa de *Penicillium oxalicum* descrita como SEC ID N.º: 2 en PCT/CN10/071753 publicada como WO 2011/127802 y mostrada en la SEC ID N.º: 9 aquí o una variante de *Penicillium oxalicum* con una sustitución K79V (usando la SEC ID N.º: 15 de aquí para la numeración).
La variante de glucoamilasa K79V ha reducido la sensibilidad a degradación de proteasa en comparación con el progenitor.

[0087] En todas las formas de realización, la glucoamilasa 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 la SEC ID N.º: 2 en PCT/CN10/071753 publicada como WO 2011/127802 o SEC ID N.º: 9 de aquí.

Proteasas

[0088] Según la invención, una proteasa puede estar presente y/o añadirse durante la licuefacción en la etapa a) junto con una alfa-amilasa bacteriana, una alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo y una enzima generadora de fuente de carbohidratos, preferiblemente, una glucoamilasa con una termoestabilidad a 70 °C, pH 5,3, de al menos 70 %.

[0089] La proteasa puede ser cualquier proteasa.
En una forma de realización preferida, la proteasa es una proteasa ácida de origen microbiano, preferiblemente de origen fúngico o bacteriano.
Una proteasa fúngica ácida se prefiere, pero también se pueden usar otras proteasas.

[0090] Las proteasas adecuadas incluyen proteasas microbianas, tales como proteasas fúngicas y bacterianas.
Las proteasas preferidas son proteasas ácidas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad de hidrolizar proteínas bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7.

[0091] La proteasa fúngica ácida se puede derivar de *Aspergillus, Candida, Coriolus, Endothia, Enthomophtra, Irpex, Mucor, Penicillium, Rhizopus, Sclerotium y Torulopsis.*
En particular, la proteasa se puede derivar de *Aspergillus aculeatus* (WO 95/02044), *Aspergillus awamori* (Hayashida et al., 1977, Agric. Biol. Chem. 42(5), 927-933), *Aspergillus niger* (ver, por ejemplo, Koaze et al., 1964, Agr. Biol. Chem. Japón 28: 216), Aspergillus saitoi (ver, por ejemplo, Yoshida, 1954, J. Agr. Chem. Soc. Japan 28: 66) o *Aspergillus oryzae*, como la proteasa de pepA; y proteasas ácidas de *Mucor miehei* o *Mucor pusillus*.

[0092] La proteasa puede ser una proteasa neutral o alcalina, tal como una proteasa derivada de una cepa de Bacillus.
Una proteasa particular se deriva de *Bacillus amyloliquefaciens* y tiene la secuencia obtenible a Swissprot como adhesión nº P06832.
Las proteasas pueden tener al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos descrita en la base de datos de Swissprot, adhesión n.º. P06832 tal como al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o particularmente al menos 99 % de identidad.

[0093] La proteasa puede tener al menos un 75 % de identidad, preferiblemente al menos 80 %, más preferiblemente al menos 85 %, más preferiblemente, al menos 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de

aminoácidos descrita como la SEC ID N.º: 1 en la WO 2003/048353 o la SEC ID N.º: 3 aquí, tal como al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o particularmente al menos 99 % de identidad.

[0094] La proteasa puede ser una proteasa tipo papaína seleccionada del grupo que consiste en proteasas dentro de EC 3,4,22.* (proteasa de cisteína), tal como EC 3,4,22,2 (papaína), EC 3,4,22,6 (quimopapaína), EC 3,4,22,7 (asclepaína), EC 3,4,22,14 (actinidaína), EC 3,4,22,15 (catepsina L), EC 3,4,22,25 (endopeptidasa glicilo) y EC 3,4,22,30 (caricaína).

[0095] En una forma de realización, la proteasa es una preparación de proteasa derivada de una cepa de Aspergillus, tal como *Aspergillus oryzae*.
En otra forma de realización, la proteasa se deriva de una cepa de Rhizomucor, preferiblemente, *Rhizomucor miehei*.
En otra forma de realización, la proteasa es una preparación de proteasa, preferiblemente una mezcla de una preparación proteolítica derivada de una cepa de Aspergillus, tal como *Aspergillus oryzae* y una proteasa derivada a partir de una cepa de Rhizomucor, preferiblemente *Rhizomucor miehei*.

[0096] Las proteasas de ácido aspártico se describen en, por ejemplo, Handbook of Proteolytic Enzymes, Edited by A.J. Barrett, N.D. Rawlings and J.F. Woessner, Academic Press, San Diego, 1998, Chapter 270.
Ejemplos de proteasas de ácido aspártico incluyen, por ejemplo, aquellas descritas en Berka et al., 1990, Gene 96: 313; Berka et al., 1993, Gene 125: 195-198; and Gomi et al., 1993, Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1095-1100.

[0097] La proteasa también puede ser una metalo proteasa, que se define como una proteasa seleccionada del grupo que consiste en:
(a) proteasas que pertenecen a EC 3.4.24 (metaloendopeptidasas); preferiblemente EC 3.4.24.39 (metalo ácido proteinasas);
(b) metalo proteasas que pertenecen al M grupo del manual anterior;
(c) metalo proteasas todavía no se han asignado a clanes (designación: Clan MX), o que pertenecen a uno de los clanes, MA, MB, MC, MD, ME, MF, MG, MH (como se ha definido en las págs. 989-991 del manual anterior);
(d) otras familias de proteasas de metalo (como se ha definido en las págs. 1448-1452 del manual anterior);
(e) proteasas de metalo con un motivo HEXXH;
(f) proteasas de metalo con un motivo HEFT;
(g) las proteasas de metalo que pertenecen a una de las familias M3; M26; M27; M32; M34; M35; M36; M41; M43 o M47 (como se ha definido en las págs. 1448-1452 del manual anterior);
(h) proteasas de metalo de la familia M28E; y
(i) metalo proteasas que pertenecen a la familia M35 (como se ha definido en las págs. 1492-1495 del manual anterior).

[0098] En otras formas de realización particulares, las proteasas de metalo son hidrolasas donde el ataque nucleofílico en un enlace de péptido se media por una molécula de agua, que se activa por un catión metálico bivalente.
Los ejemplos de cationes bivalentes son zinc, cobalto o manganeso.
El ión metálico se puede sujetar en su lugar por ligandos de aminoácido.
El número de ligandos pueden ser cinco, cuatro, tres, dos, uno o cero.
En una forma de realización particular, el número es dos o tres, preferiblemente tres.

[0099] No hay limitaciones en el origen de la *metalo proteasa* usada en un proceso de la invención.
En una forma de realización, la *metalo proteasa* se clasifica como EC 3.4.24, preferiblemente EC 3.4.24.39.
En una forma de realización, la *metalo proteasa* es una *metalo proteasa* estable de ácido, por ejemplo, una *metalo proteasa* estable de ácido fúngico, tal como una *metalo proteasa* 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).
En otra forma de realización, la *metalo proteasa* se deriva de una cepa del género *Aspergillus*, preferiblemente, una cepa de *Aspergillus oryzae*.

[0100] En una forma de realización, la *metalo proteasa* tiene un grado de identidad de secuencia con amino ácidos -178 a 177; -159 a 177 o preferiblemente aminoácidos 1 a 177 (el polipéptido maduro) de la SEC ID N.º: 1 de la WO 2010/008841 o la SEC ID N.º: 3 de aquí (una *metalo proteasa* de *Thermoascus aurantiacus*) de al menos 80 %, al menos 82 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 97 % tal como al menos 98 %, tal como al menos 99 %; y que tienen actividad de *metalo proteasa*.
En formas de realización particulares, la *metalo proteasa* consiste en una secuencia de aminoácidos con un grado de identidad con la SEC ID N.º: 1 como se ha mencionado anteriormente o mostrado como la SEC ID N.º: 3 de aquí.

[0101] La *metalo proteasa* de *Thermoascus aurantiacus* es un ejemplo preferido de una metalo proteasa adecuada para usar en un proceso de la invención.

Otra metalo proteasa se deriva de *Aspergillus oryzae* y comprende la secuencia de SEC ID N.º: 11 descrita en la WO 2003/048353 o aminoácidos -23-353 -23-374 1-353,1-374,1-397,177-353,177-374 o 177-397 de los mismos y la SEC ID N.º: 10 descrita en la WO 2003/048353.

[0102] Otra metalo proteasa adecuada para usar en un proceso de la invención es la metalo proteasa de *Aspergillus oryzae* que comprende la SEC ID N.º: 5 de WO 2010/008841 o una metalo proteasa es un polipéptido aislado que tiene un grado de identidad con la SEC ID N.º: 5 de al menos aproximadamente 80 %, al menos 82 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 97 %; y que tienen actividad de metaloproteasa.
En formas de realización particulares, la metalo proteasa consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 5 de la WO 2010/008841.

[0103] En una forma de realización particular, una metalo proteasa tiene una secuencia de aminoácidos que difiere por cuarenta, treinta y cinco, treinta, veinticinco, veinte o por quince aminoácidos de aminoácidos -178 a 177; -159 a 177, o +1 a 177 de las secuencias de aminoácidos de la *Thermoascus aurantiacus* o metalo proteasa de *Aspergillus oryzae*.

[0104] En otra forma de realización, una metalo proteasa tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en diez o por nueve, o por ocho, o por siete, o por seis, o por cinco aminoácidos de aminoácidos -178 a 177; -159 a 177, o +1 a 177 de las secuencias de aminoácidos de estas proteasas de metalo, por ejemplo, por cuatro, por tres, por dos o por un aminoácido.

[0105] En formas de realización particulares, la metalo proteasa a) comprende o b) consiste en
i) la secuencia de aminoácidos de aminoácidos -178 a 177; -159 a 177 o +1 a 177 de la SEC ID NO:1 de WO 2010/008841;
ii) la secuencia de aminoácidos de aminoácidos -23-353; -23-374; -23-397,1-353,1-374,1-397,177-353,177-374 o 177-397 de la SEC ID N.º: 3 de la WO 2010/008841;
iii) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N.º: 5 de la WO 2010/008841; o
variantes alélicas, o fragmentos, de las secuencias de i), ii) e iii) que tienen actividad de proteasa.

[0106] Un fragmento de aminoácidos -178 a 177; -159 a 177 o +1 a 177 de la SEC ID N.º: 1 de la WO 2010/008841 o de aminoácidos -23-353; -23-374; -23-397,1-353,1-374,1-397,177-353,177-374 o 177-397 de la SEC ID N.º: 3 de la WO 2010/008841; es un polipéptido con uno o más aminoácidos eliminados del amino y/o carboxilo terminal de estas secuencias de aminoácidos.
En una forma de realización un fragmento contiene al menos 75 residuos de aminoácidos o al menos 100 residuos de aminoácidos o al menos 125 residuos de aminoácidos, o al menos 150 residuos de aminoácidos, o al menos 160 residuos de aminoácidos, o al menos 165 residuos de aminoácidos, o al menos 170 residuos de aminoácidos, o al menos 175 residuos de aminoácidos.

[0107] En otra forma de realización, la metalo proteasa se combina con otra proteasa, tal como una proteasa fúngica, preferiblemente una proteasa fúngica ácida.

[0108] Los productos disponibles comercialmente incluyen ALCALASE®, ESPERASE™, FLAVOURZYME™, NEUTRASE®, RENNILASE®, NOVOZYM™ FM 2,0L e iZime BA (disponible de Novozymes A/S, Denmark) y GC106™ y SPEZYME™ FAN de Genencor internacional, Inc., EE.UU.

[0109] La proteasa puede estar presente en una cantidad de 0,0001-1 mg de proteína enzimática por g DS, preferiblemente 0,001 a 0,1 mg de proteína enzimática por g DS.
Alternativamente, la proteasa puede estar presente en una cantidad de 0,0001 a 1 LAPU/g DS, preferiblemente 0,001 a 0,1 LAPU/g DS y/o 0,0001 a 1 mAU-RH/g DS, preferiblemente 0,001 a 0,1 mAU-RH/g DS.

