

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 216**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)

C12N 9/28 (2006.01)

C12N 9/34 (2006.01)

C12N 9/42 (2006.01)

C07K 14/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2011 PCT/US2011/030465**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2011 WO11123505**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2011 E 11713426 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2553110**

54 Título: **Procesos de producción de un producto de fermentación**

30 Prioridad:

30.03.2010 US 318787 P

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

05.10.2017

73 Titular/es:

**NOVOZYMES NORTH AMERICA, INC. (100.0%)
77 Perry Chapel Church Road
Franklinton, North Carolina 27525, US**

72 Inventor/es:

**SOONG, CHEE-LEONG y
SAUNDERS, JEREMY**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 636 216 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procesos de producción de un producto de fermentación

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a procesos de producción de un producto de fermentación de material vegetal usando uno o más organismos fermentadores.

10 Antecedentes de la invención

[0002] Un número grande de productos comerciales que son difíciles de producir sintéticamente hoy se ha producido por organismos fermentadores.

15 Tales productos incluyen alcoholes (por ejemplo, butanol, etanol, metanol, 1,3-propanediol) ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, gluconato, ácido glucónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido succínico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico); cetonas (por ejemplo, de acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H₂ y CO₂) y compuestos más complejos, incluyendo, por ejemplo, antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B12, beta-caroteno); y hormonas.

20 La fermentación también se usa comúnmente en el alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), productos lácteos (por ejemplo, en la producción de yogur y queso), cuero e industrias de tabaco.

[0003] Un número grande de procesos de producción de productos de fermentación, tal como etanol, por fermentación de azúcares proporcionados por degradación de materiales que contienen almidón se conoce en la técnica. Por ejemplo, la WO2004/080923 describe un proceso para la producción de un producto alcohólico de almidón granulado que comprende la sacarificación simultánea y fermentación con una composición enzimática que consiste en alfa-amilasa ácida, glucoamilasa, celulasa y xilanasas, y con levadura a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial del almidón granulado.

25 Sin embargo, la producción de productos de fermentación, tal como etanol, de tales materiales de planta sigue siendo demasiado costosa.

30 Por lo tanto, hay una necesidad de proporcionar procesos que pueden aumentar el rendimiento del producto de fermentación y así reducir los costes de producción. Los polipéptidos glicosil hidrolasa de la familia 61 (GH61) se han mostrado para mejorar la actividad de celulasas en sustratos lignocelulósicos (Merino and Cherry, 2007, Adv. Biochem. Engin. /Biotechnol. 108: 95-120).

35 Es un objeto de la presente invención proporcionar un proceso mejorado para producir un producto de fermentación.

Resumen de la invención

[0004] La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de un producto de fermentación, que comprende la conversión de un material que contiene almidón a una dextrina con una alfa-amilasa; la sacarificación de la dextrina a un azúcar con una glucoamilasa; y fermentación del azúcar utilizando un organismo de fermentación en presencia de un polipéptido GH61 en un paso único a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial del material que contiene almidón, donde el polipéptido GH61 está presente en una cantidad que resulta en una cantidad superior del producto de fermentación que la cantidad de fermentación producida por el mismo proceso sin el polipéptido GH61, donde el polipéptido familia glicosil hidrolasa 61 comprende los aspectos siguientes: [ILMV]-P-X(4,5)-G-X-i-[ILMV]-X-R-X-[EQ]-X(4)-[HNQ] y [FW]-[TF]-K-[AIV], donde X es cualquier aminoácido, X(4,5) es cualquier cuatro o cinco aminoácidos contiguos y X(4) es cualquier cuatro aminoácidos contiguos.

45 Aquí también se describe una composición que comprende (a) un polipéptido GH61, (b) una glucoamilasa y (c) una alfa-amilasa.

50 Descripción detallada de la invención

Definiciones

55 [0005] Alfa-amilasa (alfa-1,4-glucan-4-glucanohidrolasas, EC 3,2,1,1) es una enzima, que cataliza la hidrólisis de almidón y otros oligo y polisacáridos lineales y ramificados 1,4-glucosídicos.

[0006] Fragmento: el término "fragmento" significa un polipéptido con uno o más (diferentes) aminoácidos eliminados del amino y/o carboxilo terminal de un polipéptido maduro; donde el fragmento tiene actividad enzimática.

60 [0007] Polipéptido GH61: el término "polipéptido GH61" significa un polipéptido que forma parte de la familia glicosil hidrolasa 61 según Henrissat, 1991, una clasificación de glicosil hidrolasa basada en similitudes de secuencia aminoácida, Biochem. J. 280: 309-316, y Henrissat y Bairoch, 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, Biochem. J. 316: 695-696.

65

[0008] Glucoamilasa (glucano 1,4- α -glucosidasa, EC 3,2,1,3) es una enzima, que cataliza la hidrólisis de terminal (1 \rightarrow 4) -vinculada α -D-residuos de glucosa sucesivamente de extremidades no-reducidas de las cadenas con liberación de β -D-glucosa.

5 [0009] Aislado: los términos "aislado" y "purificado" significan un polipéptido o polinucleótido que se remueve de un mínimo de un componente con el cual está asociado naturalmente.

Por ejemplo, una variante puede ser al menos 1% pura, por ejemplo, al menos 5% pura, al menos 10% pura, al menos 20% pura, al menos 40% pura, al menos 60% pura, al menos 80% pura y al menos 90% pura, como se ha determinado por SDS-PAGE y un polinucleótido puede ser al menos 1% puro, por ejemplo, al menos 5% puro, al menos 10% puro, al menos 20% puro, al menos 40% puro, al menos 60% puro, al menos 80% puro, al menos 90% puro y al menos 95% puro, como se ha determinado por electroforesis de agarosa.

10 [0010] Polipéptido maduro: el término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final seguida de traducción y cualquier modificación postraducciona, tal como tratamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación, etc.

[0011] Enzima original: el término "progenitor" significa una enzima para la que se realiza una alteración para producir una variante.

El progenitor puede ser un polipéptido (tipo salvaje) de origen natural o una variante del mismo.

20 [0012] Identidad de secuencia: la relación entre dos secuencias de aminoácido o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad de secuencia".

[0013] Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) como se ha implementado en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior.

25 Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0.5 y el EBLOSUM62 (versión de EMBOSS de BLOSUM62) matriz de sustitución.

30 El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

(Residuos idénticos x 100)/(longitud de alineamiento-número total de espacios en alineamiento)

35 [0014] Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias desoxirribonucleótidas se determina utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, supra) como se ha implementado en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), preferiblemente versión 3.0.0 o posterior.

40 Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0.5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión de EMBOSS de NCBI NUC4.4).

El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y se calcula de la siguiente manera:

45
$$\frac{\text{Deoxirribonucleótidos idénticos} \times 100}{\text{longitud de alineamiento} - \text{número total de espacios en alineamiento}}$$

[0015] Variante: el término "variante" significa un polipéptido que incluye una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o deleción, en una o más (varias) posiciones.

50 Una sustitución implica un remplazo de un aminoácido que ocupa una posición con un aminoácido diferente; una deleción significa la eliminación de un aminoácido que ocupa una posición; y un medio de inserción que añade 1-5 aminoácidos adyacentes a un aminoácido que ocupa una posición.

[0016] Enzima tipo salvaje: el término "tipo salvaje" significa una enzima expresada por un microorganismo de origen natural, tal como una bacteria, levadura u hongo filamentoso encontrado en la naturaleza.

55 Procesos para producir productos de fermentación de materiales que contienen almidón no gelatinizado.

[0017] La presente invención se refiere a un procedimiento para producir un producto de fermentación de un material que contiene almidón sin gelatinización (frecuentemente referido como "sin cocinar") del material que contiene almidón.

60 En una forma de realización, el proceso incluye la sacarificación del material que contiene almidón (por ejemplo; molido) por debajo de la temperatura de gelatinización inicial, preferiblemente en presencia de una alfa-amilasa y/o una enzima(s) generadora de fuente de carbohidratos (enzima(s) de sacarificación) para producir azúcares que se pueden fermentar en el producto de fermentación por un organismo fermentador, donde el polipéptido GH61 está

presente en una cantidad que resulta en una cantidad superior del producto de fermentación que la cantidad de la fermentación producida por el mismo proceso sin el polipéptido GH61, donde el polipéptido de familia glicósido hidrolasa 61 comprende los aspectos siguientes: [ILMV]-P-X(4,5)-G-X-i-[ILMV]-X-R-X-[EQ]-X(4)-[HNQ] y [FW]-[TF]-K-[AIV], donde X es cualquier aminoácido, X(4,5) es cualquier cuatro o cinco aminoácidos contiguos y X(4) es cualquier cuatro aminoácidos contiguos.

[0018] Por consiguiente, este aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de producción de un producto de fermentación, que comprende la conversión de un material que contiene almidón a una dextrina con una alfa-amilasa; sacarificación de la dextrina a un azúcar con una glucoamilasa; y fermentación del azúcar utilizando un organismo de fermentación en presencia de un polipéptido GH61 en un paso único a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial del material que contiene almidón, donde el polipéptido de glicósido hidrolasa de la familia 61 comprende los aspectos siguientes: [ILMV]-P-X(4,5)-G-X-i-[ILMV]-X-R-X-[EQ]-X(4)-[HNQ] y [FW]-[TF]-K-[AIV], donde X es cualquier aminoácido, X(4,5) es cualquier cuatro o cinco aminoácidos contiguos y X(4) es cualquier cuatro aminoácidos contiguos.

[0019] El término "temperatura de gelatinización inicial" significa la temperatura mínima en la que comienza la gelatinización de almidón.

En general, el almidón calentado en agua empieza a gelatinizar entre 50 °C y 75 °C; la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón específico y puede prontamente ser determinado por el experto en la materia.

Así, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según las especies de planta, a la variedad particular de las especies de planta al igual que con las condiciones de crecimiento.

La temperatura de gelatinización inicial de un material que contiene almidón dado se puede determinar como la temperatura a la que la birrefringencia se pierde en 5% de los gránulos de almidón utilizando el método descrito por Gorinstein y Lii, 1992, Starch/Stärke 44(12): 461-466.

[0020] El proceso de la presente invención puede comprender además la recuperación del producto de fermentación, por ejemplo, por destilación.

[0021] El material que contiene almidón puede ser un lodo, tal como almidón granulado, con 10-55 peso. % sólidos secos (DS), preferiblemente 25-45 peso. % sólidos secos, más preferiblemente 30-40 peso. % sólidos secos de material que contiene almidón pueden ser preparados.

El lodo puede incluir agua y/o aguas de proceso, tal como vinaza (destilación), agua de depuradora, evaporador condensado o destilado, agua de decapante de destilación o agua de proceso de otras plantas de producto de fermentación.

Debido a que el proceso se realiza por debajo de la temperatura de gelatinización inicial y así no tiene lugar ningún aumento de viscosidad significativo, niveles altos de vinaza se pueden utilizar si se desea.

En una forma de realización, el lodo acuoso contiene de 1 a 70 vol. %, preferiblemente 15-60 vol. %, especialmente de 30 a 50 vol. % agua y/o aguas de proceso, tal como vinaza (destilación), agua de depuradora, condensado de evaporador o destilado, agua de decapante de destilación o agua de proceso de otras plantas de producto de fermentación o combinaciones de las mismas o similar.