[0110] En una forma de realización, la proteasa usada en un proceso de la invención es una proteasa termoestable.
Preferiblemente, una descrita en la WO 2011/072191 que puede tener bien i) un valor de termoestabilidad superior a 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C; y/o ii) un valor de termoestabilidad superior a 10 % determinado como actividad relativa a 85 °C/70 °C.

[0111] En una forma de realización, la proteasa tiene un valor de termoestabilidad:
- superior a 30 %, más del 40 %, más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, más del 90 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C y/o
- superior a 12 %, más del 14 %, más del 16 %, más del 18 %, más del 20 %, determinado como actividad relativa a 85 °C/70 °C; y/o
- superior a 20 %, más del 30 %, más del 40 %, más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, más del 90 % determinado como actividad restante a 80 °C; y/o

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

[0112] Las variantes purificadas pueden tener una temoestabilidad por encima de 90, por encima de 100 a 85 °C como se ha determinado utilizando el ensayo de ceína BCA como se ha descrito en el ejemplo 3.

[0113] La determinación de "actividad relativa" y "actividad restante" se determina como se describe en el ejemplo 2.

[0114] En una forma de realización preferida, la proteasa termoestable usada en un proceso de la invención es una "metalo proteasa" definida como una proteasa de EC 3.4.24 (metaloendopeptidasas); preferiblemente EC 3.4.24.39 (ácido metalo proteinasas).

[0115] Para determinar si una proteasa dada es una metalo proteasa o no, se hace referencia al anterior "Handbook of Proteolytic Enzymes" y los principios indicados en este.
Tal determinación puede llevarse a cabo para todos los tipos de proteasas, se pueden producir proteasas de origen natural o tipo salvaje; o proteasas genéticamente modificadas o sintéticas.

[0116] La actividad de proteasa se puede medir utilizando cualquier ensayo adecuado, donde se emplea un sustrato, que incluye enlaces de péptidos pertinentes para la especificidad de la proteasa en cuestión.
El ensayo de pH y la temperatura de ensayo asimismo se deben adaptar a la proteasa en cuestión.
Ejemplos de valores de ensayo de pH son pH 6, 7, 8, 9, 10 o 11.
Ejemplos de temperatura de ensayo son 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 u 80 °C.

[0117] Los ejemplos de sustratos de proteasa son caseína, tal como caseína reticulada azurina (AZCL caseína).
Dos ensayos de proteasa se describen abajo en la sección "Materiales y métodos", de los cuales el denominado "ensayo caseína AZCL" es el ensayo preferido.

[0118] En una forma de realización, la proteasa tiene al menos 20 %, tal como al menos 30 %, tal como al menos 40 %, tal como al menos 50 %, tal como al menos 60 %, tal como al menos 70 %, tal como al menos 80 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 100 % de la actividad de la variante de proteasa JTP196 o proteasa Pfu determinada por el ensayo de caseína AZCL.

[0119] No hay limitaciones en el origen de la proteasa termoestable usada en un proceso de la invención, en tanto que esta cumple las propiedades de termoestabilidad definidas arriba.
La proteasa puede ser una variante de, por ejemplo, una proteasa tipo salvaje siempre y cuando la proteasa tenga las propiedades de termoestabilidad definidas arriba.
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).

[0120] En una forma de realización, la proteasa es una variante de la parte madura de la metalo proteasa mostrada en la SEC ID N.º: 2 descrita en la WO 2003/048353 o la parte madura de la SEC ID N.º: 1 en la WO 2010/008841 y mostrada como la SEC ID N.º: 3 de aquí con las mutaciones siguientes:

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

- D79L+Y82F+S87G+A112P+D142L;
- D79L+Y82F+S87P+A112P+T124V+D142L;
- D79L+Y82F+S87P+A112P+A126V+D142L;
- D79L+Y82F+S87P+A112P+D142L;
- D79L+S87P+N98C+A112P+G135C+D142L;
- D79L+S87P+D104P+A112P+D142L;
- D79L+S87P+A112P+T124V+A126V+D142L;
- D79L+S87P+A112P+T124V+D142L;
- D79L+S87P+A112P+D142L;
- D79L+S87P+A112P+D142L+T141C+M161C;
- Y82F+S87G+S70V+D79L+D104P+A112P+D142L;
- Y82F+S87G+D79L+D104P+A112P+A126V+D142L.

[0121] En una forma de realización, la variante de proteasa termoestable tiene al menos un 75 % de identidad preferiblemente 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 %, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEC ID N.º: 2 descrita en la WO 2003/048353 o la parte madura de la SEC ID N.º: 1 en la WO 2010/008841 o la SEC ID N.º: 3 de aquí.

[0122] En una forma de realización, la proteasa se deriva de una cepa de *Pyrococcus*, tal como una cepa de *Pyrococcus furiosus*.
En una forma de realización, la proteasa es la mostrada como SEC ID N.º: 1 en la patente US nº 6,358,726-B1 (Takara Shuzo Company).
En otra forma de realización, la proteasa es una descrita en la SEC ID N.º: 16 de aquí o una proteasa con al menos un 80 % de identidad, tal como al menos 85 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 96 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 98 %, tal como al menos 99 % de identidad con la SEC ID N.º: 1 en la patente US nº 6,358,726-B1 o SEC ID N.º: 16 de aquí.
La proteasa *Pyroccus furiosus* se puede comprar de Takara Bio, Japan.

[0123] La proteasa *Pyrococcus furiosus* es una proteasa termoestable.
Se descubrió que el producto comercial de proteasa *Pyrococcus furiosus* (Pfu S) de Takara Bio, Japan tiene una termoestabilidad de 110 % (80 °C/70 °C) y 103 % (90 °C/70 °C) a pH 4,5 determinada como se describe en el ejemplo 2 de aquí.

Pululanasa

[0124] Según la invención, una pululanasa puede estar además presente durante la licuefacción, sacarificación y/o fermentación.

[0125] En una forma de realización, una pululanasa está presente y/o se añade durante el paso de licuefacción a).

[0126] En otra forma de realización, una pululanasa está presente y/o se añade durante la sacarificación o sacarificación simultánea y fermentación (SSF).

[0127] Las pululanasas (E.C. 3,2,1,41, pululano 6-glucano-hidrolasa) son enzimas desramificantes caracterizadas por el hecho de su capacidad para hidrolizar los enlaces alfa-1,6-glicosidicos en, por ejemplo, amilopectina y pululano.

[0128] La pululanasa puede ser cualquier pululanasa.
En una forma de realización, la pululanasa es una pululanasa bacteriana, especialmente una pululanasa derivada de una cepa del género *Bacillus*, especialmente derivado de una cepa de *Bacillus deramificans.*
La EP 605,040 divulga tal pululanasa derivada de *Bacillus deramificans.*

[0129] En una forma de realización, la pululanasa es una variante descrita en la WO 00/01796.
Las pululanasas contempladas incluyen las pululanasas de *Bacillus amyloderamificans* descritas en la patente EEUU nº 4,560,651, la pululanasa descrita como la SEC ID N.º: 2 en la WO 01/151620, las *Bacillus deramificans* descritas como la SEC ID N.º: 4 en WO 01/151620 y la pululanasa de *Bacillus acidopullulyticus* descrita como la SEC ID N.º: 6 en WO 01/151620 y también descrita en FEMS Mic. Let. 115: 97-106 (1994).

[0130] Las pululanasas adicionales contempladas según la presente invención incluyeron las pululanasas de *Pyrococcus woesei*, específicamente de *Pyrococcus woesei* DSM nº 3773 descrita en la WO 92/02614.

[0131] En una forma de realización, la pululanasa es una pululanasa familia GH57.

En una forma de realización, la pululanasa incluye un dominio X47 como se ha descrito en la WO 2011/087836.
Más específicamente la pululanasa se puede derivar de una cepa del género *Thermococcus*, incluyendo *Thermococcus litoralis* y *Thermococcus hydrothermalis*, como la pululanasa de *Thermococcus hydrothermalis* mostrada en la SEC ID N.º: 11 truncada en el sitio X4 derecho después del dominio X47 (es decir, aminoácidos 1-782 en la SEC ID NOS: 11 y 12).
La pululanasa también puede ser un híbrido del *Thermococcus litoralis* y pululanasas de *Thermococcus hydrothermalis* o una enzima de híbrido *T. Hydrothermalis/T. litoralis* con sitio de truncamiento X4 descrito en la WO 2011/087836 o descrito en la SEC ID N.º: 12 de aquí.

[0132] En otra forma de realización, la pululanasa se deriva de una cepa de *Thermococcus,* tal como especialmente *Thermococcus hydrothermalis*.
En una forma de realización, la pululanasa es una variante de *Thermococcus hydrothermalis*.
En una forma de realización, la pululanasa comprende dominio X47.
En una forma de realización, la pululanasa está truncada, tal como una descrita en la WO 2011/087836.
En una forma de realización, la pululanasa comprende un dominio X46 tal como uno descrito en la WO 2011/076123.

[0133] Las pululanasas adicionadas durante la licuefacción y sacarificación y/o fermentación pueden no ser las mismas.
Por ejemplo, en una forma de realización, la pululanasa presente y/o añadida durante la etapa de licuefacción a) se deriva de *Thermococcus hydrothermalis*, mientras la pululanasa opcionalmente adicionada durante la sacarificación y/o fermentación se deriva de *Bacillus deramificans.*
La actividad de pululanasa se puede determinar como NPUN.
Un ensayo para la determinación de NPUN se describe en la sección de "Materiales y métodos" de abajo.

[0134] La pululanasa según la invención se puede añadir en una cantidad eficaz que incluye la cantidad preferida de aproximadamente 0,0001-10 mg de proteína enzimática por gramo DS, preferiblemente, 0,0001-0,10 mg de proteína enzimática por gramo DS, más preferiblemente, 0,0001-0,010 mg de proteína enzimática por gramo DS.
La actividad de pululanasa se puede determinar como NPUN.
Un ensayo para la determinación de NPUN se describe en la sección "Materiales y métodos" de abajo.

[0135] Los productos de pululanasa disponibles comercialmente incluyen PROMOZYME D, PROMOZYME™ D2 (Novozymes A/S, Dinamarca), OPTIMAX L-300 (Danisco; EE.UU) y AMANO 8, (Amano Japan).

Enzima generadora de fuente de carbohidratos presente y/o añadida durante la sacarificación y/o fermentación

[0136] Según la invención, una enzima generadora de fuente de carbohidratos, preferiblemente una glucoamilasa, puede estar presente y/o ser añadida durante la sacarificación y/o fermentación.
La enzima generadora de fuente de carbohidratos puede ser diferente de la enzima generadora de fuente de carbohidratos, es decir, la glucoamilasa, presente y/o añadida durante el paso de licuefacción a).

Glucoamilasa

[0137] Según la invención, la glucoamilasa presente y/o añadida durante la sacarificación y/o fermentación se puede derivar de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, derivada de un microorganismo o una planta.
Las glucoamilasas preferidas son de origen fúngico o bacteriano, seleccionadas del grupo que consiste en glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular, *Aspergillus niger* G1 o G2 glucoamilasa (Boel et al., 1984, EMBO J. 3(5): 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 WO 84/02921, glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* (Agric. Biol.Chem. 55(4): 941-949 (1991)) o variantes o fragmentos de las mismas.
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, Biochemistry 35: 8698-8704; e introducción de Pro residuos en la posición A435 y S436 (Li et al., 1997, Protein Eng. 10: 1199-1204.

[0138] Otras glucoamilasas incluyen glucoamilasa *Athelia rolfsii* (denominada previamente *Corticium rolfsii*) (ver Patente EE.UU. Nº 4,727,026 y (Nagasaka et al., 1998, "Purification and properties of the raw-starch-degrading glucoamilases from Corticium rolfsii, Appl. Microbiol. Biotecnol. 50:323-330), glucoamilasas Talaromyces, en particular, derivadas de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), Talaromyces leycettanus (patente EEUU nº RE32,153), *Talaromyces duponti, Talaromyces thermophilus* (patente EEUU nº 4,587,215). En una forma de realización preferida, la glucoamilasa usada durante sacarificación y/o fermentación es la glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* descrita en la WO 99/28448.