[0022] El material que contiene almidón se puede preparar reduciendo el tamaño de partícula, preferiblemente por molienda en húmedo o en seco, para 0.05-3.0 mm, preferiblemente 0.1-0.5 mm.

Después de ser sometido a un proceso de la invención al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, 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% del almidón en el material que contiene almidón se convierte en un almidón soluble hidrolizado.

[0023] El proceso de este aspecto de la invención se conduce a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial, por ejemplo, una temperatura en el rango entre 25-40°C, tal como 25-40°C, 29- 35°C, 30- 34°C, tal como alrededor de 32°C.

Un experto en la técnica puede fácilmente determinar las condiciones del proceso adecuadas.

[0024] El proceso de la invención se puede realizar a un pH de 3 y 7, por ejemplo, 3.5 a 6 o pH 4 a 5.

[0025] En una forma de realización, el proceso se realiza de modo que el nivel de azúcar, tal como nivel de glucosa, se mantiene a un nivel bajo, tal como debajo de 6 peso. %, debajo de 3 peso. %, debajo de 2 peso.%, debajo de 1 peso. %, debajo de 0.5 peso. %, debajo de 0.25% peso. %, o debajo de 0.1 peso. %.

Tales bajos niveles de azúcar se pueden realizar sencillamente utilizando cantidades ajustadas de enzima y organismo fermentador.

Una persona experta en la técnica puede fácilmente determinar qué dosis/cantidades de enzima y organismo fermentador usar.

Las cantidades empleadas de enzima y organismo fermentador también se pueden seleccionar para mantener bajas concentraciones de maltosa en el caldo de fermentación.

Por ejemplo, el nivel de maltosa se puede mantener debajo de 0.5 peso. %, tal como debajo de 0.2 peso. %.

Materiales que contienen almidón

[0026] Cualquier materia prima que contiene almidón adecuado se puede utilizar en un proceso de la presente invención.

5 La materia prima se selecciona generalmente basándose en el producto de fermentación deseado. Los ejemplos de materias primas que contienen almidón, adecuados para usar en los procesos de la presente invención, incluyen cebada, alubias, mandioca, cereales, maíz, sorgo, guisantes, patatas, arroz, centeno, sagú, sorgo, patatas dulces, tapioca, trigo y granos enteros o cualquier mezcla de los mismos. El material que contiene almidón también puede ser un tipo ceroso o no ceroso de maíz y cebada.

10 Productos de fermentación

[0027] El término "producto de fermentación" significa un producto producido por un proceso que incluye la fermentación utilizando un organismo fermentador.

15 Los productos de fermentación 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, de acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H₂ y CO₂) antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B₁₂, beta-caroteno); y hormonas.

20 En una forma de realización preferida, el producto de fermentación es etanol, por ejemplo, etanol combustible; etanol potable, es decir, bebidas espirituosas 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.

25 Tipos de cerveza preferidos comprenden cerveza inglesa de malta, cerveza negra, portador cerveza rubia, amarga, soluciones de malta, cerveza happoushu, cerveza de alta en alcohol, cerveza baja en alcohol, cerveza baja en calorías o cerveza ligera.

Organismos fermentadores

30 [0028] El término "organismo fermentador" se refiere a cualquier organismo, incluyendo organismos bacterianos y fúngicos, tal como levadura y hongos filamentosos, adecuados para producir un producto de fermentación deseado. Organismos fermentadores adecuados según la invención son capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares fermentables, tal como arabinosa, fructosa, glucosa, maltosa, manosa o xilosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado.

35 [0029] Los ejemplos de organismos fermentadores incluyen organismos fúngicos tales como levadura. Levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces*, en particular *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces uvarum*; cepas de *Pichia*, en particular, *Pichia stipitis* tal como *Pichia stipitis* CBS 5773 o *Pichia pastoris*; cepas de *Candida*, en particular, *Candida arabinofermentans*, *Candida boidinii*, *Candida diddensii*, *Candida shehatae*, *Candida sonorensis*, *Candida tropicalis* o *Candida utilis*.

40 Otros organismos fermentadores incluyen cepas de *Hansenula*, en particular, *Hansenula anomala* o polimorfa de *Hansenula*; cepas de *Kluyveromyces*, en particular *Kluyveromyces fragilis* o *Kluyveromyces marxianus*; y cepas de *Schizosaccharomyces*, en particular *Schizosaccharomyces pombe*.

45 [0030] Los organismos fermentadores bacterianos preferidos incluyen cepas de *Escherichia*, en particular, *Escherichia coli*, cepas de *Zymomonas*, en particular *Zymomonas mobilis*, cepas de *Zymobacter*, en particular *Zymobacter palmae*, cepas de *Klebsiella* en particular *Klebsiella oxytoca*, cepas de *Leuconostoc*, en particular *Leuconostoc mesenteroides*, cepas de *Clostridium*, en particular *Clostridium butyricum*, cepas de *Enterobacter*, en particular *Enterobacter aerogenes* y cepas de *Thermoanaerobacter*, en particular *Thermoanaerobacter* BG1L1 (Appl. Microbiol. Biotecnología. 77: 61-86), *Thermoanaerobacter ethanolicus*, *Thermoanaerobacter mathranii* o *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum*.

50 Cepas de *Lactobacillus* están también previstas como son las cepas de *Corynebacterium glutamicum* R, *Bacillus thermoglucosidans* y *Geobacillus thermoglucosidans*.

55 [0031] En una forma de realización, el organismo fermentador es un organismo fermentador de azúcar C6, tal como una cepa de, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*.

[0032] En una forma de realización, el organismo fermentador se añade al medio de fermentación de modo que el organismo fermentador viable, tal como levadura, cuenta por mL de medio de fermentación en el rango de 10⁵ a 10¹², preferiblemente de 10⁷ a 10¹⁰, especialmente aproximadamente 5x10⁷.

60 [0033] La levadura es el organismo fermentador preferido para fermentación de etanol. Preferidas son las cepas de *Saccharomyces*, especialmente cepas de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, preferiblemente, cepas que son resistentes hacia niveles altos de etanol, es decir, hasta, por ejemplo, 10, 12, 15 o 20 vol. % o más etanol.

65

5 [0034] La levadura disponible comercialmente incluye LNF SA-1, LNF BG-1, LNF PE-2, y LNF CAT-1 (disponible de Brazil LNF), RED STAR™ y levadura ETHANOL RED™ (disponible de Fermentis/Lesaffre, EE.UU), FALI (disponible de Fleischmann's yeast, EE.UU), SUPERSTART y levadura fresca THERMOSACC™ (disponible de Ethanol Technology, WI, EE.UU), BIOFERM AFT y XR (disponible de NABC - North American Bioproducta Corporation, GA, USA), GERT STRANS (disponible de GERT Strand AB, Sweden) y FERMIOL (disponible de DSM especialidades).

10 [0035] Según la invención, el organismo fermentador capaz de producir un producto de fermentación deseado de azúcares fermentables preferiblemente crece bajo condiciones precisas a un índice de crecimiento particular. Cuando el organismo fermentador es introducido en/añadido al medio de fermentación, el organismo fermentador inoculado pasa por un número de etapas.

Inicialmente el crecimiento no se produce. Este periodo se refiere como la "fase de latencia" y se puede considerar un periodo de adaptación.

Durante la fase siguiente referida como la "fase exponencial", el índice de crecimiento aumenta gradualmente.

15 Después de un periodo de crecimiento máximo, el índice cesa y el organismo fermentador entra en "fase estacionaria".

Después de otro periodo de tiempo, el organismo fermentador entra la "fase de muerte" donde el número de células viables desciende.

20 Fermentación

[0036] Se determinan las condiciones de fermentación basadas en, por ejemplo, la especie de material vegetal, los azúcares fermentables disponibles, el organismo(s) de fermentación y/o el producto de fermentación deseado.

Un experto en la técnica puede fácilmente determinar condiciones de fermentación adecuadas.

La fermentación según la invención puede realizarse en condiciones usadas de forma convencional.

25 Los procesos de fermentación preferidos son procesos anaeróbicos.

[0037] Por ejemplo, las fermentaciones se pueden realizar a temperaturas tan altas como 75°C, por ejemplo, entre 40-70°C, tal como entre 50-60°C.

30 Sin embargo, también se conocen las bacterias con una temperatura inferior significativamente óptima hasta alrededor de temperatura ambiente (alrededor de 20°C).

Ejemplos de organismos fermentadores adecuados se pueden encontrar en "organismos de fermentación" de la sección de arriba.

35 [0038] Para la producción de etanol usando levadura, la fermentación puede seguir durante 24 a 96 horas, en particular durante 35 a 60 horas.

En una forma de realización, la fermentación se realiza a una temperatura entre 20 a 40°C, preferiblemente 26 a 34°C, en particular, alrededor de 32°C.

En una forma de realización, el pH es de pH 3 a 6, preferiblemente, alrededor de pH 4 a 5.

40 [0039] Otros productos de fermentación se pueden fermentar a temperaturas conocidas por la persona experta en la técnica por ser adecuadas para el organismo fermentador en cuestión.

[0040] La fermentación típicamente se realiza a un pH en el rango entre 3 y 7, preferiblemente de pH 3.5 a 6, tal como alrededor de pH 5.

45 Las fermentaciones están en curso típicamente durante 6-96 horas.

[0041] Los procesos de la invención se pueden realizar como un lote o como un proceso continuo.

50 Las fermentaciones se pueden conducir en un sistema de ultrafiltración donde el retenido se sujeta bajo recirculación en presencia de sólidos, agua y el organismo fermentador, y donde el permeato es el producto de fermentación deseado que contiene líquido.

Contemplados igualmente son procesos conducidos en los reactores de membrana continua con membranas de ultrafiltración y donde el retenido se sujeta bajo recirculación en la presencia de sólidos, agua y el organismo(s) de fermentación, y donde el permeato es el producto de fermentación que contiene líquido.

55 [0042] Después de la fermentación, el organismo fermentador se puede separar del lodo fermentado y reciclar.

Medio de fermentación

60 [0043] La frase "fermentación media" o "medio de fermentación" se refiere al ambiente donde se realiza la fermentación y comprende el sustrato de fermentación, que es, la fuente de carbohidrato que se metaboliza por el organismo(s) de fermentación.

[0044] El medio de fermentación puede comprender otros nutrientes y estimulador(es) de crecimiento para el organismo(s) de fermentación.

El nutriente y estimuladores de crecimiento son muy usados en la técnica de fermentación e incluyen fuentes de nitrógeno, tales como amoníaco; vitaminas y minerales o combinaciones de los mismos.

Recuperación

5 [0045] Después de la fermentación, el producto de fermentación se puede separar del medio de fermentación. El medio de fermentación se puede destilar para extraer el producto de fermentación deseado o el producto de fermentación deseado se puede extraer del medio de fermentación por técnicas de micro o filtración de membrana. Alternativamente, el producto de fermentación se puede recuperar por desorción.
10 Métodos para recuperación se conocen en la técnica.

Enzimas

15 [0046] La enzima(s) descrita abajo se debe(n) usar en una "cantidad efectiva" en los procesos de la presente invención.

Polipéptidos GH61

20 [0047] En los procesos descritos aquí, cualquier polipéptido GH61 se puede usar.