[0139] En una forma de realización, la glucoamilasa es una glucoamilasa que muestra 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 la secuencia de enzima madura mostrada como la SEC ID N.º: 7 en la WO 99/28448.

[0140] Las glucoamilasas bacterianas 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* descritas en la WO 2007/124285; o una mezcla de las mismas.
También, la glucoamilasa híbrida se contempla según la invención.
Los ejemplos de las glucoamilasas híbridas se describen en la WO 2005/045018.
Los ejemplos específicos incluyen la glucoamilasa híbrida descrita en la tabla 1 y 4 del ejemplo 1.

[0141] En una forma de realización, la glucoamilasa se deriva de una cepa del género *Pycnoporus*, en particular, una cepa de *Pycnoporus* como se describe en la WO 2011/066576 (Novozymes) o a partir de una cepa del género *Gloephyllum,* en particular, una cepa de *Gloephyllum* como se describe en la WO 2011/068803 (Novozymes) o una cepa del género Nigrofomes, en particular, una cepa de Nigrofomes sp. descrita en PCT/US10/058375 publicada como la WO 2012/064351 (Novozymes).

[0142] También se contemplan glucoamilasas que muestran una alta identidad con cualquiera de las glucoamilasas mencionadas arriba, 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.

[0143] En una forma de realización, la glucoamilasa es una glucoamilasa que muestra 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 enzima madura mostradas en cualquier SEC ID N.º: 2,4 o 6 en la WO 2011/066576.

[0144] En una forma de realización, la glucoamilasa es una glucoamilasa que muestra 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 enzima madura mostradas en cualquier SEC ID N.º: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 316 o 18 en la WO 2011/068803.

[0145] Las enzimas generadoras de fuente de carbohidrasa, tales como preferiblemente glucoamilasas, en una forma de realización, 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.

[0146] Las composiciones disponibles comercialmente que comprenden glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L, PLUS, SPIRIZYME™, FUEL, SPIRIZYME™, 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

[0147] La enzima generadora de fuente de carbohidratos presente y/o añadida durante la sacarificación y/o fermentación también puede ser una alfa-amilasa maltogénica.
Una "alfa amilasa maltogénica" (glucano 1,4-alpha-maltohidrolasa, E.C. 3,2,1,133) es capaz de hidrolizar amilosa y amilopectina a maltosa en la configuración alfa.
Una amilasa maltogénica de cepa de *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está comercialmente disponible de Novozymes A/S.
Las alfa-amilasas maltogénicas se describen en las US patentes n.ºs. 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628.

[0148] La amilasa maltogénica en una forma de realización preferida se puede añadir en una cantidad de 0,05-5 mg total proteína/gramo DS o 0,05-5 MANU/g DS.

Composición que comprende alfa-amilasa bacteriana, alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo y glucoamilasa

[0149] Las composiciones de la invención se pueden añadir durante la etapa de licuefacción a) en un proceso de la invención.
Las composiciones de la invención comprenden una alfa-amilasa bacteriana, una alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo y una enzima generadora de fuente de carbohidratos.
La composición puede comprender además una proteasa y/o una pululanasa y otras enzimas.

[0150] Así, en este aspecto, la invención se refiere a composiciones que comprenden
- la alfa-amilasa bacteriana con al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 1;
- la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo con al menos un 60 % de identidad con la SEC ID N.º: 14;

- la glucoamilasa con al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 9 y que además tiene una termoestabilidad a 70 °C, pH 5,3, de al menos 70 %.

[0151] En una forma de realización, la alfa-amilasa bacteriana se deriva de un almidón de *Bacillus*.
Las alfa-amilasas bacterianas adecuadas se describen en la sección "alfa amilasa bacterial" de arriba.

[0152] En una forma de realización, la alfa-amilasa bacteriana 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 al menos 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEC ID N.º: 3 descrita en la WO 99/019467 o SEC ID N.º: 1 de aquí.

[0153] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa bacteriana se deriva de alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus*, especialmente una variante que comprende una deleción doble correspondiente a una deleción de posiciones 181 y 182 y además comprende una sustitución N193F (denominada también I181* + G182* + N193F).
Las alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus* pueden ser unas variantes descritas en la WO 2011/082425 o debajo específicamente descritas.

[0154] Las alfa-amilasas bacterianas preferidas se derivan de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEC ID N.º: 1 aquí truncada para tener aproximadamente 491 aminoácidos con las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en:
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+I181*+G182*+N193F+H208Y+K220P+N224L+Q254S;
- E129V+K177L+R179E+I181*+G182*+N193F; y
- E129V+K177L+R179E+I181*+G182*+N193F+K220P+N224L+S242Q+Q254S.

[0155] En una forma de realización, la variante de alfa-amilasa bacteriana tiene al menos un 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 %, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEC ID N.º: 3 descrita en la WO 99/019467 o SEC ID N.º: 1 de aquí.

[0156] Las enzimas que hidrolizan almidón crudo adecuado se describen en la sección "alfa amilasa que hidroliza almidón crudo" de arriba.

[0157] En una forma de realización, la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo es de origen fúngico.
En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo es una variante de alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD y además una o varias de las siguientes sustituciones: G128D, D143N, K192R, tal como especialmente G128D+D143N o G128D+D143N+K192R (usando la SEC ID N.º: 14 de aquí para la numeración).

[0158] Las enzimas generadoras de fuente de carbohidratos adecuadas, preferiblemente glucoamilasas, se describen en la sección "enzimas generadoras de fuente de carbohidratos" de arriba.

[0159] En una forma de realización, la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una glucoamilasa con una termoestabilidad a 70 °C, pH 5,3, de al menos 70 % tal como al menos 75 %, preferiblemente al menos 80 %, preferiblemente al menos 85, es una glucoamilasa.
En una forma de realización preferida, la glucoamilasa es del género *Penicillium*, especialmente, una cepa de *Penicillium oxalicum* descrita como la SEC ID N.º: 2 en PCT/CN10/071753 publicada como la WO 2011/127802 y mostrada en la SEC ID N.º: 9 de aquí o una variante(s) diseñada de proteína estable de proteasa de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* con una sustitución K79V (usando SEC ID N.º: 15 de aquí para la numeración).

[0160] En otra forma de realización, la enzima generadora de fuente de carbohidratos es la glucoamilasa mostrada en la SEC ID N.º: 9 o una glucoamilasa con al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 96 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 98 %, tal como al menos 99 % de identidad la SEC ID N.º: 9 de aquí.

[0161] En una forma de realización, la composición comprende además una proteasa.
La proteasa puede ser de origen fúngico o bacteriano.
Las proteasas adecuadas se describen en la sección de "proteasa" de arriba.

[0162] En una forma de realización, la proteasa es una metalo proteasa.
En una forma de realización, la proteasa se deriva del género Termoascus, preferiblemente, una cepa de *Thermoascus aurantiacus*, especialmente *Thermoascus aurantiacus* CGMCC nº 0670 (clasificado como EC

3.4.24.39) descrita en la SEC ID N.º: 3 de aquí o aminoácidos 1 a 177 (el polipéptido maduro) de la SEC ID N.º: 1 de WO 2010/008841.

[0163] En una forma de realización, la proteasa se deriva de una cepa de Pyrococcus, preferiblemente, una cepa de *Pyrococcus furiosus*, tal como la mostrada en la SEC ID N.º: 1 en US 6,258,726 o la SEC ID N.º: 16 de aquí.

[0164] En una forma de realización, la proteasa es una con al menos 80 %, tal como al menos 85 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 95 %, tal como al menos 96 %, tal como al menos 97 %, tal como al menos 98 %, tal como al menos 99 % de identidad con en la SEC ID N.º: 1 en US patente nº 6,258,726 o SEC ID N.º: 16 aquí.

[0165] En una forma de realización, la composición de la invención tal y como se define en la reivindicación 11 comprende

- una alfa-amilasa bacteriana derivada de *Bacillus stearothermophilus*;
- una alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo derivada de *Rhizomucor pusillus*;
- una enzima generadora de fuente de carbohidratos con una termoestabilidad a 70 °C, pH 5,3, de al menos 70 % derivado de *Penicillium oxalicum*.

[0166] En una forma de realización, la composición comprende además una proteasa derivada de *Thermoascus aurantiacus* o *Pyrococcus furiosus*.

[0167] En una forma de realización, la composición comprende además una pululanasa.
Las pululanasas adecuadas se describen en la sección de "pululanasa" de arriba.

[0168] En una forma de realización, la pululanasa se deriva del género *Thermococcus*, tal como una cepa de pululanasa de *Thermococcus hydrothermalis* mostrada en la SEC ID N.º: 11 truncada a la derecha después del dominio X47 (es decir, aminoácidos 1-782 en SEC ID N.º: 11).

Materiales y métodos

Materiales:

[0169]

Alfa-amilasa de referencia A: alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones I181*+G182*+N193F truncadas a 491 aminoácidos (usando la SEC ID N.º: 1 de aquí para la numeración) alfa-amilasa (BAA 1407): alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones: V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+I181*+G182*+N193F+H208Y+K220P+N224L+Q254S truncadas a 491 aminoácidos (usando la SEC ID N.º: 1 de aquí para la numeración).
Alfa-amilasa (RSH AA 96): alfa-amilasa híbrida que consiste en alfa-amilasa *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa *Aspergillus niger* y SBD descrita como V039 en la tabla 5 en la WO 2006/069290 (Novozymes A/S) o la SEC ID N.º: 14 de aquí con las sustituciones siguientes: G128D+D143N.
Alfa-amilasa (RSH AA 101): alfa-amilasa híbrida que consiste en alfa-amilasa *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa *Aspergillus niger* y SBD descrita como V039 en la tabla 5 en la WO 2006/069290 (Novozymes A/S) o la SEC ID N.º: 14 de aquí con las sustituciones siguientes: G128D+D143N+K192R.
Glucoamilasa (AMG 001): parte madura de la glucoamilasa *Penicillium oxalicum* descrita como la SEC ID N.º: 2 en PCT/CN10/071753 publicada como la WO 2011/127802 y mostrada en la SEC ID N.º: 9 y 15 de aquí con una sustitución K79V (usando la SEC ID N.º: 15 de aquí para la numeración) como se describe en la co-pendiente solicitud US nº 61/531,189.
Glucoamilasa (AMG SPU): glucoamilasa Tamaromyces emersonii descrita en la WO 99/28448 con aproximadamente 20 % de actividad de glucoamilasa de glucoamilasa *Trametes cingulata* descrita en la WO 06/069289 y actividad lateral de alfa-amilasa de híbrido que consiste en alfa-amilasa *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa *Aspergillus niger* y SBD descrita como V039 en la tabla 5 en la WO 2006/069290 (Novozymes A/S) o SEC ID N.º: 14 de aquí.
Maíz: maíz molido y agua de proceso usada en el ejemplo 5 fueron obtenidos de de maíz Lp en noviembre de 2010 los contenidos sólidos secos (%DS) del maíz molido y agua de proceso fueron medidos para ser 86.78 y 7.93%, respectivamente, por el secado de horno a 105 °C durante 3 horas.
Levadura: RED STSR ETHANOL RED™ disponible de Red Star/Lesaffre, USA.

Métodos

[0170] Identidad: la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro de "identidad".

[0171] 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 de polipéptido, al igual que las secuencias de nucleótidos.
La matriz de puntuación por defecto BLOSUM50 se usa para alineamientos de polipéptido y la matriz de identidad predeterminada se usa para alineamientos de nucleótido.
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.

[0172] "Align" es parte del paquete FASTA versión v20u6 (ver Pearson and Lipman, 1988, "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448, y Pearson, 1990, "Rapid and Sensitive Sequence Comparison wit FASTP and FASTA," Methods in Enzymology 183:63-98)
Los alineamientos FASTA de proteína usan el algoritmo de Smith-Waterman sin limitación en tamaño del espacio (ver "Smith-Waterman algorithm" Smith and Waterman, 1981, J. Mol. Biol. 147:195-197).

Ensayos de proteasa

Ensayo de caseína AZCL

[0173] Una solución de 0,2 % del sustrato azul de caseína AZCL se suspende en tampón Borax/NaH_2PO_4 pH9 durante la agitación.
La solución se distribuye mientras se agita para placa microtituladora (100 microL por cada una), se añade la muestra enzimática 30 microL y las placas se incuban en un termomezclador de Eppendorf durante 30 minutos a 45 °C y 600 r.p.m.
Muestra de enzima desnaturalizada (100°C de ebullición durante 20 min) se usa como un vacio.
Tras la incubación, la reacción se detiene por transferencia de la placa microtituladora sobre hielo y la solución coloreada se separa del sólido por centrifugación a 3000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C. 60 MicroL de sobrenadante se transfieren a una placa microtituladora y la absorbancia a 595 nm se mide utilizando un lector de microplacas BioRad.

Ensayo pNA

[0174] La muestra que contiene 50 microL de proteasa se añade a una placa microtituladora y el ensayo comienza añadiendo 100 microL 1mM sustrato pNA (5 mg disuelto en 100 microL DMSO y además diluido a 10 mL con Borax/NaH_2PO_4 tampón pH 9,0).
El aumento en OD_{405} a temperatura ambiente se monitorea como una medida de la actividad de proteasa.

Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0175] Actividad de glucoamilasa se puede medir en las unidades de glucoamilasa (AGU).

[0176] La unidad de glucoamilasa Novo (AGU) se define como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 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.

[0177] Un sistema autoanalizador puede ser utilizado.
La mutarotasa se añade al reactivo de glucosa deshidrogenasa de modo que cualquier alfa-D-glucosa presente se vuelve a beta-D-glucosa.
La glucosa deshidrogenasa reacciona específicamente con beta-D-glucosa en la reacción mencionada anteriormente, forma NADH que se determina usando un fotómetro a 340 nm como una medida de la concentración de glucosa original.

Incubación de 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 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

[0178] Un archivo (EB-SM-0131.02/01) que describe este método analítico con más detalle está disponible en la solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca.

Actividad de alfa-amilasa (KNU)

[0179] La actividad de alfa-amilasa se puede determinar utilizando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición del almidón de patata modificado por la enzima y la reacción resulta de la mezcla de ejemplos de almidón/solución enzimática con una solución de iodina. Inicialmente, se forma un color azul negruzco, pero durante la descomposición del almidón, el color azul se vuelve más suave y se convierte gradualmente en marrón rojizo, que se compara con el estándar de color de vidrio.

[0180] Una unidad de alfa amilasa Kilo Novo (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 de almidón seca Merck Amylum soluble.

[0181] Un archivo EB-SM-0009.02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible bajo demanda para Novozymes A/S, Dinamarca.

Actividad de alfa-amilasa KNU(S)

[0182] KNU(S) se utiliza para determinar la actividad de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* y se describe en las páginas 35-41 en la WO 99/19467.

Determinación de actividad de pululanasa (NPUN)

[0183] La actividad de endo-pululanasa en NPUN se mide con respecto a un estándar de pululanasa de Novozymes. 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 utilizando pululano rojo.

[0184] 1 mL muestra diluida o estándar se incuba a 40 °C durante 2 minutos. 0,5 mL 2 % pululano rojo, 0,5 M KCI, 50 mM ácido cítrico, pH 5 se agregan y se mezclan.
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 luego se mide a 510 nm y la actividad calculada utilizando una curva estándar.

Ensayo enzimático de degradación de almidón crudo (Ra/GA)

[0185] Un protocolo para obtener un valor de índice enzimático que degrada almidón crudo (Ra/GA) es como sigue:
1) los ensayos se realizan a una temperatura de 40 °C.
2) primero, el perfil de pH de la enzima se obtiene en el almidón crudo.
El perfil se obtiene desde el trazado del % de actividad contra el pH.
Este valor de pH óptimo se usa en el ensayo.
3) cualquier tipo de almidón se puede utilizar tal como trigo, maíz, cebada, arroz, etc. En un ejemplo, el almidón crudo usado es almidón de maíz.
Se usa un 2 % de solución de almidón crudo.
Alternativamente, para obtener la solución de almidón gelatinizado, se calienta una solución de almidón crudo sobre la temperatura de gelatinización durante al menos 60 minutos.
En el caso del maíz, la solución de almidón crudo se calienta a 70 °C durante al menos 60 minutos.
4) la solución de reacción contiene el almidón gelatinizado (o almidón crudo) y un tampón.
La composición del tampón usada en el ensayo depende del pH óptimo de la enzima.
La composición de tampón y concentración deben ser idénticas para las mediciones de actividad de almidón crudo y gelatinizado.
5) la concentración enzimática usada en el ensayo debe ser idéntica para las mediciones de actividad de almidón crudo y gelatinizado.
6) la actividad enzimática se mide por determinación de los azúcares reductores en la solución.
Los métodos adecuados son los siguientes: el método de Bernfield para la determinación de los azúcares reductores usando ácido dinitrosalicílico se describe en Bernfield, 1955, Methods Enzymology 1:149-158 y el método paa determinar la reducción de azúcares con copper-bicinchoninate como se describe en Fox et al., 1991, Analytical Biochemistry 195: 93-96 o en Waffenschmidt et al., 1987, Anal. Biochem. 165: 337-340.

Antes de la determinación de azúcares reductores, las soluciones se hierven durante 3 minutos y se centrifugan para inactivar la enzima.
7) el tiempo para incubación para medir las actividades enzimáticas es 6 horas.
8) la actividad enzimática se expresa como el número de azúcares reductores producidos por hora y por mg de enzima activa pura.
9) la actividad en el almidón gelatinizado se mide por la medición de la liberación de glucosa producida por la enzima en un 2 % de (por ejemplo; maíz) mezcla reactiva de almidón gelatinizado y la actividad en el almidón crudo se mide por la medición de la liberación de glucosa producida por la enzima en un 2% de (por ejemplo, maíz) mezcla reactiva de almidón crudo.
La actividad se mide por la liberación de azúcares reductores producida en 4mol por hora por mg de enzima activa pura.

Ejemplos

Ejemplo 1

Estabilidad de variantes de alfa-amilasa

[0186] La estabilidad de una alfa-amilasa de referencia (alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones I181*+G182*+N193F truncada a 491 aminoácidos (usando la SEC ID N.º: 1 de aquí para la numeración) y variantes de alfa-amilasa de la misma 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 CaCl2 seguidas de la determinación de actividad residual utilizando el sustrato de EnzChek® (EnzChek® Ultra equipo de ensayo de amilasa, E33651, sondas Moleculares).

[0187] Las muestras de enzima purificadas fueron diluidas a concentraciones de trabajo de 0,5 y 1 o 5 y 10 ppm (microgramos/ml) en el tampón de dilución enzimática (10 mM acetato, 0,01 % Tritón X100,0.12 mM $CaCl_2$, pH 5,0).
Veinte microlitros de muestras de enzima fueron transferidos a 48 pocillos PCR MTP y 180 tampón de estabilidad de microlitros (150 mM acetato, 150 mM MES, 0,01 % Tritón X100, 0,12 mM $CaCl_2$, pH 4,5 o 5,5) se añadió a cada pocillo y se mezcló.
El ensayo se realizó utilizando dos concentraciones de enzima en duplicado.
Antes de la incubación a 75 °C u 85 °C, 20 microlitros se retiraron y almacenaron en hielo como muestras de control.
La incubación se realizó en una máquina PCR a 75 °C y 85 °C.
Después de la incubación, las muestras fueron diluidas a 15 ng/mL en el tampón de actividad residual (100 mM acetato, 0, 01 % Tritón X100, 0,12 mM $CaCl_2$, pH 5,5) y 25 microlitros de enzima diluida fueron transferidos a negro 384-MTP.
La actividad residual se determinó utilizando el sustrato EnzChek añadiendo 25 microlitros de solución de sustrato (100 microgramos/ml) a cada pocillo.
La fluorescencia se determinó cada minuto durante 15 minutos usando el filtro de excitación a 485-P nm y filtro de emisión a 555 nm (el lector de fluorescencia es Polarstar, BMG).
La actividad residual fue normalizada para controlar muestras para cada disposición.

[0188] Asumiendo el decaimiento logarítmico, el tiempo de semivida (T½ (min)) se calculó utilizando la ecuación: T½ (min) = T(min)*LN(0,5)/LN(%RA/100), donde T es período de incubación de ensayo en minutos y %RA es % de la actividad residual determinada en el ensayo.

[0189] Usando esta disposición de ensayo, el tiempo de semivida se determinó 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	112	16	ND

V59A+Q89R+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ Q254S+D269E+D281N			
Alfa-amilasa de referencia A con las sustituciones V59A+Q89R+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ Q254S+I270L	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+M96I+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			

[0190] Los resultados demuestran que las variantes de alfa-amilasa tienen una semivida superior significativamente y estabilidad que la alfa-amilasa de referencia.

Ejemplo 2

Preparación de variantes de proteasa y prueba de termoestabilidad

[0191] Los productos químicos usados fueron productos comerciales de al menos calidad reactiva.

Cepas y plásmidos:

[0192] E. Coli DH12S (disponible de Gibco BRL) se usó para el rescate de plásmido de levadura. PJTP000 es un vector transportador S. cerevisiae y E.coli bajo el control del promotor TPI, construido de pJC039 descrito en la WO 01/92502, donde el gen de proteasa *Thermoascus aurantiacus* M35 (WO 03/048353) ha sido insertado.

[0193] Las células competentes Saccharomyces cerevisiae YNG318: MATa Dpep4[cir+] ura3-52, leu2-D2, su 4-539 se usaron para la expresión de variantes de proteasa.
Se describe en J. Biol. Chem. 272(15): 9720-9727 (1997).

Medios y sustratos

[0194]
10X Solución Basal: base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (Difco) 66,8 g/L, succinato 100 g/l, NaOH 60 g/l.
Glucosa SC: 20 % glucosa (es decir, una concentración final de 2 % = 2 g/100 mL)) 100 mL/L, 5 % treonina 4 mL/L, 1 % triptófano10 ml/l, 20 % ácidos de casamino 25 ml/l, 10 X solución basal 100 ml/l.
La solución se esteriliza utilizando un filtro de un tamaño de los poros de 0,20 micrómetro.
Agar (2 %) y H_2O (aprox. 761 ML) se someten juntos a autoclave y la solución de glucosa SC esterilizada separadamente 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 $ZnSO_4$.
Solución PEG/LiAc: 40 % PEG4000 50 ml, 5 M acetato de litio 1 mL.

Placa de microtitulación de ceína de 96 pocillos:

[0195] Cada pocillo contiene 200 microL de 0,05-0,1 % de ceína (Sigma), 0,25 mM $ZnSO_4$ y 1 % de agar en un tampón de acetato sódico de 20 mM, pH 4,5.

Manipulaciones de ADN

[0196] A menos que se haya explicado de otro modo, las manipulaciones de ADN y transformaciones se realizaron 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

[0197] La transformación de levadura se realizó utilizando el método de acetato de litio. El vector de 0,5 MicroL (digerido por restricción de endonucleasas) y 1 microL de fragmentos de la PCR se mezclan.
La mezcla de ADN, 100 microL de YNG318 células competentes y 10 microL de portador de ADN YEAST MAKER (Clontech) se añade a un tubo de 12 mL de polipropileno (Falcon 2059).
Añadir 0,6 mL PEG/LiAc solución y mezclar suavemente.
Incubar durante 30 min a 30 °C y 200 r.p.m. seguido de 30 min a 42 °C (impacto de calor).
Transferencia a un tubo de Eppendorf y centrifugar durante 5 seg.
Eliminar el sobrenadante y resolver en 3 mL de YPD.
Incubar la suspensión celular durante 45 min a 200 r.p.m. a 30 °C.
Verter la suspensión en placas de glucosa SC e incubar a 30 °C durante 3 días para que crezcan colonias.
El total de ADN de levadura se extrae por el equipo de minipreparación de plásmido de levadura Zymoprep (ZYMO investigación).