[0048] En un primer aspecto de la invención, el polipéptido GH61 comprende los motivos siguientes:

[ILMV]-P-X(4,5)-G-X-Y-[ILMV]-X-R-X-[EQ]-X(4)-[HNQ] y [FW]-[TF]-K-[AIV],

25 donde X es cualquier aminoácido, X(4,5) es cualquier cuatro o cinco aminoácidos contiguos y X(4) es cualquier cuatro aminoácidos contiguos.

[0049] El polipéptido GH61 que comprende los aspectos mencionados anteriormente puede comprender además:

30 H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV],

[EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV], o

35 H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV] y [EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV],

donde X es cualquier aminoácido, X(1,2) es cualquier uno o dos aminoácidos contiguos, X(3) es cualquier tres aminoácidos contiguos y X(2) es cualquier dos aminoácidos contiguos.

[0050] En un aspecto preferido, el polipéptido GH61 comprende además H-X(1,2)-G-P-X(3)-[iW]-[AILMV].

40 En otro aspecto preferido, el polipéptido GH61 comprende además [EQ]-X-i-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV].

En otro aspecto preferido, el polipéptido GH61 comprende además H-X(1,2)-G-P-X(3)-[iW]-[AILMV] y [EQ]-X-i-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV].

[0051] En un segundo aspecto, el polipéptido GH61 comprende el motivo siguiente:

45 [ILMV]-P-x(4,5)-G-x-Y-[ILMV]-x-R-x-[EQ]-x(3)-A-[HNQ],

donde x es cualquier aminoácido, x (4,5) es cualquier 4 o 5 aminoácidos contiguos y x(3) es cualquier 3 aminoácido contiguo.

50 En el motivo anterior, se emplea la abreviatura de aminoácido de una sola letra IUPAC aceptada.

[0052] En un tercer aspecto, el polipéptido GH61 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad con el polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1 (*Thielavia terrestris*), SEQ ID N.º: 2 (*Thielavia terrestris*), SEQ ID N.º: 3 (*Thielavia terrestris*), SEQ ID N.º: 4 (*Thielavia terrestris*), SEQ ID N.º: 5 (*Thielavia terrestris*), SEQ ID N.º: 6 (*Thielavia terrestris*), SEQ ID N.º: 7 (*Thermoascus aurantiacus*), SEQ ID N.º: 8 (*Trichoderma reesei*), SEQ ID N.º: 9 (*Myceliophthora thermophila*), SEQ ID N.º: 10 (*Myceliophthora thermophila*), SEQ ID N.º: 11 (*Myceliophthora thermophila*), SEQ ID N.º: 12 (*Myceliophthora thermophila*), SEQ ID N.º: 13 (*Myceliophthora thermophila*), SEQ ID N.º: 14 (*Thermoascus aurantiacus*), SEQ ID N.º: 15 (*Aspergillus fumigatus*), SEQ ID N.º: 16 (*Penicillium pinophilum*), SEQ ID N.º: 17 (*Thermoascus sp.*), SEQ ID N.º: 18 (*Penicillium sp.*), SEQ ID N.º: 19 (*Thielavia terrestris*), SEQ ID N.º: 20 (*Thielavia terrestris*), SEQ ID N.º: 21 (*Thielavia terrestris*), SEQ ID N.º: 22 (*Thielavia terrestris*), SEQ ID N.º: 23 (*Thielavia terrestris*), SEQ ID N.º: 24 (*Thielavia terrestris*), SEQ ID N.º: 25 (*Thielavia terrestris*), SEQ ID N.º: 26 (*Thielavia terrestris*), SEQ ID N.º: 27 (*Thielavia terrestris*), SEQ ID N.º: 28 (*Thielavia terrestris*), SEQ ID N.º: 29

(*Thielavia terrestris*), SEQ ID N.º: 30 (*Thermoascus crustaceus*), SEQ ID N.º: 31 (*Thermoascus crustaceus*) o SEQ ID N.º: 32 (*Thermoascus crustaceus*) de al menos 60%, por ejemplo, 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% o al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o al menos 100%.

5 [0053] En un sexto aspecto, el polipéptido GH61 es una variante artificial que comprende una sustitución, delección, y/o inserción de uno o más (o diferentes) aminoácidos del polipéptido maduro de la SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 2, SEQ ID N.º: 3, SEQ ID N.º: 4, SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, SEQ ID N.º: 7, SEQ ID N.º: 8, SEQ ID N.º: 9, SEQ ID N.º: 10, SEQ ID N.º: 11, SEQ ID N.º: 12, SEQ ID N.º: 13, SEQ ID N.º: 14, SEQ ID N.º: 15, SEQ ID N.º: 16, SEQ ID N.º: 17, SEQ ID N.º: 18, SEQ ID N.º: 19, SEQ ID N.º: 20, SEQ ID N.º: 21, SEQ ID N.º: 22, SEQ ID N.º: 23, SEQ ID N.º: 24, SEQ ID N.º: 25, SEQ ID N.º: 26, SEQ ID N.º: 27, SEQ ID N.º: 28, SEQ ID N.º: 29, SEQ ID N.º: 30, SEQ ID N.º: 31 o SEQ ID N.º: 32; o una secuencia homóloga de la misma.

15 [0054] Preferiblemente, los cambios aminoácidos son de una naturaleza menor, esto es sustituciones de aminoácidos conservadoras o inserciones que significativamente no afectan al plegado y/o actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de uno a aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino o carboxiloterminales, tal como un residuo de metionina aminoterminales; un péptido enlazador pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación por la carga de red de cambio u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

20 [0055] Ejemplos de sustituciones conservadoras son en el grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina).

25 Sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y son descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en, *The Proteins*, Academic Press, New York. Los intercambios más frecuentes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

30 [0056] Alternativamente, los cambios aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físico químicas de los polipéptidos se alteran. Por ejemplo, los cambios aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo y similar.

35 [0057] Los aminoácidos esenciales en un polipéptido progenitor se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tal como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham and Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085).

40 En la técnica anterior, las mutaciones de alanina únicas se introducen en cada residuo en la molécula y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para una actividad de mejora celulolítica para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula.

Ver también, Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708.

45 El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica puede también ser determinado por análisis físico de estructura, como se ha determinado por tales técnicas como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativo.

Ver, por ejemplo, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64.

Las identidades de aminoácidos esenciales también pueden ser inferidas de análisis de identidades con polipéptidos que se relacionan con el polipéptido progenitor.

50 [0058] Las sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples, delecciones y/o inserciones se pueden hacer y evaluar usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o redistribución, seguidos de un procedimiento de selección pertinente, tal como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU* 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625.

55 Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, *Biochemistry* 30: 10832-10837; patente EEUU nº 5,223,409; WO 92/06204) y mutagénesis dirigida por región (Derbyshire et al., 1986, *Gene* 46: 145; Ner et al., 1988, *DNA* 7: 127).

60 [0059] Métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con alto rendimiento, métodos de selección automatizados para detectar la actividad de polipéptidos mutagenizados clonados expresados por células huésped (Ness et al., 1999, *Biotechnology* 17: 893-896).

Moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

65 [0060] El número total de sustituciones de aminoácidos, delecciones y/o inserciones del polipéptido GH61 maduro de la SEQ ID N.º: 1, SEQ ID N.º: 2, SEQ ID N.º: 3, SEQ ID N.º: 4, SEQ ID N.º: 5, SEQ ID N.º: 6, SEQ ID N.º: 7, SEQ ID

N.º: 8, SEQ ID N.º: 9, SEQ ID N.º: 10, SEQ ID N.º: 11, SEQ ID N.º: 12, SEQ ID N.º: 13, SEQ ID N.º: 14, SEQ ID N.º: 15, SEQ ID N.º: 16, SEQ ID N.º: 17, SEQ ID N.º: 18, SEQ ID N.º: 19, SEQ ID N.º: 20, SEQ ID N.º: 21, SEQ ID N.º: 22, SEQ ID N.º: 23, SEQ ID N.º: 24, SEQ ID N.º: 25, SEQ ID N.º: 26, SEQ ID N.º: 27, SEQ ID N.º: 28, SEQ ID N.º: 29, SEQ ID N.º: 30, SEQ ID N.º: 31 o SEQ ID N.º: 32 no es más de 4, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4.

5 [0061] En un aspecto, el polipéptido GH61 se usa en presencia de un catión metálico bivalente de activación soluble descrito en la WO 2008/151043, por ejemplo, sulfato de manganeso.

10 [0062] En un aspecto, el polipéptido GH61 se usa en presencia de un compuesto dioxi, un compuesto bicíclico, un compuesto heterocíclico, un compuesto que contiene nitrógeno o un compuesto con sulfuro.

[0063] El compuesto dioxi puede incluir cualquier compuesto adecuado con dos o más átomos de oxígeno. En algunos aspectos, los compuestos dioxi contienen una fracción de arilo sustituido como se describe en este caso. Los compuestos dioxi pueden comprender uno o más (varios) hidroxilo y/o derivados hidroxilo, pero también incluyen

15 fracciones de arilo sustituido que carecen de hidroxilo y derivados de hidroxilo. Ejemplos no limitativos de compuestos dioxi incluyen pirocatecol o catecol; ácido cafeico; ácido 3,4-dihidroxibenzoico; 4-tert-butil-5-metoxi-1,2-benzenediol; pirogalol; ácido gálico; metil-3,4,5-trihidroxibenzoato; 2,3,4-trihidroxibenzofenona; 2,6-dimetoxifenol; ácido sinapínico; ácido 3,5-dihidroxibenzoico; 4-chloro-1,2-benzenediol; 4-nitro-1,2-benzenediol; ácido tánico; galato etilo; glicolato de metilo; ácido dihidroxifumárico; 2-butino-1,4-diol; (ácido crocónico; 1,3-propanodiol; ácido tartárico; 2,4-pentanediol; 3-etioxi-1,2-propanediol; 2,4,4'-trihidroxibenzofenona; cis-2-buteno-1,4-diol; 3,4-dihidroxy-3-cyclobuteno-1,2-dione; dihidroxiacetona; acroleína acetálica; metil-4-hidroxibenzoato; ácido 4-hidroxibenzoico; y metil-3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoato; o una sal o solvato de los mismos.

25 [0064] El compuesto bicíclico puede incluir cualquier sistema anular fusionado sustituido adecuado como se describe en este caso.

Los compuestos pueden comprender uno o más (varios) anillos adicionales y no se limitan a un número específico de anillos a menos que se haya dicho de otro modo.

En un aspecto, el compuesto bicíclico es un flavonoide.

En otro aspecto, el compuesto bicíclico es un isoflavonoide sustituido opcionalmente.

30 En otro aspecto, el compuesto bicíclico es un ión de flavilio sustituido opcionalmente, tal como una antocianidina sustituida opcionalmente o antocianina sustituida opcionalmente o derivado.

Ejemplos no limitativos de compuestos bicíclicos incluyen epicatequina; quercetina; miricetina; taxifolina; kaempferol; morin; acacetina; naringenina; isoramnetina; apigenina; cianidina; cianina; kuromanina; (keracianina; o una sal o solvato de los mismos.

35 [0065] El compuesto heterocíclico puede ser cualquier compuesto adecuado, tal como un anillo aromático sustituido opcionalmente o no-aromático que comprende un heteroátomo, como se describe en este caso.

En un aspecto, el heterocíclico es un compuesto que incluye una fracción de heterocicloalquilo sustituida opcionalmente o una fracción de heteroarilo sustituida opcionalmente.

40 En otro aspecto, la fracción de heterocicloalquilo sustituido opcionalmente o fracción de heteroarilo sustituido opcionalmente es un heterocicloalquilo dividido en 5 miembros sustituido opcionalmente o una fracción de heteroarilo dividido en 5 miembros sustituido opcionalmente.

En otro aspecto, el heterocicloalquilo sustituido opcionalmente o fracción de heteroarilo sustituido opcionalmente es una fracción sustituida opcionalmente seleccionada de pirazolilo, furanilo, imidazolilo, isoxazolil, oxadiazolilo, oxazolilo, pirrolil, piridilo, pirimidilo, piridazinil, tiazolilo, triazolilo, tienilo, dihidrotieno-pirazolilo, tianaftenilo, carbazolilo, benzimidazolilo, benzotienil, benzofuranilo, indolil, quinoleínilo, benzotriazolil benzotiazolilo, benzooxazolilo, benzimidazolilo, isoquinoleínilo, isoindolil, acridinilo, benzoisazolilo, dimetilhidantoina, pirazinilo, tetrahydrofuranilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, morfinilo, indolil, diazepinilo, azepinilo, tiepinilo, piperidinil y oxepinilo.

50 En otro aspecto, la fracción de heterocicloalquilo sustituido opcionalmente o fracción de heteroarilo sustituido opcionalmente es un furanilo sustituido opcionalmente.

Ejemplos no limitativos de compuestos heterocíclicos incluyen (1,2-dihidroxietil)-3,4-dihidroxifuran-2(5H)-ona; 4-hidroxi-5-metil-3-furanona; 5-hidroxi-2(5H)-furanona; [1,2-dihidroxietil]furan-2,3,4(5H)-triona; α -hidroxi- γ -butirolactona; γ -lactona ribónica; ácido γ -lactona aldohexuronicaldohexurónico; ácido glucónico δ lactona; 4-hidroxycumarina; dihidrobenzofurano; 5-(hidroximetil)furfural; furoin; 2(5H)-furanona; 5,6-dihidro-2H-piran-2-ona; y 5,6-dihidro-4-hidroxi-6-metil-2H-piran-2-ona; o una sal o solvato de los mismos.

[0066] El compuesto que contiene nitrógeno puede ser cualquier compuesto adecuado con uno o más átomos de nitrógeno.

60 En un aspecto, el compuesto que contiene nitrógeno comprende una amina, imina, hidroxilamina o fracción de nitróxido.

Ejemplos no limitativos de compuestos que contienen nitrógeno incluyen oxima de acetona; ácido violúrico; piridina-2-aldoxima; 2-aminofenol; 1,2-benzenediamina; 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi; 5,6,7,8-tetrahidropterin; 6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidropterina; y ácido maleámico; o una sal o solvato de los mismos.

[0067] El compuesto de quinona puede ser cualquier compuesto adecuado que comprende una fracción de quinona como se describe en este caso.

Ejemplos no limitativos de compuestos de quinona incluyen 1,4-benzoquinona; 1,4-naphthoquinone; 2-hydroxy-1,4-naftoquinona; 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona o coenzima Q₀, 2,3,5,6-tetrametil-1,4-benzoquinona o duroquinona; 1,4-dihidroxiantraquinona; 3-hidroxi-1-metil-5,6-indolinediona o adrenocromo; 4-tert-butil-5-metoxi-1,2-benzoquinona; quinona de pirroloquinolina; o una sal o solvato de los mismos.

[0068] El compuesto con sulfuro puede ser cualquier compuesto adecuado que comprende uno o más átomos de azufre.

En un aspecto, el sulfuro que comprende una fracción seleccionada de tionilo, tioéter, sulfinilo, sulfonil, sulfamida, sulfonamida, ácido sulfónico y éster sulfónico.

Ejemplos no limitativos de compuestos con sulfuro incluyen etanotiol; 2-propanetiol; 2-propeno-1-tiol; ácido 2-mercaptoetanosulfónico; bencenotiol; benzeno-1,2-ditio; cisteína; metionina; glutatión; cistina; o una sal o solvato de los mismos.

[0069] En una forma de realización, el polipéptido GH61 está presente en la cantidad de 2-1000 microgramos/g sólidos secos (DS), por ejemplo, 5-100, 10-40 o 20-40 microgramos/g DS.

Alfa-amilasas

[0070] Según la invención, cualquier alfa-amilasa puede ser utilizada, tal como de origen fúngico, bacteriano o vegetal.

En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida, por ejemplo, alfa-amilasa bacteriana ácida o fúngica ácida.

El término "alfa amilasa ácida" significa una alfa-amilasa (EC 3.2.1.1) que añadida en una cantidad eficaz tiene actividad óptima en el rango de pH de 3 a 7, preferiblemente de 3.5 a 6, o más preferiblemente de 4-5.

Alfa-amilasas bacterianas

[0071] Una alfa-amilasa para usar en la presente invención puede ser una alfa-amilasa bacteriana, por ejemplo, derivada de *Bacillus*.

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 *Bacillus*.

[0072] Ejemplos específicos de alfa-amilasas incluyen la alfa-amilasa *Bacillus amyloliquefaciens* de la SEQ ID N.º: 5 en WO 99/19467, la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* de la SEQ ID N.º: 4 en WO 99/19467 y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* de SEQ ID N.º: 3 en WO 99/19467.

En una forma de realización, la alfa-amilasa puede ser una enzima con un grado de identidad de al menos 60%, por ejemplo, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% a cualquiera de las secuencias mostradas en la SEQ ID N.º: 3, 4 o 5, respectivamente, en la WO 99/19467.

[0073] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrido, especialmente una descrita en cualquiera de WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059 y WO 02/10355.

Variantes de alfa-amilasa específicas se describen en la patente EEUU Nos. 6,093,562, 6,187,576, y 6,297,038 e incluyen variantes alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (alfa-amilasa BSG) con una eliminación de uno o dos aminoácidos en posiciones R179 a G182, preferiblemente, una eliminación doble descrita en WO 96/23873 - ver, por ejemplo, página 20, líneas 1-10, preferiblemente correspondientes a delta(181-182) en comparación con la secuencia de aminoácidos de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* expuesta en la SEQ ID N.º: 3 descrita en la WO 99/19467 o la eliminación de aminoácidos R179 y G180 usando la SEQ ID N.º: 3 en la WO 99/19467 para la numeración.

Aún más preferidas son alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus*, que tienen una eliminación doble que corresponde con delta (181-182) y además comprenden una N193F sustitución (denominada también I181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos alfa-amilasa de tipo salvaje BSG expuesta en la SEQ ID N.º: 3 descrita en la WO 99/19467.

Alfa-amilasas de híbrido bacteriano

[0074] La alfa-amilasa puede ser una alfa-amilasa híbrida, por ejemplo, una alfa-amilasa que comprende 445 residuos de aminoácidos C-terminal de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada en SEQ ID N.º: 4 de WO 99/19467) y los 37 residuos de aminoácidos N-terminal de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada en la SEQ ID N.º: 5 de WO 99/19467), con uno o más, especialmente todos, de las siguientes sustituciones:

G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+I201F+A209V+Q264S (utilizando la numeración de *Bacillus licheniformis* en la SEQ ID N.º: 4 de WO 99/19467).

Preferidas también son variantes que tienen una o varias de las siguientes mutaciones (o mutaciones correspondientes en otras alfa-amilasas de *Bacillus*): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o la eliminación de dos residuos entre posiciones 176 y 179, preferiblemente la eliminación de E178 y G179 (usando la SEQ ID N.º: 5 de WO 99/19467 para la numeración de la posición).

5 [0075] En una forma de realización, la alfa-amilasa bacteriana se dosifica en una cantidad de 0.0005-5 KNU por g DS (sólidos secos), preferiblemente 0.001-1 KNU por g DS, tal como alrededor de 0.050 KNU por g DS.

Alfa-amilasas fúngicas

10 [0076] Las alfa-amilasas fúngicas incluyen alfa-amilasas derivadas de una cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus niger* y alfa-amilasas de *Aspergillus oryzae*.

15 [0077] Una alfa-amilasa fúngica ácida preferida es una alfa-amilasa que muestra una alta identidad, 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 la parte madura de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID N.º: 10 en la WO 96/23874.

20 [0078] Otra alfa-amilasa ácida preferida se deriva de una cepa de *Aspergillus niger*.
En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa fúngica ácida es una alfa-amilasa de *Aspergillus niger* descrita como "AMYA ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TrEMBL bajo el n.º de acceso primario P56271 y descrito en la WO 89/01969 (ejemplo 3 -).
Una alfa-amilasa fúngica de ácido disponible comercialmente derivada de *Aspergillus niger* es SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

25 [0079] Otras alfa-amilasas tipo salvaje incluyen aquellas derivadas de una cepa de *Meripilus* y *Rhizomucor*, preferiblemente una cepa de *Meripilus giganteus* o *Rhizomucor pusillus* (WO 2004/055178).

30 [0080] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa se deriva de *Aspergillus kawachii* (Kaneko et al., 1996, J. Fermento. Bioeng. 81: 292-298, "Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachii*"; y además como EMBL: #AB008370).

[0081] La alfa-amilasa fúngica también puede ser una enzima tipo salvaje que comprende un dominio de unión al almidón (SBD) y un dominio catalítico de alfa-amilasa o una variante del mismo.

35 Alfa-amilasas de híbrido fúngico

[0082] En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida.
Ejemplos de alfa-amilasas de híbrido fúngico incluyen aquellas descritas en la WO 2005/003311, publicación de solicitud de patente EEUU nº 2005/0054071 (Novozymes) y WO 2006/069290 (Novozymes).
Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico de alfa-amilasa (CD) y un dominio/módulo de enlace de carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión al almidón (SBD) y opcionalmente un enlazador.

45 [0083] Ejemplos de alfa-amilasas de híbridas incluyen aquellas descritas en tablas 1 a 5 de los ejemplos en la WO 2006/069290 con la variante con el dominio catalítico JA118 y SBD *Athelia rolfsii* (SEQ ID N.º: 100 en WO 2006/069290), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador AMG *Athelia rolfsii* y SBD (SEQ ID N.º: 101 en WO 2006/069290), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD (que se describen en la tabla 5 como una combinación de secuencias de aminoácidos SEQ ID N.º: 20, SEQ ID N.º: 72 y SEQ ID N.º: 96 en la solicitud EEUU nº 11/316,535) o como V039 en la tabla 5 en WO 2006/069290 y alfa-amilasa *Meripilus giganteus* con enlazador de glucoamilasa *Athelia rolfsii* y SBD (SEQ ID N.º: 102 en la WO 2006/069290).
Otras alfa-amilasas híbridas se enumeran en tablas 3, 4, 5 y 6 en el ejemplo 4 en la solicitud EEUU nº 11/316,535 y la WO 2006/069290.

55 [0084] Otros ejemplos de alfa-amilasas de híbrido incluyen aquellas descritas en la publicación de solicitud de patente EEUU nº 2005/0054071, incluyendo aquellas descritas en la tabla 3 en la página 15, tales como alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con enlazador de *Aspergillus kawachii* y dominio de unión al almidón.