Secuenciación del ADN

[0198] La transformación de E. Coli para la secuenciación del ADN se efectuó por electroporación (BIO-RAD Gene Pulser).
Los plásmidos de ADN se prepararon por el método alcalino (Molecular cloning, Cold Spring Harbor) o con el equipo de plásmido Qiagen®.
Los fragmentos de ADN se recuperaron de gel de agarosa por el equipo de extracción de gel Qiagen.
PCR se realizó utilizando un PTC-200 motor de ADN.
El analizador genético ABI PRISMTM 310 se usó para la determinación de todas las secuencias de ADN.

Construcción de vector de expresión de proteasa

[0199] El gen de proteasa Themoascus M35 se amplificó con el par de cebador Prot F (SEC ID N.º: 4) y Prot R (SEC ID N.º: 5).
Los fragmentos de PCR resultantes se introdujeron en el *S. Cerevisiae* YNG318 junto con el vector pJC039 (descritos en WO 2001/92502) digeridos con restricción de enzimas para eliminar el gen de cutinasa de *Humicola insolens.*

[0200] El plásmido en los clones de levadura en las placas de glucosa SC se recuperó para confirmar la secuencia interna y se denominó pJTP001.

Construcción de biblioteca de levadura y variantes dirigidas al sitio

[0201] Biblioteca en levadura y variantes dirigidas al sitio se construyeron por el método de PCR SOE (unión por extensión sobrepuesta, ver "PCR: A practical approach", p. 207-209, Oxford university press, eds. McPherson, Quirke, Taylor), seguido de recombinación *in vivo* de levadura.

Cebadores generales para amplificación y secuenciación

[0202] Los cebadores AM34 (SEC ID N.º: 6) y AM35 (SEC ID NO:7) se usaron para hacer fragmentos de ADN que contienen cualquier fragmento mutado por el método SOE junto con cebadores degenerados (AM34 + cebador inverso y AM35 + cebador directo) o justo 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 Taq puro de perlas 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

[0203] Los fragmentos de ADN fueron recuperados de gel de agarosa por el equipo de extracción de gel Qiagen.
Los fragmentos purificados resultantes fueron mezclados con la asimilación de vector.
La solución mezclada fue introducida en *Saccharomyces cerevisiae* para la construcción de bibliotecas o variantes dirigidas al sitio por recombinación *in vivo*.

Ensayo de actividad relativa

[0204] Clones de levadura en la glucosa SC fueron inoculadas a un pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos que contiene medio YPD+Zn y está cultivada a 28 °C durante 3 días.
Los sobrenadantes de cultivo se aplicaron a una placa de microtitulación de ceína de 96 pocillos y se incubaron a al menos 2 temperaturas (ex., 70 °C y 80 °C) durante más del 4 horas o durante toda la noche.

La turbidez de ceína en la placa se midió como A630 y la actividad relativa (temperaturas superior/inferioress) se determinó como un indicador de mejora de termoactividad.
Los clones con actividad relativa más alta que la variante parental fueron seleccionados y la secuencia se determinó.

Ensayo de actividad restante

[0205] Los clones de levadura en la glucosa SC fueron inoculados a un pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos y se cultivó a 28 °C durante 3 días.
La actividad de proteasa se midió a 65 °C usando azocaseína (Megazyme) después de la incubación del cultivo sobrenadante en un tampón de acetato sódico de 20 mM, pH 4,5, durante 10 min a una temperatura determinada (80 °C o 84 °C con 4 °C como una referencia) para determinar la actividad restante.
Los clones con una actividad restante más alta que la variante parental fueron seleccionados y la secuencia fue determinada.

Ensayo de azocaseína

[0206] 20 microL de muestras fueron mezclados con 150 microL de solución de sustrato (4 mL de 12,5 % de azocaseína en el etanol en 96 mL de 20 mM acetato sódico, pH 4,5, que contiene 0,01 % de triton-100 y 0,25 mM ZnSO4) e incubado durante 4 horas o más.

[0207] Después de la adición de 20 microL/pocillo de 100 % de solución de ácido tricloroacético (ATC), la placa fue centrífuga y 100 microL de sobrenadantes fueron probados para medir A440.

Expresión de variantes de proteasa en *Aspergillus oryzae*

[0208] Los constructos que comprenden 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 neutra de *Aspergillus niger* II fusionado para 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 el Aspergillus como se describe en Lassen et al., 2001, Appl. Environ. Microbiol. 67: 4701-4707.
Para cada uno de los constructos 10-20, se aislaron cepas, se purificaron y cultivaron en frascos de agitación.

Purificación de variantes expresadas

[0209] Ajustar el pH de la muestra de fermentación filtrada de 0,22 micro m a 4,0.

[0210] Poner, la muestra en un baño de hielo con agitación magnética.
Añadir $(NH_4)_2SO_4$ 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).

[0211] Después de la adición final de (NH4)2SO4, se incuba la muestra en el baño de hielo con agitación magnética suave durante min. 45 min.

[0212] Centrifugación: Hitachi himac CR20G alta velocidad centrífuga refrigerada equipada con una cabeza de rotor R20A2, 5 °C, 20. 000 r.p.m., 30 min.

[0213] Disolver el precipitado formado en 200 mL 50 mM de Na-acetato pH 4,0.

[0214] Filtrar la muestra por succión de vacío utilizando un 0,22 micro m PES PLUS membrana (IWAKI).

[0215] Desalación/intercambio de tampón, la muestra a 50 mM de Na-acetato pH 4,0 usando la ultrafiltración (Vivacell 250 de VivaScience equipado con 5 kDa membrana de PES MWCO) durante toda la noche en una cámara fría.
Diluir la muestra retenida a 200 ml utilizando 50 mM de Na-acetato pH 4,0.
La conductividad de muestra es preferiblemente menor del 5 mS/cm.

[0216] Cargar la muestra sobre una columna de intercambio de catión equilibrada con 50 mM de Na-acetato pH 4,0.
La muestra no unida de lavado fuera de la columna utilizando 3 volúmenes de columna del tampón de unión (50 mM pH de Na-acetato 4,0) y eluir la muestra utilizando un gradiente lineal, 0-100 % de tampón de elución (50 mM Na-acetato + 1 M pH de NaCl 4.0) en 10 volúmenes de columna.

[0217] Las fracciones recogidas se ensayan por un ensayo de endoproteasa (cf. debajo) seguido de estándar SDS-PAGE (condiciones de reducción) en fracciones seleccionadas.
Las fracciones se agrupan basadas en el ensayo de endoproteasa y SDS-PAGE.

Ensayo de endoproteasa

[0218] Protazyme OL comprimido/5 ml 250 mM de Na-acetato pH 5,0 se disuelve por agitación magnética (sustrato: comprimido endoproteasa AK de Protazyme de Megazyme - cat. # PRAK 11/08).

[0219] Con la agitación, 250 microL de solución de sustrato se transfiere a un tubo de Eppendorf de 1,5 mL.

[0220] 25 microL de muestra se añaden a cada tubo (en blanco es el tampón de muestra).

[0221] Los tubos se incuban en un termomezclador con la agitación (1000 r.p.m.) a 50 °C durante 15 minutos.

[0222] 250 microL de 1 M NaOH se añade a cada tubo, seguido de agitación de vórtice.

[0223] Centrifugación durante 3 min. a 16,100 X G y 25 °C.

[0224] 200 microL del sobrenadante se transfire a un MTP y se registra la absorbancia a 590 nm.

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

Variante	Sustitución(es) y/o deleción(es)	Actividad restante	
		80 °C	84 °
JTP082	⊗S5/D79L/S87P/A112P/D142L		53 %
JTP091	D79L/S87P/A112P/T124V/D142L	43 %	
JTP092	⊗S5/N26R/D79L/S87P/A112P/D142L		60 %
JTP095	N26R/T46R/D79L/S87P/A112P/D142L		62 %
JTP096	T46R/D79L/S87P/T116V/D142L		67 %
JTP099	D79L/P81 R/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 %	

Tabla 3 actividad relativa de variantes de proteasa. La numeración de sustitución(es) comienza de N-terminal del péptido maduro en aminoácidos 1 a 177 de la SEC ID N.º: 3.

Variante	Sustituciones	Actividad relativa	
		80 °C/70 °C	85 °C/70 °C
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 de N-terminal del péptido maduro en aminoácidos 1 a 177 de la 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 seleccionada utilizando la enzima purificada

[0225] Variantes de proteasa seleccionada que muestran buena termoestabilidad fueron purificadas y las enzimas purificadas fueron usadas en un ensayo de ceína BCA como se describe abajo.
La actividad de proteasa restante se determinó a 60 °C tras la incubación de la enzima a temperaturas elevadas como se ha indicado durante 60 min.

Ensayo de ceína BCA:

[0226] El ensayo de ceína BCA se realizó para detectar la cuantificación de proteína soluble liberada de ceína por proteasas variantes a varias temperaturas.

Protocolo:

[0227]
Mezcla 10 microL de 10 micro g/mL soluciones enzimáticas y 100 microL de 0,025 % de solución de ceína en una placa de microtitulación (MTP).
Incubar a varias temperaturas durante 60 min.
Añadir 10 microL de solución de 100 % de ácido tricloroacético (ATC).
Centrifugar MTP a 3500rpm durante 5 min.
Extraer 15 microL a un nuevo MTP que contiiene 100 microL de ensayo de solución BCA (Pierce Cat#:23225, BCA Protein Assay Kit).
Incubar durante 30 min. a 60 °C.
Medir A562.

[0228] Los resultados se muestran en la tabla 5.
Todas las variantes de proteasa evaluadas mostraron una termoestabilidad mejorada en comparación con el tipo salvaje (WT) de proteasa.

Tabla 5 ensayo de ceína BCA

Peso/variante	Muestra incubada 60 min a temperaturas indicadas (°C) (micro g/mL péptido equivalente liberado de albúmina de suero bovino)						
	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 *Penicillium oxalicum*

[0229] La glucoamilasa *Penicillium oxalicum* se describe en la SEC ID N.º: 9 de aquí.
Sustrato. Sustrato: 1 % de almidón soluble (Sigma S-9765) en agua desionizada
Reacción de tampón: 0,1 M a tampón acetato pH 5,3
Equipo de determinación de concentración de glucosa: Wako glucose assay kit (LabAssay glucose, WAKO, Cat# 298-65701).

[0230] Condición de reacción. 20 microL de almidón soluble y 50 microL de tampón acetato a pH 5,3 se mezclaron. 30 microL de solución enzimática (50 micro g proteína enzimática/ml) se añadió a un volumen final de 100 microL seguido de incubación a 37 °C durante 15 min.

[0231] La concentración de glucosa se determinó por Wako kits.

[0232] Todo el trabajo se realizó en paralelo.

[0233] Temperatura óptima. Para valorar la temperatura óptima de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*, el ensayo "condición de reacción" anteriormente descrita 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 relativa (%)	63,6	71,7	86,4	99,4	94,6	100,0	92,9	92,5	82,7	82,8

[0234] Desde los resultados, se puede observar que la temperatura óptima para glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en las condiciones dadas está entre 50 °C y 70 °C, y la glucoamilasa mantiene más del 80 % de actividad a 95 °C.

[0235] 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 tampón 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.

[0236] 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

[0237] De los resultados se puede observar que glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* es estable hasta 70 °C después de la preincubación dursnte 15 min en que este mantiene más del 80 % de la actividad.

[0238] PH óptimo. Para valorar el pH óptimo de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*, el ensayo de condición de reacción anteriormente descrito se realizó a un 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 acetato descrito en el ensayo de condición de reacción del tampón, se usó el siguiente ácido succínico 100 mM, HEPES, CHES, CAPSO, 1 mM $CaCl_2$,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 con HCl o NaOH.

[0239] 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

[0240] De los resultados se puede observar que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en las condiciones dadas tiene la mayor actividad a un pH 5,0.
La glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* es activa en un rango amplio de pH en el que este mantiene más del 50 % de la actividad de pH 2 a 7.

[0241] Estabilidad de pH. Para valorar la termoestabilidad de la glucoamilasa *Penicillium oxalicum*, el ensayo de condición de reacción se modificó en que la solución enzimática (50micro g/mL) se preincubó 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 se realizó como se ha descrito anteriormente.

[0242] 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

[0243] De los resultados se puede observar que la glucoamilasa *Penicillium oxalicum* es estable de pH 3 a pH 7 después de la preincubación durante 20 horas y esta reduce su actividad a pH 8.

Ejemplo 5 (un proceso de la invención)

Proceso de producción de etanol mejorado con licuefacción a 75 °C, pH 4,80

[0244] Maíz molido y agua de proceso se usaron para este estudio.
Los contenidos sólidos secos (% DS) del maíz molido y agua de proceso fueron medidos a 86,78 y 7,93 %, respectivamente, por secado al horno a 105 °C durante 3 horas.

[0245] Preparación de triturado. Nueve suspensiones acuosas de maíz diferentes se prepararon para la licuefacción.
En 5x200 g de recipientes labomat (Mathis; Inc.) se añadieron 35,29 g de maíz molido, 37, 71 g de agua del grifo y 30,00 g de .
La proporción de agua de proceso se estableció en 30 % para todas las suspensiones acuosas.
Después de la adición de estos componentes, las suspensiones acuosas se ajustaron al pH 4,80 utilizando 40 % H_2SO_4 si era necesario.
Las soluciones madre de todas las enzimas concentradas se prepararon usando agua desionizada.
Partes alícuotas de todas las enzimas se añadieron a cada recipiente labomat para alcanzar las concentraciones finales específicas en la tabla 10.
Finalmente, el agua desionizada se añadió a las suspensiones acuosas para asegurar que el inicio del %DS para todas suspensiones acuosas fuera idéntico.

Tabla 10.

	Amilasa	Dosis	Unidades	Amilasa RSH	Dosis	Unidades	AMG	Dosis	unidades	pH	Temp.	Glucoamilasa	Dosis	Unidades
1	BAA1407	1,4	UG/gDS			UG/gDS				4,8	75	AMG SPU	0,5	AGU/gDS
2	BAA1407	1,4	UG/gDS	RSH AA 96	3	UG/gDS				4,8	75	AMG SPU	0,5	AGU/gDS
3	BAA1407	1,4	UG/gDS	RSH AA 96	10	UG/gDS				4,8	75	AMG SPU	0,5	AGU/gDS
4	BAA1407	1,4	UG/gDS	RSH AA 96	25	UG/gDS				4,8	75	AMG SPU	0,5	AGU/gDS
5	BAA1407	1,4	UG/gDS	RSH AA 101	3	UG/gDS				4,8	75	AMG SPU	0,5	AGU/gDS
6	BAA1407	1,4	UG/gDS	RSH AA 101	10	UG/gDS				4,8	75	AMG SPU	0,5	AGU/gDS
7	BAA1407	1,4	UG/gDS	RSH AA 101	25	UG/gDS				4,8	75	AMG SPU	0,5	AGU/gDS
8	BAA1407	1,4	UG/gDS	RSH AA 96	25	UG/gDS	AMG 001	10	UG/gDS	4,8	75	AMG SPU	0,5	AGU/gDS
9	BAA1407	1,4	UG/gDS	RSH AA 101	25	UG/gDS	AMG 001	10	UG/gDS	4,8	75	AMG SPU	0,5	AGU/gDS

[0246] Luego, todos los botes se cerraron.
Ellos fueron colocados en el labomat y el programa siguiente fue usado para la licuefacción (tabla 11):

Tabla 11.

Licuefacción:	Rampa	5 Grados/min	R.p.m. = 3 = 0	
Labomat	Tiempo de rampa	17 Min		
	Liq temp	75 °C		
	Liq tiempo	113 Min		

[0247] Al final del programa descrito en la tabla 11, todos los botes se retiraron del labomat y se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo.

[0248] Disposición de fermentación. Después del enfriamiento completo, se añadieron urea y penicilina a todas las trituraciones para alcanzar concentraciones finales de 750 y 3 ppm, respectivamente.
Los triturados se ajustaron a pH 5,0 utilizando 40 % H_2SO_4 o 50 % NaOH.
El % final de sólidos secos de las trituraciones se midió y se registró como 32,44 %.

[0249] Aproximadamente 5 g de cada triturado se transfirió a tubos centrifugadores de 15 mL Falcon de plástico prepesados para la fermentación.
Un pequeño orificio se perforó en la tapa de cada tubo para permitir la liberación de CO_2 durante la fermentación.
Cinco fermentaciones replicadas se prepararon para cada tratamiento.
Posteriormente a la transferencia de triturado, todos los tubos se repesaron para obtener los pesos de muestra iniciales.
A cada tubo luego se añadió 100 microL de levadura de RED STAR ETHANOL RED rehidratado (rehidratado pesando 5,5 g de levadura seca en un matraz de 150 mL Erlenmeyer, añadir 100 mL de agua del grifo y agitar en un baño maría a 32 °C durante 30 minutos), una parte alícuota de AMG diluida SPU glucoamilasa (diluida en el agua desionizada) necesitó alcanzar una concentración de inicio de 0,50 AGU/g DS.
Una cantidad apropiada de agua desionizada finalmente se añadió a cada tubo de manera que el volumen total de líquido añadido a cada de tubo relativamente al peso de muestra fue el mismo.
Luego todos los tubos se repesaron y luego se colocaron en un conjunto al baño maría precalentado a 32 °C.
La fermentación pudo progresar durante un total de 54 horas.
Los tubos se agitaron en vórtice enérgicamente después de aproximadamente 7 horas y luego se repesaron dos veces al día durante el tiempo de fermentación restante.
Los gramos de etanol producidos por gramo de sólidos secos en cada tubo se calcularon de los datos de pérdida de peso según la ecuación siguiente:

$$g\ etanol\ /\ g\ DS = \frac{g\ CO_2\ \begin{matrix}pérdida\\ de\ peso\end{matrix} \times \frac{1\ mol\ CO_2}{44.0098\ g\ CO_2} \times \frac{1\ mol\ etanol}{1\ mol\ CO_2} \times \frac{46.094\ g\ etanol}{1\ mol\ etanol}}{g\ maíz\ en\ tubo \times \%DS\ de\ maíz}$$

[0250] Tres de los tubos replicados se retiraron después de 54 horas de fermentación para análisis de HPLC.
Las muestras retiradas se trataron con 50 microL de 40 % H_2SO_4 para parar la fermentación y se agitaron en vórtex íntegramente.
Las muestras fueron luego centrifugadas a 1570xg durante 10 minutos y luego se filtraron en los viales de HPLC a través de 0,45 micro m filtros de jeringa.
El análisis de HPLC se realizó finalmente en las muestras para cuantificar las cantidades de DP4+, DP3, DP2, glucosa, fructosa, ácidos lácticos y acéticos, glicerol, y etanol.

Resultados

[0251] Fig. 1 muestra los resultados de HPLC calculado según el promedio obtenido para los tratamientos después de 54 horas de fermentación.
Se midió un aumento significativo en la producción de etanol cuando RSH AA 96, RSH AA 101 y glucoamilasa de AMG 001 se añadieron en la licuefacción encima de amilasa de la alfa amilasa 1407.

SEQUENCE LISTING

<110> Novozymes A/S
Deinhammer, Randy
Hjulmand, Anne Glud
Craig, Joyce
Coward-Kelly, Guillermo
Matsui, Tomoko
Takagi, Shinobu
Clark, Suzanne
Matthews, John

<120> Processes for Producing Fermentation Products

<130> 12135-WO-PCT

<160> 16

<170> PatentIn version 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> DNA
<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> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<400> 4
aacgacggta cccggggatc ggatccatgc ggctcgttgc ttccctaac
49

<210> 5
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Construct

<400> 5
ctaattacat gatgcggccc ttaattaatt agcaaccaag gtatatgg
48

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Construct

<400> 6
taggagttta gtgaacttgc
20

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Construct

<400> 7
ttcgagcgtc ccaaaacc
18

<210> 8
<211> 1851
<212> DNA
<213> Penicillium oxalicum

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1848)

<220>
<221> misc_signal
<222> (1)..(63)
<223> Signal predicted using Signal P (Nielsen et al , 1997, Protein Engineering 10: 1-6)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (64)..(1848)

<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
-20 -15 -10

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
-5 -1 1 5 10

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
15 20 25

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
30 35 40

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
45 50 55

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
60 65 70 75

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
80 85 90

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
95 100 105

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
110 115 120

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
125 130 135

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
140 145 150 155

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
160 165 170

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
175 180 185

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
190 195 200

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
205 210 215

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
220 225 230 235

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
240 245 250

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
255 260 265

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
270 275 280

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
285 290 295

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
300 305 310 315

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
320 325 330

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
335 340 345

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
350 355 360

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
365 370 375

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
380 385 390 395

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
400 405 410

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
415 420 425

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
430 435 440

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
445 450 455

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
460 465 470 475

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
480 485 490

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
495 500 505

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
510 515 520

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
525 530 535

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
540 545 550 555

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
560 565 570

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
575 580 585

cac tcc aac gac gtg tgg cag ttt tga
1851
His Ser Asn Asp Val Trp Gln Phe
590 595

<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

-20 -15 -10

Gln Leu Thr Ala Ala Arg Pro Asp Pro Lys Gly Gly Asn Leu Thr Pro
-5 -1 1 5 10

Phe Ile His Lys Glu Gly Glu Arg Ser Leu Gln Gly Ile Leu Asp Asn
15 20 25

Leu Gly Gly Arg Gly Lys Lys Thr Pro Gly Thr Ala Ala Gly Leu Phe
30 35 40

Ile Ala Ser Pro Asn Thr Glu Asn Pro Asn Tyr Tyr Tyr Thr Trp Thr
45 50 55

Arg Asp Ser Ala Leu Thr Ala Lys Cys Leu Ile Asp Leu Phe Glu Asp
60 65 70 75

Ser Arg Ala Lys Phe Pro Ile Asp Arg Lys Tyr Leu Glu Thr Gly Ile
80 85 90

Arg Asp Tyr Val Ser Ser Gln Ala Ile Leu Gln Ser Val Ser Asn Pro
95 100 105

Ser Gly Thr Leu Lys Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu
110 115 120

Ile Asp Leu Asn Pro Phe Ser Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp
125 130 135

Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile Thr Tyr Ala Asn Tyr Leu
140 145 150 155

Ile Ser His Gly Gln Lys Ser Asp Val Ser Gln Val Met Trp Pro Ile
160 165 170

Ile Ala Asn Asp Leu Ala Tyr Val Gly Gln Tyr Trp Asn Asn Thr Gly
175 180 185

Phe Asp Leu Trp Glu Glu Val Asp Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile Ala
190 195 200

Val Gln His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser Gln Leu Ala Lys Lys Leu
205 210 215

Gly Lys Ser Cys Asp Ala Cys Asp Ser Gln Pro Pro Gln Ile Leu Cys
220 225 230 235

Phe Leu Gln Ser Phe Trp Asn Gly Lys Tyr Ile Thr Ser Asn Ile Asn
240 245 250

Thr Gln Ala Ser Arg Ser Gly Ile Asp Leu Asp Ser Val Leu Gly Ser
255 260 265

Ile His Thr Phe Asp Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp Ala Thr Phe Gln
270 275 280

Pro Cys Ser Ala Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Val Tyr Val Asp Ser
285 290 295

Phe Arg Ser Ile Tyr Lys Ile Asn Ala Gly Leu Ala Glu Gly Ser Ala
300 305 310 315

Ala Asn Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Gln Gly Gly Asn Pro
320 325 330

Trp Tyr Leu Ala Thr Leu Gly Ala Ser Glu Leu Leu Tyr Asp Ala Leu
335 340 345

Tyr Gln Trp Asp Arg Leu Gly Lys Leu Glu Val Ser Glu Thr Ser Leu
350 355 360

Ser Phe Phe Lys Asp Phe Asp Ala Thr Val Lys Ile Gly Ser Tyr Ser
365 370 375

Arg Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Lys Leu Thr Gln Ser Ile Lys Ser Tyr
380 385 390 395