60 [0085] Otras alfa-amilasas muestran un alto grado de identidad de secuencia con cualquiera de las alfa-amilasas anteriormente mencionadas, es decir, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o incluso 100% de identidad con las secuencias de enzima madura descritas arriba.

[0086] Una alfa-amilasa ácida puede según la invención ser adicionada en una cantidad de 0.001 a 10 AFAU/g DS, por ejemplo, 0.01 a 5 AFAU/g DS, especialmente 0.3 a 2 AFAU/g DS, o 0.001 a 1 f/G FAU DS, preferiblemente 0.01 a 1 f/G FAU DS.

5 Productos de alfa-amilasa comercial

[0087] Las composiciones comerciales preferidas que comprenden alfa-amilasa incluyen MYCOLASE™ (DSM), BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYME™ X, LIQUOZYME™ SC y SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE™ L-40,000, DEX-LO™, SPEZYME™ FRED, SPEZYME™ AA, SPEZYME™ DELTA AA, GC358; GC980 y SPEZYME™ RSL (Danisco A/S) y la alfa-amilasa fúngica ácida vendida bajo el nombre comercial SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

Enzimas generadores de fuente de carbohidratos (sacarificación de enzimas)

[0088] El término "enzima generadora de fuente de carbohidratos" incluye glucoamilasa (un generador de glucosa), beta-amilasa y amilasa maltogénica (ambos generadores de maltosa) y también alfa-glucosidasa, isoamilasa y pululanasa.

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.

El carbohidrato generado se puede convertir directa o indirectamente al producto de fermentación deseado, preferiblemente etanol.

Según la invención, una mezcla de enzimas generadoras de fuente de carbohidratos puede ser utilizada.

Las mezclas incluyen mezclas que comprenden al menos una glucoamilasa y una alfa-amilasa, especialmente una amilasa ácida, aún más preferida una alfa-amilasa fúngica ácida.

[0089] En una forma de realización, la proporción entre la actividad de glucoamilasa (AGU) y actividad de alfa-amilasa fúngica ácida (FAU-F) (es decir, AGU por FAU-F) puede ser entre 0.1 y 100 AGU/FAU-F, en particular, entre 2 y 50 AGU/FAU-F, tal como en el rango de 10-40 AGU/FAU-F.

30 Glucoamilasas

[0090] Una glucoamilasa se puede derivar de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, derivada de un microorganismo o una planta.

35 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 la WO 84/02921, glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* (Hata et al., 1991, Agric. Biol. Chem. 55(4): 941-949) o variantes o fragmentos de las mismas.

40 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 posiciones A435 y S436 (Li et al., 1997, Protein Eng. 10: 1199-1204).

45 [0091] Otras glucoamilasas incluyen *Athelia rolfsii* (denominada previamente *Corticium rolfsii*) glucoamilasa (ver patente EEUU nº 4,727,026 y Nagasaka et al., 1998, Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 323-330), glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular derivadas de *Talaromyces dupontii*, *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente EEUU nº. Re. 32,153) y *Talaromyces thermophilus* (patente EEUU nº 4,587,215).

50 [0092] Las glucoamilasas bacterianas incluyen glucoamilasas de *Clostridium*, en particular *C. Thermoamylolyticum* (EP 135138) y *C. Thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831), *Trametes cingulata*, *Pachykytospora papyracea* y *Leucopaxillus giganteus*, todas descritas en la WO 2006/069289; o *Peniophora rufomarginata* descritas en PCT/US2007/066618 o una mezcla de las mismas.

Una glucoamilasa híbrida se puede utilizar en la presente invención.

55 Ejemplos de glucoamilasas de híbrido se describen en la WO 2005/045018.

Los ejemplos específicos incluyen la glucoamilasa híbrida descrita en tablas 1 y 4 del ejemplo 1.

[0093] La glucoamilasa puede tener un alto grado de identidad de secuencia con cualquiera de las glucoamilasas anteriormente mencionadas, es decir, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, 60 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.

[0094] Las composiciones de glucoamilasa disponibles comercialmente incluyen AMG 200L; AMG 300L; SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L, SPIRIZYME™ PLUS, FUEL, SPIRIZYME™, SPIRIZYME™ B4U, SPIRIZYME ULTRA™ y

AMG™ E (de Novozymes A/S, Dinamarca); OPTIDEX™ 300; GC480™ y GC147™ (de Genencor Int., USA); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUD (de DSM); G-ZYME™ G900, G-ZYME™ y G990 ZR (de Genencor Int.).

5 [0095] Las glucoamilasas se pueden adicionar en una cantidad de 0.02-20 AGU/g DS, preferiblemente 0.1-10 AGU/g DS, especialmente entre 0.1-5 AGU/g DS, tal como 0.1-2 AGU/g DS, tal como 0.5 AGU/g DS o 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.

Beta-amilasas

10 [0096] Una beta-amilasa (E.C 3,2,1,2) es el nombre generalmente dado para las amilasas maltogénicas de exo-acto, que catalizan la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa-glicosídicos en la amilosa, amilopectina y relativos polímeros de glucosa.

15 Las unidades de maltosa son sucesivamente retiradas de las extremidades de cadena no-reducida de una manera gradual hasta que la molécula es degradada o, en el caso de amilopectina, hasta que se alcanza un punto de derivación.

La maltosa liberada tiene la configuración anomérica beta, por lo tanto, el nombre beta-amilasa.

20 [0097] Las beta-amilasas han sido aisladas de varias plantas y microorganismos (Fogarty y Kelly, 1979, Progress in Industrial Microbiology 15: 112-115).

Estas beta-amilasas se caracterizan por el hecho de que tienen una temperatura óptima en el rango de 40°C a 65°C y un pH óptimo en el rango de 4.5 a 7.

Una beta-amilasa disponible comercialmente de cebada es NOVOZYM™ WBA de Novozymes A/S, Dinamarca y SPEZYME™ BBA 1500 de Genencor Int., EE.UU.

25 Amilasas maltogénicas

[0098] La amilasa también puede ser una alfa-amilasa maltogénica (glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa, EC 3,2,1,133), que cataliza la hidrólisis de amilosa y amilopectina para maltosa en la configuración alfa.

30 Una amilasa maltogénica de cepa de *Bacillus stearothersophilus* NCIB 11837 está comercialmente disponible de Novozymes A/S.

Alfa-amilasas maltogénicas se describen en la patente EEUU Nos. 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628.

[0099] La amilasa maltogénica se puede adicionar en una cantidad de 0.05-5 mg total proteína/gramo DS o 0.05-5 MANU/g DS.

35 Fitasas

[0100] Cualquier fitasa se puede utilizar en un proceso de la presente invención.

40 Las fitasas son enzimas que degradan fitatos y/o ácido fítico hidrolizando específicamente la conexión de éster entre el inositol y fósforo.

La actividad de fitasa se acredita con fósforo y disponibilidad iónica en muchos ingredientes.

En algunas formas de realización, la fitasa es capaz de la liberación al menos de un fosfato inorgánico a partir de un hexafosfato de inositol (por ejemplo, ácido fítico).

45 Las fitasas se pueden reagrupar según su preferencia para una posición específica del grupo de éster de fosfato en la molécula de fitato en la que la hidrólisis se inicia (por ejemplo, 3-fitasa (EC 3.1.3.8) o 6-fitasa (EC 3.1.3.26)).

Un ejemplo de fitasa es myo-inositol-hexakifosfato-3-fosfohidrolasa.

[0101] Las fitasas se pueden obtener de microorganismos tales como organismos fúngicos y bacterianos.

50 Por ejemplo, la fitasa se puede obtener de hongos filamentosos tal como *Aspergillus* (por ejemplo, *A. ficuum*, *A. fumigatus*, *A. niger*, y *A. terreus*), *Cladosporium*, *Mucor* (por ejemplo, *Mucor piriformis*), *Myceliophthora* (por ejemplo, *M. thermophila*), *Penicillium* (por ejemplo, *P. hordei* (ATCC nº 22053)), *P. piceum* (ATCC nº 10519) o *P. brevicompactum* (ATCC nº 48944), *Talaromyces* (por ejemplo, *T. thermophilus*), *Thermomyces* (WO 99/49740) y *Trichoderma spp.* (por ejemplo, *T. reesei*).

55 [0102] En una forma de realización, la enzima de degradación de fitato se obtiene de levadura (por ejemplo, *Arxula adenivorans*, *Pichia anomala*, *Schwanniomyces occidentalis*), bacterias gram-negativas (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*) y bacterias gram-positivas (por ejemplo, *Bacillus spp.* tal como *Bacillus subtilis*).

60 [0103] La fitasa también se puede obtener de *Citrobacter*, *Enterobacter* o *Peniophora*.

[0104] En una forma de realización, la fitasa se deriva de *Buttiauxiella spp.* tal como *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. ferragutiase*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae* y *B. warmboldiae*.

65 En algunas formas de realización, la fitasa es una fitasa descrita en la WO 2006/043178 o solicitud EEUU nº 11/714,487.

[0105] En una forma de realización preferida, la fitasa tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 93%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% y al menos 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID N.º: 31 de solicitud EEUU nº 12/263,886.

[0106] Las fitasas disponibles comercialmente son NATUPHOS (BASF), RONOZYME P (Novozymes A/S), PHZYME (Danisco A/S, Diversa) y FINASE (AB enzimas).

El método para determinar la actividad de fitasa microbiana y la definición de una unidad de fitasa se describe en Engelen et al., 1994, Journal of AOAC International 77: 760-764.

La fitasa puede ser una fitasa tipo salvaje, una variante activa o fragmento activo de la misma.

Pululanastas

[0107] Cualquier pululanasa se puede utilizar en un proceso de la presente invención.

En una forma de realización, la pululanasa es una pululanasa GH57, por ejemplo, una pululanasa obtenida a partir de una cepa de *Thermococcus*, incluyendo *Thermococcus sp.*

AM4, *Thermococcus sp.* HJ21, *Thermococcus barophilus*, *Thermococcus gammatolerans*, *Thermococcus hydrothermalis*; *Thermococcus kodakarensis*, *Thermococcus litoralis* y *Thermococcus onnurineus*; o de una cepa de *Pyrococcus*, tal como *Pyrococcus abyssi* y *Pyrococcus furiosus*.

Proteasas

[0108] Una proteasa se puede adicionar durante la sacarificación, fermentación, sacarificación simultánea y fermentación.

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.

Se prefiere una proteasa fúngica ácida, pero también se pueden usar otras proteasas.

[0109] Las proteasas adecuadas incluyen proteasas microbianas, tales como proteasas fúngicas y bacterianas.

Las proteasas preferidas son proteasas acídicas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad de hidrolizar proteínas bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7.

[0110] La proteasa fúngica ácida se puede derivar de *Aspergillus*, *Candida*, *Coriolus*, *Endothia*, *Entomophtra*, *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 pepA; y proteasas ácidas de *Mucor miehei* o *Mucor pusillus*.

[0111] La proteasa puede ser una proteasa neutra o alcalina, tal como una proteasa derivada a partir de una cepa de *Bacillus*.

Una proteasa particular se deriva de *Bacillus amyloliquefaciens* y tiene la secuencia obtenible en Swissprot como nº de acceso P06832.