Ala Asp Gly Phe Ile Gln Leu Val Gln Gln Tyr Thr Pro Ser Asn Gly
400 405 410

Ser Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Arg Asn Thr Ala Ala Pro Leu Ser Ala
415 420 425

Asn Asp Leu Thr Trp Ser Phe Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Gln Arg
430 435 440

Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Ser Trp Gly Ala Lys Ser Ala Asn Lys
445 450 455

Val Pro Thr Thr Cys Ser Ala Ser Pro Val Val Gly Thr Tyr Lys Ala
460 465 470 475

Pro Thr Ala Thr Phe Ser Ser Lys Thr Lys Cys Val Pro Ala Lys Asp
480 485 490

Ile Val Pro Ile Thr Phe Tyr Leu Ile Glu Asn Thr Tyr Tyr Gly Glu
495 500 505

Asn Val Phe Met Ser Gly Asn Ile Thr Ala Leu Gly Asn Trp Asp Ala
510 515 520

Lys Lys Gly Phe Pro Leu Thr Ala Asn Leu Tyr Thr Gln Asp Gln Asn
525 530 535

Leu Trp Phe Ala Ser Val Glu Phe Ile Pro Ala Gly Thr Pro Phe Glu
540 545 550 555

Tyr Lys Tyr Tyr Lys Val Glu Pro Asn Gly Asp Ile Thr Trp Glu Lys
560 565 570

Gly Pro Asn Arg Val Phe Val Ala Pro Thr Gly Cys Pro Val Gln Pro
575 580 585

His Ser Asn Asp Val Trp Gln Phe
590 595

<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
48
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> Artificial Sequence

<220>
<223> Hybrid pullulanase of Thermoccus hydrothermalis and Thermococcus litoralis

<220>
<221> SIGNAL
<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

<210> 13
<211> 546
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Alpha-amylase from Rhizomucor pusillus prepared from artificial DNA sequence

<400> 13

Ala Thr Ser Asp Asp Trp Lys Gly Lys Ala Ile Tyr Gln Leu Leu Thr
1 5 10 15

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

Ser Asn Tyr Cys Gly Gly Thr Tyr Glu Gly Ile Thr Lys His Leu Asp
35 40 45

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

Lys Asn Ser Asp Gly Gly Tyr His Gly Tyr Trp Ala Thr Asp Phe Tyr
65 70 75 80

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

Gln Ala Ala His Glu Arg Asp Met Tyr Val Met Leu Asp Val Val Ala
100 105 110

Asn His Ala Gly Pro Thr Ser Asn Gly Tyr Ser Gly Tyr Thr Phe Gly
115 120 125

Asp Ala Ser Leu Tyr His Pro Lys Cys Thr Ile Asp Tyr Asn Asp Gln
130 135 140

Thr Ser Ile Glu Gln Cys Trp Val Ala Asp Glu Leu Pro Asp Ile Asp
145 150 155 160

Thr Glu Asn Ser Asp Asn Val Ala Ile Leu Asn Asp Ile Val Ser Gly
165 170 175

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

His Ile Arg Lys Asp Phe Trp Thr Gly Tyr Ala Glu Ala Ala Gly Val
195 200 205

Phe Ala Thr Gly Glu Val Phe Asn Gly Asp Pro Ala Tyr Val Gly Pro
210 215 220

Tyr Gln Lys Tyr Leu Pro Ser Leu Ile Asn Tyr Pro Met Tyr Tyr Ala
225 230 235 240

Leu Asn Asp Val Phe Val Ser Lys Ser Lys Gly Phe Ser Arg Ile Ser
245 250 255

Glu Met Leu Gly Ser Asn Arg Asn Ala Phe Glu Asp Thr Ser Val Leu
260 265 270

Thr Thr Phe Val Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Phe Leu Asn Ser Gln
275 280 285

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

Glu Gly Ile Pro Ile Val Tyr Tyr Gly Ser Glu Gln Gly Phe Ser Gly
305 310 315 320

Gly Ala Asp Pro Ala Asn Arg Glu Val Leu Trp Thr Thr Asn Tyr Asp
325 330 335

Thr Ser Ser Asp Leu Tyr Gln Phe Ile Lys Thr Val Asn Ser Val Arg
340 345 350

Met Lys Ser Asn Lys Ala Val Tyr Met Asp Ile Tyr Val Gly Asp Asn
355 360 365

Ala Tyr Ala Phe Lys His Gly Asp Ala Leu Val Val Leu Asn Asn Tyr
370 375 380

Gly Ser Gly Ser Thr Asn Gln Val Ser Phe Ser Val Ser Gly Lys Phe
385 390 395 400

Asp Ser Gly Ala Ser Leu Met Asp Ile Val Ser Asn Ile Thr Thr Thr
405 410 415

Val Ser Ser Asp Gly Thr Val Thr Phe Asn Leu Lys Asp Gly Leu Pro
420 425 430

Ala Ile Phe Thr Ser Ala Gly Ala Thr Ser Pro Gly Gly Ser Ser Gly
435 440 445

Ser Val Glu Val Thr Phe Asp Val Tyr Ala Thr Thr Val Tyr Gly Gln
450 455 460

Asn Ile Tyr Ile Thr Gly Asp Val Ser Glu Leu Gly Asn Trp Thr Pro
465 470 475 480

Ala Asn Gly Val Ala Leu Ser Ser Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ala
485 490 495

Thr Ile Ala Leu Pro Ala Asp Thr Thr Ile Gln Tyr Lys Tyr Val Asn
500 505 510

Ile Asp Gly Ser Thr Val Ile Trp Glu Asp Ala Ile Ser Asn Arg Glu
515 520 525

Ile Thr Thr Pro Ala Ser Gly Thr Tyr Thr Glu Lys Asp Thr Trp Asp
530 535 540

Glu Ser
545

<210> 14
<211> 583
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Alpha-amylase from Rhizomucor with SBD from Aspergillus niger prepared from artificial DNA sequence

<400> 14

Ala Thr Ser Asp Asp Trp Lys Gly Lys Ala Ile Tyr Gln Leu Leu Thr
1 5 10 15

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

Ser Asn Tyr Cys Gly Gly Thr Tyr Glu Gly Ile Thr Lys His Leu Asp
35 40 45

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

Lys Asn Ser Asp Gly Gly Tyr His Gly Tyr Trp Ala Thr Asp Phe Tyr
65 70 75 80

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

Gln Ala Ala His Glu Arg Asp Met Tyr Val Met Leu Asp Val Val Ala
100 105 110

Asn His Ala Gly Pro Thr Ser Asn Gly Tyr Ser Gly Tyr Thr Phe Gly
115 120 125

Asp Ala Ser Leu Tyr His Pro Lys Cys Thr Ile Asp Tyr Asn Asp Gln
130 135 140

Thr Ser Ile Glu Gln Cys Trp Val Ala Asp Glu Leu Pro Asp Ile Asp
145 150 155 160

Thr Glu Asn Ser Asp Asn Val Ala Ile Leu Asn Asp Ile Val Ser Gly
165 170 175

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

His Ile Arg Lys Asp Phe Trp Thr Gly Tyr Ala Glu Ala Ala Gly Val
195 200 205

Phe Ala Thr Gly Glu Val Phe Asn Gly Asp Pro Ala Tyr Val Gly Pro
210 215 220

Tyr Gln Lys Tyr Leu Pro Ser Leu Ile Asn Tyr Pro Met Tyr Tyr Ala
225 230 235 240

Leu Asn Asp Val Phe Val Ser Lys Ser Lys Gly Phe Ser Arg Ile Ser
245 250 255

Glu Met Leu Gly Ser Asn Arg Asn Ala Phe Glu Asp Thr Ser Val Leu
260 265 270

Thr Thr Phe Val Asp Asn His Asp Asn Pro Arg Phe Leu Asn Ser Gln
275 280 285

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

Glu Gly Ile Pro Ile Val Tyr Tyr Gly Ser Glu Gln Gly Phe Ser Gly
305 310 315 320

Gly Ala Asp Pro Ala Asn Arg Glu Val Leu Trp Thr Thr Asn Tyr Asp
325 330 335

Thr Ser Ser Asp Leu Tyr Gln Phe Ile Lys Thr Val Asn Ser Val Arg
340 345 350

Met Lys Ser Asn Lys Ala Val Tyr Met Asp Ile Tyr Val Gly Asp Asn
355 360 365

Ala Tyr Ala Phe Lys His Gly Asp Ala Leu Val Val Leu Asn Asn Tyr
370 375 380

Gly Ser Gly Ser Thr Asn Gln Val Ser Phe Ser Val Ser Gly Lys Phe
385 390 395 400

Asp Ser Gly Ala Ser Leu Met Asp Ile Val Ser Asn Ile Thr Thr Thr
405 410 415

Val Ser Ser Asp Gly Thr Val Thr Phe Asn Leu Lys Asp Gly Leu Pro
420 425 430

Ala Ile Phe Thr Ser Ala Thr Gly Gly Thr Thr Thr Thr Ala Thr Pro
435 440 445

Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala
450 455 460

Ser Lys Thr Ser Thr Ser Thr Ser Ser Thr Ser Cys Thr Thr Pro Thr
465 470 475 480

Ala Val Ala Val Thr Phe Asp Leu Thr Ala Thr Thr Thr Tyr Gly Glu
485 490 495

Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser Ile Ser Gln Leu Gly Asp Trp Glu Thr
500 505 510

Ser Asp Gly Ile Ala Leu Ser Ala Asp Lys Tyr Thr Ser Ser Asp Pro
515 520 525

Leu Trp Tyr Val Thr Val Thr Leu Pro Ala Gly Glu Ser Phe Glu Tyr
530 535 540

Lys Phe Ile Arg Ile Glu Ser Asp Asp Ser Val Glu Trp Glu Ser Asp
545 550 555 560

Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val Pro Gln Ala Cys Gly Thr Ser Thr Ala
565 570 575

Thr Val Thr Asp Thr Trp Arg
580

<210> 15
<211> 595
<212> PRT
<213> Penicillium oxalicum

<220>

<221> mat_peptide
<222> (1)..(595)
<223> Penicillium oxalicum glucoamylase (mature protein)

<400> 15

Arg Pro Asp Pro Lys Gly Gly Asn Leu Thr Pro Phe Ile His Lys Glu
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ser Leu Gln Gly Ile Leu Asp Asn Leu Gly Gly Arg Gly
20 25 30

Lys Lys Thr Pro Gly Thr Ala Ala Gly Leu Phe Ile Ala Ser Pro Asn
35 40 45

Thr Glu Asn Pro Asn Tyr Tyr Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Ala Leu
50 55 60

Thr Ala Lys Cys Leu Ile Asp Leu Phe Glu Asp Ser Arg Ala Lys Phe
65 70 75 80

Pro Ile Asp Arg Lys Tyr Leu Glu Thr Gly Ile Arg Asp Tyr Lys Ser
85 90 95

Ser Gln Ala Ile Leu Gln Ser Val Ser Asn Pro Ser Gly Thr Leu Lys
100 105 110

Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu Ile Asp Leu Asn Pro
115 120 125

Phe Ser Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg
130 135 140

Ala Thr Ala Met Ile Thr Tyr Ala Asn Tyr Leu Ile Ser His Gly Gln
145 150 155 160

Lys Ser Asp Val Ser Gln Val Met Trp Pro Ile Ile Ala Asn Asp Leu
165 170 175

Ala Tyr Val Gly Gln Tyr Trp Asn Asn Thr Gly Phe Asp Leu Trp Glu
180 185 190

Glu Val Asp Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile Ala Val Gln His Arg Ala
195 200 205

Leu Val Glu Gly Ser Gln Leu Ala Lys Lys Leu Gly Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Ala Cys Asp Ser Gln Pro Pro Gln Ile Leu Cys Phe Leu Gln Ser Phe
225 230 235 240