Las proteasas pueden tener al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos descrita en la base de datos de Swissprot, nº de acceso.

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.

[0112] La proteasa puede tener al menos un 90% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos descrita como la SEQ ID N.º: 1 en WO 2003/048353 tal como a 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o particularmente al menos 99% de identidad.

[0113] 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 (asclepaina), EC 3,4,22,14 (actinidaina), EC 3,4,22,15 (catepsina L), EC 3,4,22,25 (endopeptidasa de glicil) y EC 3,4,22,30 (caricaína).

[0114] 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 de una cepa de *Rhizomucor*, preferiblemente, *Rhizomucor miehei*.

[0115] 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.

Los ejemplos de proteasas de ácido aspártico incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en Berka et al., 1990, Gene 96: 313; Berka et al., 1993, Gene 125: 195-198; y Gomi et al., 1993, Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1095-11.

[0116] La proteasa también puede ser una metaloproteasa, que se define como una proteasa seleccionada del grupo que consiste en:

- (a) proteasas de EC 3.4.24 (metaloendopeptidasas); preferiblemente EC 3.4.24.39 (ácido metalo proteinasas);
- (b) metaloproteasas del M grupo del manual anterior;
- (c) metaloproteasas todavía no asignadas a clanes (designación: Clan MX) o que pertenecen bien a uno de los clanes, MB, MC, MD, ME, MF, MG, MH (como se ha definido en las págs. 989-991 del manual anterior);
- (d) otras familias de metaloproteasas (como se ha definido en las págs. 1448-1452 del manual anterior);
- (e) metaloproteasas con una unidad HEXXH;
- (f) metaloproteasas con una unidad HEFT;
- (g) metaloproteasas 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) metaloproteasas de la familia M28E; y
- (i) metaloproteasas de la familia M35 (como se ha definido en las págs. 1492-1495 del manual anterior).

[0117] En otras formas de realización particulares, las metaloproteasas 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.

[0118] No hay limitaciones en el origen de la metaloproteasa usada en un proceso de la invención.

En una forma de realización, la metaloproteasa se clasifica como EC 3.4.24, preferiblemente EC 3.4.24.39.

En una forma de realización, la metaloproteasa es una metaloproteasa de ácido estable, por ejemplo, una metaloproteasa de ácido estable fúngica, tal como una metaloproteasa derivada de una cepa del género *Thermoascus*, preferiblemente, una cepa de *Thermoascus aurantiacus*, especialmente, *Thermoascus aurantiacus* CGMCC n° 0670 (clasificado como EC 3.4.24.39).

En otra forma de realización, la metaloproteasa se deriva de una cepa del género *Aspergillus*, preferiblemente, una cepa de *Aspergillus oryzae*.

[0119] En una forma de realización, la metaloproteasa 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 SEQ ID N. °: 1 de WO 2010/008841 (una metaloproteasa de *Thermoascus aurantiacus*) de al menos 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 metaloproteasa consiste en una secuencia de aminoácidos con un grado de identidad con la SEQ ID N. °: 1 como se ha mencionado anteriormente.

[0120] La metaloproteasa *Thermoascus aurantiacus* es un ejemplo preferido de una metaloproteasa adecuada para usar en un proceso de la invención.

Otra metaloproteasa se deriva de *Aspergillus oryzae* y comprende la secuencia de la SEQ ID N. °: 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 SEQ ID N. °: 10 descritas en la WO 2003/048353.

[0121] Otra metaloproteasa adecuada para usar en un proceso de la invención es la metaloproteasa de *Aspergillus oryzae* que comprende SEQ ID N. °: 5 de WO 2010/008841 o una metaloproteasa es un polipéptido aislado que tiene un grado de identidad con la SEQ ID N. °: 5 de al menos un 80%, al menos 82%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o al menos 97%; y que tienen una actividad de metaloproteasa.

En formas de realización particulares, la metaloproteasa consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N. °: 5.

[0122] En una forma de realización particular, una metaloproteasa 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 metaloproteasa de *Aspergillus oryzae*.

[0123] En otra forma de realización, una metaloproteasa tiene una secuencia de aminoácidos que difiere por 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 metaloproteasas, por ejemplo, por cuatro, por tres, por dos o por un aminoácido.

[0124] En formas de realización particulares, la metaloproteasa a) comprende o b) consiste en
 i) la secuencia de aminoácidos de aminoácidos -178 a 177; -159 a 177, o +1 a 177 de SEQ ID N.º:1 de la WO 2010/008841;
 5 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 SEQ ID N.º: 3 de la WO 2010/008841;
 iii) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N.º: 5 de WO 2010/008841; o variantes alélicas, o fragmentos, de las secuencias de i), ii) e iii) que tienen actividad de proteasa.

10 [0125] Un fragmento de aminoácidos -178 a 177; -159 a 177 o +1 a 177 de SEQ 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 SEQ ID N.º: 3 de WO 2010/008841; es un polipéptido con uno o más aminoácidos eliminados de 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
 15 residuos de aminoácidos, o al menos 165 residuos de aminoácidos, o al menos 170 residuos de aminoácidos, o al menos 175 residuos de aminoácidos.

[0126] En otra forma de realización, la metaloproteasa se combina con otra proteasa, tal como una proteasa fúngica, preferiblemente una proteasa fúngica ácida.

[0127] Productos disponibles comercialmente incluyen ALCALASE®, ESPERASE™, FLAVOURZYME™, NEUTRASE®, RENNILASE®, NOVOZYM™ FM 2.0L, e iZyme BA (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca) y GC106™ SPEZYME™ FAN de Genencor Internacional, Inc., USA.

25 [0128] 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.

30 Composiciones

[0129] Descrita aquí también hay una composición que comprende (a) un polipéptido GH61, (b) una glucoamilasa y (c) una alfa-amilasa.

35 [0130] En una forma de realización, la composición comprende además unas u otras más carbohidrasas, tales como alfa-amilasas.
 En una forma de realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa ácida o una alfa-amilasa fúngica, preferiblemente una alfa-amilasa fúngica ácida.

40 [0131] La composición puede comprender una o más enzimas generadores de fuente de carbohidratos, tal como especialmente glucoamilasas, beta-amilasas, amilasas maltogénicas, pululanases, alfa-glucosidasas o una mezcla de las mismas.

45 [0132] En otra forma de realización preferida, la composición comprende uno o más polipéptidos GH61 y uno o más organismos fermentadores, tales como levadura y/o bacterias.
 Ejemplos de organismos fermentadores se pueden encontrar en el "organismo de fermentación" de la sección de arriba.

50 Usos

[0133] Descrito aquí también está el uso del polipéptido GH61 en un proceso de fermentación.
 En una forma de realización, se usa un polipéptido GH61 para mejorar el rendimiento del producto de fermentación.

55 Organismos fermentadores modificados

[0134] Descrito también está un organismo fermentador modificado transformado con un polinucleótido que codifica un polipéptido GH61, donde el organismo fermentador es capaz de expresar el polipéptido GH61 en condiciones de fermentación.

60 [0135] En una forma de realización preferida, el organismo fermentador es un organismo microbiano, tal como levadura u hongo filamentosos, o una bacteria.
 Ejemplos de otros organismos fermentadores se pueden encontrar en la sección "organismos fermentadores".

[0136] Un organismo fermentador se puede transformar con un gen que codifica de un polipéptido GH61 que usa técnicas bien conocidas en la técnica.

5 [0137] La invención descrita y reivindicada aquí no es para ser limitada en su alcance por las formas de realización específicas aquí descritas, ya que estas formas de realización se destinan como ilustraciones de diferentes aspectos de la invención.

Cualquier forma de realización equivalente se destina a estar dentro del campo de esta invención.

De hecho, varias modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas aquí serán evidentes para los expertos en la técnica de la descripción precedente.

10 Tales modificaciones están también destinadas a pertenecer al campo de las reivindicaciones anexas.

En el caso de conflicto, se controlará la presente descripción, incluyendo las definiciones.

[0138] Varias referencias son citadas aquí, las descripciones son incorporadas por referencia en sus totalidades.

15 **Materiales y métodos**

Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0139] La actividad de glucoamilasa se puede medir en las unidades de glucoamilasa (AGU).

20 La unidad Novo de glucoamilasa (AGU) se define como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol 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.

[0140] Se puede utilizar un sistema de autoanalizador.

25 La mutarotasa se añade al reactivo de glucosa deshidrogenasa de modo que cualquier alfa-D-glucosa presente se gira en la beta-D-glucosa.

La glucosa deshidrogenasa reacciona específicamente con beta-D-glucosa en la reacción mencionada anteriormente, formación NADH que se determina usando un fotómetro a 340 nm como una medida de la concentración de glucosa original.

30

Incubación AMG:	
Sustrato:	Maltosa 23.2 mM
Tampón:	Acetato 0.1 M
pH:	4.30 ± 0.05
Temperatura de incubación:	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	5 Minutos
Gama 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

Actividad de alfa-amilasa (KNU)

35 [0141] La actividad de alfa-amilasa se puede determinar utilizando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición de almidón de patata modificado por la enzima y la reacción está seguida de la mezcla de muestras de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo.

Inicialmente, se forma un color azul negruzco, pero durante la descomposición del almidón el color azul se vuelve más débil y cambia gradualmente a un marrón rojizo, que se compara con un estándar de vidrio coloreado.

40

[0142] Una unidad Kilo Novo de alfa-amilasa (KNU) se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (es decir, a 37°C +/- 0.05, 0.0003 M Ca²⁺; y pH 5.6) dextriniza 5260 mg de almidón de sustancia seca Merck Amylum soluble.

45 **Actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)**

[0143] La actividad de una alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida) o FAU-F.

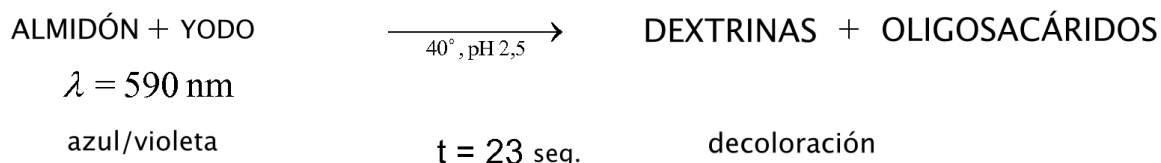
La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida), que se determinan con respecto a un estándar enzimático. 1 AFAU se define como la cantidad de enzima que degrada 5.260 mg de almidón en sustancia seca por hora bajo las condiciones estándar mencionadas abajo.

5 [0144] La alfa-amilasa ácida, una endo-alfa-amilasa (1,4-alfa-D-glucano-glucanohidrolasa, EC 3,2,1,1) hidroliza enlaces alfa-1,4-glucosídicos en las regiones internas de la molécula de almidón para formar dextrinas y oligosacáridos con longitudes de cadena diferentes.

La intensidad de color formada con yodo es directamente proporcional a la concentración de almidón.

10 La actividad amilasa se determina utilizando colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón bajo las condiciones analíticas específicas.