Trp Asn Gly Lys Tyr Ile Thr Ser Asn Ile Asn Thr Gln Ala Ser Arg
245 250 255

Ser Gly Ile Asp Leu Asp Ser Val Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp
260 265 270

Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp Ala Thr Phe Gln Pro Cys Ser Ala Arg
275 280 285

Ala Leu Ala Asn His Lys Val Tyr Val Asp Ser Phe Arg Ser Ile Tyr
290 295 300

Lys Ile Asn Ala Gly Leu Ala Glu Gly Ser Ala Ala Asn Val Gly Arg
305 310 315 320

Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Gln Gly Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Ala Thr
325 330 335

Leu Gly Ala Ser Glu Leu Leu Tyr Asp Ala Leu Tyr Gln Trp Asp Arg
340 345 350

Leu Gly Lys Leu Glu Val Ser Glu Thr Ser Leu Ser Phe Phe Lys Asp
355 360 365

Phe Asp Ala Thr Val Lys Ile Gly Ser Tyr Ser Arg Asn Ser Lys Thr
370 375 380

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

Gln Leu Val Gln Gln Tyr Thr Pro Ser Asn Gly Ser Leu Ala Glu Gln
405 410 415

Tyr Asp Arg Asn Thr Ala Ala Pro Leu Ser Ala Asn Asp Leu Thr Trp
420 425 430

Ser Phe Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Gln Arg Arg Asp Ala Val Val
435 440 445

Pro Pro Ser Trp Gly Ala Lys Ser Ala Asn Lys Val Pro Thr Thr Cys
450 455 460

Ser Ala Ser Pro Val Val Gly Thr Tyr Lys Ala Pro Thr Ala Thr Phe
465 470 475 480

Ser Ser Lys Thr Lys Cys Val Pro Ala Lys Asp Ile Val Pro Ile Thr
485 490 495

Phe Tyr Leu Ile Glu Asn Thr Tyr Tyr Gly Glu Asn Val Phe Met Ser
500 505 510

Gly Asn Ile Thr Ala Leu Gly Asn Trp Asp Ala Lys Lys Gly Phe Pro
515 520 525

Leu Thr Ala Asn Leu Tyr Thr Gln Asp Gln Asn Leu Trp Phe Ala Ser
530 535 540

Val Glu Phe Ile Pro Ala Gly Thr Pro Phe Glu Tyr Lys Tyr Tyr Lys
545 550 555 560

Val Glu Pro Asn Gly Asp Ile Thr Trp Glu Lys Gly Pro Asn Arg Val
565 570 575

Phe Val Ala Pro Thr Gly Cys Pro Val Gln Pro His Ser Asn Asp Val
580 585 590

Trp Gln Phe
595

<210> 16

<211> 412
<212> PRT
<213> Pyrococcus furiosus

<220>
<221> misc_feature
<223> Pyrococcus furiosus protease

<400> 16

Ala Glu Leu Glu Gly Leu Asp Glu Ser Ala Ala Gln Val Met Ala Thr
1 5 10 15

Tyr Val Trp Asn Leu Gly Tyr Asp Gly Ser Gly Ile Thr Ile Gly Ile
20 25 30

Ile Asp Thr Gly Ile Asp Ala Ser His Pro Asp Leu Gln Gly Lys Val
35 40 45

Ile Gly Trp Val Asp Phe Val Asn Gly Arg Ser Tyr Pro Tyr Asp Asp
50 55 60

His Gly His Gly Thr His Val Ala Ser Ile Ala Ala Gly Thr Gly Ala
65 70 75 80

Ala Ser Asn Gly Lys Tyr Lys Gly Met Ala Pro Gly Ala Lys Leu Ala
85 90 95

Gly Ile Lys Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Ser Ile Ser Thr Ile
100 105 110

Ile Lys Gly Val Glu Trp Ala Val Asp Asn Lys Asp Lys Tyr Gly Ile
115 120 125

Lys Val Ile Asn Leu Ser Leu Gly Ser Ser Gln Ser Ser Asp Gly Thr
130 135 140

Asp Ala Leu Ser Gln Ala Val Asn Ala Ala Trp Asp Ala Gly Leu Val
145 150 155 160

Val Val Val Ala Ala Gly Asn Ser Gly Pro Asn Lys Tyr Thr Ile Gly
165 170 175

Ser Pro Ala Ala Ala Ser Lys Val Ile Thr Val Gly Ala Val Asp Lys
180 185 190

Tyr Asp Val Ile Thr Ser Phe Ser Ser Arg Gly Pro Thr Ala Asp Gly
195 200 205

Arg Leu Lys Pro Glu Val Val Ala Pro Gly Asn Trp Ile Ile Ala Ala
210 215 220

Arg Ala Ser Gly Thr Ser Met Gly Gln Pro Ile Asn Asp Tyr Tyr Thr
225 230 235 240

Ala Ala Pro Gly Thr Ser Met Ala Thr Pro His Val Ala Gly Ile Ala
245 250 255

Ala Leu Leu Leu Gln Ala His Pro Ser Trp Thr Pro Asp Lys Val Lys
260 265 270

Thr Ala Leu Ile Glu Thr Ala Asp Ile Val Lys Pro Asp Glu Ile Ala
275 280 285

Asp Ile Ala Tyr Gly Ala Gly Arg Val Asn Ala Tyr Lys Ala Ile Asn
290 295 300

Tyr Asp Asn Tyr Ala Lys Leu Val Phe Thr Gly Tyr Val Ala Asn Lys
305 310 315 320

Gly Ser Gln Thr His Gln Phe Val Ile Ser Gly Ala Ser Phe Val Thr
325 330 335

Ala Thr Leu Tyr Trp Asp Asn Ala Asn Ser Asp Leu Asp Leu Tyr Leu
340 345 350

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

Gly Phe Glu Lys Val Gly Tyr Tyr Asn Pro Thr Asp Gly Thr Trp Thr
370 375 380

Ile Lys Val Val Ser Tyr Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Gln Val Asp Val
385 390 395 400

Val Ser Asp Gly Ser Leu Ser Gln Pro Gly Ser Ser
405 410

REIVINDICACIONES

1. Proceso para producir un producto de fermentación que incluye las etapas de:
(a) licuefacción de un material que contiene almidón a una temperatura en el rango de 70-80 °C usando:
- la alfa-amilasa bacteriana con al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 1;
- la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo con al menos un 60 % de identidad con la SEC ID N.º: 14;
- la glucoamilasa con al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 9 y que además tiene una termoestabilidad a 70 °C, pH 5,3, de al menos un 70 %;
(b) sacarificación utilizando una enzima generadora de fuente de carbohidratos;
(c) fermentación utilizando un organismo fermentador.

2. Proceso, según la reivindicación 1, donde el producto de fermentación es un alcohol.

3. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo es una variante de alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD, y es además una o varias de las siguientes sustituciones: G128D, D143N, K192R (usando la SEC ID N.º: 14 de aquí para la numeración).

4. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la glucoamilasa tiene una termoestabilidad a 70 °C, pH 5,3, de al menos 75 %.

5. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la glucoamilasa tiene una actividad relativa a un pH 4,5 de al menos 80 %.

6. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la glucoamilasa tiene una estabilidad a un pH 4,5 de al menos 80 %.

7. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la glucoamilasa es una variante de una glucoamilasa derivada de una cepa de *Penicillium oxalicum* descrita como la SEC ID N.º: 9 con una sustitución K79V.

8. Proceso, según la reivindicación 7, donde la glucoamilasa tiene al menos un 85 % de identidad con el polipéptido maduro mostrado en la SEC ID N.º: 9 de aquí.

9. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde además una proteasa está presente o se añade durante la licuefacción.

10. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde además una pululanasa está presente durante la licuefacción y/o sacarificación.

11. Composición que comprende
- la alfa-amilasa bacteriana con al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 1;
- la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo con al menos un 60 % de identidad con la SEC ID N.º: 14;
- la glucoamilasa con al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 9 y que además tiene una termoestabilidad a 70 °C, pH 5,3, de al menos un 70 %.

12. Composición, según la reivindicación 11, donde la alfa-amilasa se deriva de una cepa de *Bacillus stearothermophilus* con la secuencia mostrada en la SEC ID N.º: 1 de aquí.

13. Composición, según la reivindicación 11 o 12, donde la alfa-amilasa que hidroliza almidón crudo es una variante de alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y dominio de unión al almidón y además una o varias de las siguientes sustituciones: G128D, D143N, K192R (usando la SEC ID N.º: 14 de aquí para la numeración).

14. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 11-13, donde la glucoamilasa es una glucoamilasa con una termoestabilidad a 70 °C, pH 5,3, de al menos 75 %.

15. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 11-14, donde la glucoamilasa tiene una actividad relativa a un pH 4,5 de al menos 80 %.

16. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 11-15, donde la glucoamilasa tiene una estabilidad de pH a un pH 4,5 de al menos 80 %.
17. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 11-16, donde la glucoamilasa se deriva de una cepa de *Penicillium oxalicum* descrita como la SEC ID N.º: 9 de aquí o una variante de la misma con una substitution K79V.

18. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 11-17, donde la glucoamilasa tiene al menos un 85 % de identidad con el polipéptido maduro mostrado en la SEC ID N.º: 9 de aquí.

19. Composición, según cualquiera de las reivindicaciones 11-18, que comprende además una proteasa y/o una pululanasa.

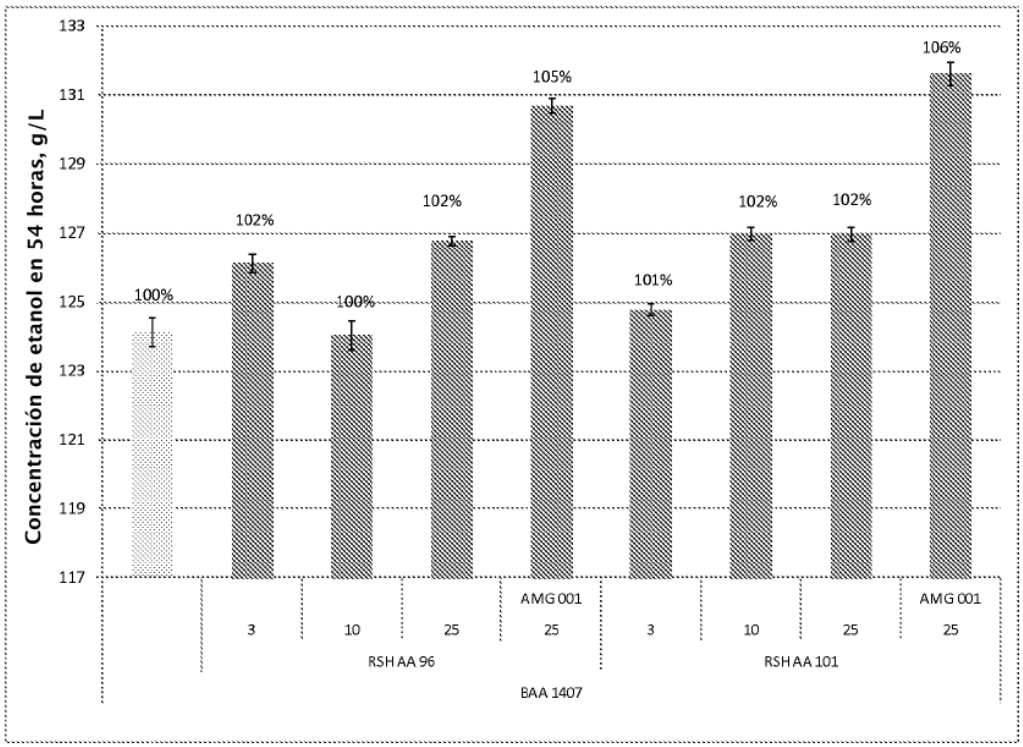
Concentración de etanol en 54 horas, g/L
133
131
129
127
125
123
121
119
117
100%
102%
100%
102%
105%
101%
102%
102%
106%
3
10
25
AMG 001
25
3
10
25
AMG 001
25
RSH AA 96
RSH AA 101
BAA 1407

Fig. 1