ALFA - AMILASA



Condiciones estándar/condiciones de reacción:	
Sustrato:	Almidón soluble, aprox. 0.17 g/L
Tampón:	Citrato, aprox. 0.03 M
Yodo (I ₂):	0.03 G/L
CaCl ₂ :	1.85 mM
pH:	2.50 ± 0.05
Temperatura de incubación:	40°C
Tiempo de reacción:	23 segundos
Longitud de onda:	590 nm
Concentración enzimática:	0.025 AFAU/mL
Gama de trabajo de enzima:	0.01-0.04 AFAU/mL

15 Determinación de FAU-F

[0145] FAU-F unidades de alfa-amilasa fúngica (fungamil) se miden con respecto a un estándar enzimático de una fuerza declarada.

Condiciones de reacción	
Temperatura	37°C
pH	7.15
Longitud de onda	405 nm
Tiempo de reacción	5 min
Tiempo de medición	2 min

20

Método de ensayo de proteasa - AU(RH)

[0146] La actividad proteolítica se puede determinar con hemoglobina desnaturalizada como sustrato.

25 En el método Anson-Hemoglobin para la determinación de actividad proteolítica desnaturalizada se digiere la hemoglobina y la hemoglobina no asimilada se precipita con ácido tricloroacético (ATC).

La cantidad de producto soluble ATC se determina con reactivo de fenol, que da un color azul con tirosina y triptófano.

30 [0147] Una unidad de Anson (AU-RH) se define como la cantidad de enzima que bajo condiciones estándar (es decir, 25°C, pH 5.5 y tiempo de reacción de 10 minutos) digiere hemoglobina a un nivel inicial, de manera que se libera por minuto una cantidad de ATC producto soluble que da el mismo color con reactivo de fenol como un miliequivalente de tirosina.

35 [0148] El método AU(RH) se describe en EAL-SM-0350 y está disponible de Novozymes A/S Dinamarca en la solicitud.

Método de ensayo de proteasa (LAPU)

40 [0149] Una Unidad de Leucina Amino Peptidasa (LAPU) es la cantidad de enzima que descompone sustrato 1 microM por minuto en las condiciones siguientes: 26 mM de L-leucina-p-nitroanilida como sustrato, tampón 0.1 M Tris (pH 8.0), 37°C, 10 minutos de tiempo de reacción.

[0150] LAPU se describe en EB-SM-0298.02/01 disponible de Novozymes A/S Dinamarca en la solicitud.

Actividad amilasa maltogénica (MANU)

5 [0151] Una MANU (Unidad Novo de amilasa maltogénica) es la cantidad de enzima requerida para la liberación de un micromol de maltosa por minuto a una concentración de 10 mg de maltotriosa (Sigma M 8378) sustrato por ml de 0.1 M tampón de citrato, pH 5.0 a 37°C durante 30 minutos.

10 **Ejemplos**

Ejemplo 1

Efecto de varios polipéptidos GH61 en un proceso de hidrólisis de almidón crudo

15 [0152] Todos los tratamientos fueron evaluados vía fermentaciones de mini-escala. Un total de 410 g de maíz amarillo dentado triutrado (con un tamaño de partícula medio alrededor de 0.5 mm) se añadió a 590 g de agua corriente. Esta mezcla fue suplementada con 3.0 ml de 1 g/l penicilina y 1 g de urea. El pH de este lodo fue ajustado a 4.5 con 40% H₂SO₄. El nivel de sólido seco (DS) se determinó a 35 peso. %. Aproximadamente, 5 g de este lodo se añadió a frascos de 20 ml. Cada uno de los frascos se dosificó con las cantidades de alfa-amilasa (un híbrido de la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* y enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y dominio de unión al almidón, que se describe en la WO 2006/069290), glucoamilasa (glucoamilasa de *Trametes cingulata* descrita en la WO 2006/069289) y polipéptido GH61 mostrado en la tabla de debajo seguido de la adición de 200 microlitros de levadura se propagan por 5 g de lodo. Las dosificaciones reales fueron basadas en el peso exacto de lodo de maíz en cada uno de los frascos.

Tratamientos	Alfa-amilasa (AA) dosis (FAU-F/g DS)	Glucoamilasa (AMG) dosis (AGU/g DS)	Dosis GH61 (microgramos/g DS)
AA+AMG	0.0475	0.5	0
AA + AMG + GH61 (un primer <i>Aurantiporus alborubescens</i> polipéptido GH61)	0.0475	0.5	10
AA + AMG + GH61 (un segundo <i>Aurantiporus alborubescens</i> polipéptido GH61)	0.0475	0.5	10
AA + AMG + GH61 (SEQ ID N.º: 25)	0.0475	0.5	10

30 [0153] Los frascos fueron incubados a 32°C. Se realizaron nueve fermentaciones replicadas de cada tratamiento. Tres réplicas fueron seleccionadas durante 24 horas, 48 horas y 70 horas de punto de análisis. Los frascos fueron agitados en vórtex en 24, 48 y 70 horas y analizados por HPLC. La preparación de HPLC consistió en parar la reacción por adición de 50 microlitros de 40% H₂SO₄, centrifugar y filtrar a través de un filtro de micrómetros 0.45. Las muestras fueron almacenadas a 4°C hasta el análisis. Un sistema de HPLC de Agilent™ 1100 acoplado con un detector de índice de refracción (RI) fue usado para determinar etanol y concentraciones de disacárido. La columna de separación fue una columna de exclusión iónica Aminex™ HPX-87H (300 mm x 7.8 mm) de Bio-Rad®.

[0154] Los rendimientos de etanol después de 70 horas se proporcionan en la tabla 1:

45 **Tabla 1 - Rendimientos de etanol con respecto al control**

GH61	Dosis (microgramos/g DS)		
	10	20	40
Primer polipéptido <i>Aurantiporus alborubescens</i> GH61	100.41%	100.32%	100.45%
Segundo polipéptido <i>Aurantiporus alborubescens</i> GH61	100.69%	100.86%	98. 50%
SEQ ID N.º: 25	100.94%	98. 68%	100.38%

[0155] Los resultados (en negrita) muestran que la adición de polipéptido GH61 produce un aumento significativo estadísticamente en el rendimiento de etanol final en comparación con el control.

50 [0156] Las concentraciones de disacárido obtenidas se proporcionan en la tabla 2.

Tabla 2 - Rendimientos de disacárido con respecto al control

GH61	Dosis (microgramos/g DS)		
	10	20	40
Primer polipéptido <i>Aurantiporus alborubescens</i> GH61	82.88%	77.84%	77.26%
Segundo polipéptido <i>Aurantiporus alborubescens</i> GH61	77.68%	79.22%	71.30%
SEQ ID N.º: 25	76.69%	72.56%	71.99%

[0157] Los resultados muestran que la adición de polipéptido GH61 redujo la concentración final de disacárido.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Soong, Chee Leong
Saunders, Jeremy D.

10

<120> PROCESSES OF PRODUCING A FERMENTATION PRODUCT

<130> 12109-WO-PCT

15

<150> US 61/318,787

<151> 2010-03-30

<160> 32

20

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 326

<212> PRT

25

<213> Thielavia terrestris

<400> 1

30

Met Lys Ser Phe Thr Ile Ala Ala Leu Ala Ala Leu Trp Ala Gln Glu
1 5 10 15

35

Ala Ala Ala His Ala Thr Phe Gln Asp Leu Trp Ile Asp Gly Val Asp
20 25 30

40

Tyr Gly Ser Gln Cys Val Arg Leu Pro Ala Ser Asn Ser Pro Val Thr
35 40 45

45

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

50

Thr Val Lys Cys Pro Val Lys Ala Gly Ser Thr Val Thr Ile Glu Met
65 70 75 80

His Gln Gln Pro Gly Asp Arg Ser Cys Ala Asn Glu Ala Ile Gly Gly
85 90 95

Asp His Tyr Gly Pro Val Met Val Tyr Met Ser Lys Val Asp Asp Ala

ES 2 636 216 T3

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

ES 2 636 216 T3

<210> 2
 <211> 239
 5 <212> PRT
 <213> Thielavia terrestris

 <400> 2

 10 Met Arg Phe Asp Ala Leu Ser Ala Leu Ala Leu Ala Pro Leu Val Ala
 1 5 10 15

 15 Gly His Gly Ala Val Thr Ser Tyr Ile Ile Gly Gly Lys Thr Tyr Pro
 20 25 30

 20 Gly Tyr Glu Gly Phe Ser Pro Ala Ser Ser Pro Pro Thr Ile Gln Tyr
 35 40 45

 Gln Trp Pro Asp Tyr Asn Pro Thr Leu Ser Val Thr Asp Pro Lys Met
 50 55 60

 25 Arg Cys Asn Gly Gly Thr Ser Ala Glu Leu Ser Ala Pro Val Gln Ala
 65 70 75 80

 30 Gly Glu Asn Val Thr Ala Val Trp Lys Gln Trp Thr His Gln Gln Gly
 85 90 95

 35 Pro Val Met Val Trp Met Phe Lys Cys Pro Gly Asp Phe Ser Ser Ser
 100 105 110

 40 His Gly Asp Gly Lys Gly Trp Phe Lys Ile Asp Gln Leu Gly Leu Trp
 115 120 125

 Gly Asn Asn Leu Asn Ser Asn Asn Trp Gly Thr Ala Ile Val Tyr Lys
 130 135 140

 45 Thr Leu Gln Trp Ser Asn Pro Ile Pro Lys Asn Leu Ala Pro Gly Asn
 145 150 155 160

 50 Tyr Leu Ile Arg His Glu Leu Leu Ala Leu His Gln Ala Asn Thr Pro
 165 170 175

 55 Gln Phe Tyr Ala Glu Cys Ala Gln Leu Val Val Ser Gly Ser Gly Ser
 180 185 190

ES 2 636 216 T3

Ala Leu Pro Pro Ser Asp Tyr Leu Tyr Ser Ile Pro Val Tyr Ala Pro
195 200 205

5 Gln Asn Asp Pro Gly Ile Thr Val Asp Ile Tyr Asn Gly Gly Leu Thr
210 215 220

10 Ser Tyr Thr Pro Pro Gly Gly Pro Val Trp Ser Gly Phe Glu Phe
225 230 235

<210> 3
<211> 258
15 <212> PRT
<213> Thielavia terrestris

<400> 3

20 Met Leu Leu Thr Ser Val Leu Gly Ser Ala Ala Leu Leu Ala Ser Gly
1 5 10 15

25 Ala Ala Ala His Gly Ala Val Thr Ser Tyr Ile Ile Ala Gly Lys Asn
20 25 30

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

30 Gln Trp Gln Trp His Asp Tyr Asn Pro Val Leu Ser Cys Ser Asp Ser
50 55 60

35 Lys Leu Arg Cys Asn Gly Gly Thr Ser Ala Thr Leu Asn Ala Thr Ala
65 70 75 80

40 Ala Pro Gly Asp Thr Ile Thr Ala Ile Trp Ala Gln Trp Thr His Ser
85 90 95

45 Gln Gly Pro Ile Leu Val Trp Met Tyr Lys Cys Pro Gly Ser Phe Ser
100 105 110

Ser Cys Asp Gly Ser Gly Ala Gly Trp Phe Lys Ile Asp Glu Ala Gly
115 120 125

50 Phe His Gly Asp Gly Val Lys Val Phe Leu Asp Thr Glu Asn Pro Ser
130 135 140

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

ES 2 636 216 T3

5 Lys Val Pro Glu Gly Leu Ala Pro Gly Asn Tyr Leu Val Arg His Glu
 165 170 175
 10 Leu Ile Ala Leu His Gln Ala Asn Asn Pro Gln Phe Tyr Pro Glu Cys
 180 185 190
 15 Ala Gln Val Val Ile Thr Gly Ser Gly Thr Ala Gln Pro Asp Ala Ser
 195 200 205
 20 Tyr Lys Ala Ala Ile Pro Gly Tyr Cys Asn Gln Asn Asp Pro Asn Ile
 210 215 220
 25 Lys Val Pro Ile Asn Asp His Ser Ile Pro Gln Thr Tyr Lys Ile Pro
 225 230 235 240
 Gly Pro Pro Val Phe Lys Gly Thr Ala Ser Lys Lys Ala Arg Asp Phe
 245 250 255
 30 Thr Ala
 <210> 4
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Thielavia terrestris
 35 <400> 4
 40 Met Leu Ala Asn Gly Ala Ile Val Phe Leu Ala Ala Ala Leu Gly Val
 1 5 10 15
 Ser Gly His Tyr Thr Trp Pro Arg Val Asn Asp Gly Ala Asp Trp Gln
 20 25 30
 45 Gln Val Arg Lys Ala Asp Asn Trp Gln Asp Asn Gly Tyr Val Gly Asp
 35 40 45
 50 Val Thr Ser Pro Gln Ile Arg Cys Phe Gln Ala Thr Pro Ser Pro Ala
 50 55 60
 55 Pro Ser Val Leu Asn Thr Thr Ala Gly Ser Thr Val Thr Tyr Trp Ala
 65 70 75 80

ES 2 636 216 T3

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

5 Val Pro Asp Gly Glu Asp Ile Asn Ser Trp Asn Gly Asp Gly Ala Val
100 105 110

10 Trp Phe Lys Val Tyr Glu Asp His Pro Thr Phe Gly Ala Gln Leu Thr
115 120 125

15 Trp Pro Ser Thr Gly Lys Ser Ser Phe Ala Val Pro Ile Pro Pro Cys
130 135 140

Ile Lys Ser Gly Tyr Tyr Leu Leu Arg Ala Glu Gln Ile Gly Leu His
145 150 155 160

20 Val Ala Gln Ser Val Gly Gly Ala Gln Phe Tyr Ile Ser Cys Ala Gln
165 170 175

25 Leu Ser Val Thr Gly Gly Gly Ser Thr Glu Pro Pro Asn Lys Val Ala
180 185 190

30 Phe Pro Gly Ala Tyr Ser Ala Thr Asp Pro Gly Ile Leu Ile Asn Ile
195 200 205

35 Tyr Tyr Pro Val Pro Thr Ser Tyr Gln Asn Pro Gly Pro Ala Val Phe
210 215 220

Ser Cys
225

40
<210> 5
<211> 304
<212> PRT
<213> Thielavia terrestris

45
<400> 5

50 Met Lys Gly Leu Phe Ser Ala Ala Ala Leu Ser Leu Ala Val Gly Gln
1 5 10 15

Ala Ser Ala His Tyr Ile Phe Gln Gln Leu Ser Ile Asn Gly Asn Gln
20 25 30

55 Phe Pro Val Tyr Gln Tyr Ile Arg Lys Asn Thr Asn Tyr Asn Ser Pro
35 40 45

ES 2 636 216 T3

Val Thr Asp Leu Thr Ser Asp Asp Leu Arg Cys Asn Val Gly Ala Gln
 50 55 60
 5
 Gly Ala Gly Thr Asp Thr Val Thr Val Lys Ala Gly Asp Gln Phe Thr
 65 70 75 80
 10
 Phe Thr Leu Asp Thr Pro Val Tyr His Gln Gly Pro Ile Ser Ile Tyr
 85 90 95
 15
 Met Ser Lys Ala Pro Gly Ala Ala Ser Asp Tyr Asp Gly Ser Gly Gly
 100 105 110
 20
 Trp Phe Lys Ile Lys Asp Trp Gly Pro Thr Phe Asn Ala Asp Gly Thr
 115 120 125
 25
 Ala Thr Trp Asp Met Ala Gly Ser Tyr Thr Tyr Asn Ile Pro Thr Cys
 130 135 140
 30
 Ile Pro Asp Gly Asp Tyr Leu Leu Arg Ile Gln Ser Leu Ala Ile His
 145 150 155 160
 35
 Asn Pro Trp Pro Ala Gly Ile Pro Gln Phe Tyr Ile Ser Cys Ala Gln
 165 170 175
 40
 Ile Thr Val Thr Gly Gly Gly Asn Gly Asn Pro Gly Pro Thr Ala Leu
 180 185 190
 45
 Tyr Thr Asn Phe His Asn Tyr Thr Val Pro Gly Pro Glu Val Phe Ser
 210 215 220
 50
 Cys Asn Gly Gly Gly Ser Asn Pro Pro Pro Pro Val Ser Ser Ser Thr
 225 230 235 240
 55
 Pro Ala Thr Thr Thr Leu Val Thr Ser Thr Arg Thr Thr Ser Ser Thr
 245 250 255
 Ser Ser Ala Ser Thr Pro Ala Ser Thr Gly Gly Cys Thr Val Ala Lys
 260 265 270

ES 2 636 216 T3

Trp Gly Gln Cys Gly Gly Asn Gly Tyr Thr Gly Cys Thr Thr Cys Ala
 275 280 285

5
 Ala Gly Ser Thr Cys Ser Lys Gln Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu
 290 295 300

10 <210> 6
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Thielavia terrestris

15 <400> 6

Met Lys Gly Leu Ser Leu Leu Ala Ala Ala Ser Ala Ala Thr Ala His
 1 5 10 15

20
 Thr Ile Phe Val Gln Leu Glu Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Pro Val Ser
 20 25 30

25 Tyr Gly Ile Arg Asp Pro Ser Tyr Asp Gly Pro Ile Thr Asp Val Thr
 35 40 45

30 Ser Asp Ser Leu Ala Cys Asn Gly Pro Pro Asn Pro Thr Thr Pro Ser
 50 55 60

35 Pro Tyr Ile Ile Asn Val Thr Ala Gly Thr Thr Val Ala Ala Ile Trp
 65 70 75 80

40 Arg His Thr Leu Thr Ser Gly Pro Asp Asp Val Met Asp Ala Ser His
 85 90 95

45 Lys Gly Pro Thr Leu Ala Tyr Leu Lys Lys Val Asp Asp Ala Leu Thr
 100 105 110

50 Asp Thr Gly Ile Gly Gly Gly Trp Phe Lys Ile Gln Glu Ala Gly Tyr
 115 120 125

55 Asp Asn Gly Asn Trp Ala Thr Ser Thr Val Ile Thr Asn Gly Gly Phe
 130 135 140

Gln Tyr Ile Asp Ile Pro Ala Cys Ile Pro Asn Gly Gln Tyr Leu Leu
 145 150 155 160

Arg Ala Glu Met Ile Ala Leu His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Ala

ES 2 636 216 T3

				165					170					175			
5	Gln	Leu	Tyr	Met 180	Glu	Cys	Ala	Gln	Ile 185	Asn	Val	Val	Gly	Gly 190	Ser	Gly	
10	Ser	Ala	Ser 195	Pro	Gln	Thr	Tyr	Ser 200	Ile	Pro	Gly	Ile	Tyr 205	Gln	Ala	Thr	
15	Asp	Pro 210	Gly	Leu	Leu	Ile	Asn 215	Ile	Tyr	Ser	Met	Thr 220	Pro	Ser	Ser	Gln	
20	Tyr 225	Thr	Ile	Pro	Gly	Pro 230	Pro	Leu	Phe	Thr	Cys 235	Ser	Gly	Ser	Gly	Asn 240	
25	Asn	Gly	Gly	Gly	Ser 245	Asn	Pro	Ser	Gly	Gly 250	Gln	Thr	Thr	Thr	Ala 255	Lys	
30	Pro	Thr	Thr	Thr 260	Thr	Ala	Ala	Thr	Thr 265	Thr	Ser	Ser	Ala	Ala 270	Pro	Thr	
35	Ser	Ser	Gln 275	Gly	Gly	Ser	Ser	Gly 280	Cys	Thr	Val	Pro	Gln 285	Trp	Gln	Gln	
40	Cys 290	Gly	Gly	Ile	Ser	Phe	Thr 295	Gly	Cys	Thr	Thr	Cys 300	Ala	Ala	Gly	Tyr	
45	Thr 305	Cys	Lys	Tyr	Leu	Asn 310	Asp	Tyr	Tyr	Ser	Gln 315	Cys	Gln				
50	<210>	7															
	<211>	249															
	<212>	PRT															
	<213>	Thermoascus aurantiacus															
55	<400>	7															
	Met	Ser	Phe	Ser	Lys 5	Ile	Ile	Ala	Thr	Ala 10	Gly	Val	Leu	Ala 15	Ser	Ala	
50	Ser	Leu	Val	Ala 20	Gly	His	Gly	Phe	Val 25	Gln	Asn	Ile	Val	Ile 30	Asp	Gly	
55	Lys	Tyr	Tyr 35	Gly	Gly	Tyr	Leu	Val 40	Asn	Gln	Tyr	Pro	Tyr 45	Met	Ser	Asn	

ES 2 636 216 T3

Pro Pro Glu Val Ile Ala Trp Ser Thr Thr Ala Thr Asp Leu Gly Phe
 50 55 60
 5
 Val Asp Gly Thr Gly Tyr Gln Thr Pro Asp Ile Ile Cys His Arg Gly
 65 70 75 80
 10 Ala Lys Pro Gly Ala Leu Thr Ala Pro Val Ser Pro Gly Gly Thr Val
 85 90 95
 15 Glu Leu Gln Trp Thr Pro Trp Pro Asp Ser His His Gly Pro Val Ile
 100 105 110
 20 Asn Tyr Leu Ala Pro Cys Asn Gly Asp Cys Ser Thr Val Asp Lys Thr
 115 120 125
 Gln Leu Glu Phe Phe Lys Ile Ala Glu Ser Gly Leu Ile Asn Asp Asp
 130 135 140
 25 Asn Pro Pro Gly Ile Trp Ala Ser Asp Asn Leu Ile Ala Ala Asn Asn
 145 150 155 160
 30 Ser Trp Thr Val Thr Ile Pro Thr Thr Ile Ala Pro Gly Asn Tyr Val
 165 170 175
 35 Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Gln Asn Gln Asp Gly
 180 185 190
 40 Ala Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Ile Asn Leu Gln Val Thr Gly Gly Gly
 195 200 205
 Ser Asp Asn Pro Ala Gly Thr Leu Gly Thr Ala Leu Tyr His Asp Thr
 210 215 220
 45 Asp Pro Gly Ile Leu Ile Asn Ile Tyr Gln Lys Leu Ser Ser Tyr Ile
 225 230 235 240
 50 Ile Pro Gly Pro Pro Leu Tyr Thr Gly
 245
 55 <210> 8
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Trichoderma reesei

ES 2 636 216 T3

<400> 8

5 Met Lys Ser Cys Ala Ile Leu Ala Ala Leu Gly Cys Leu Ala Gly Ser
 1 5 10 15

10 Val Leu Gly His Gly Gln Val Gln Asn Phe Thr Ile Asn Gly Gln Tyr
 20 25 30

15 Asn Gln Gly Phe Ile Leu Asp Tyr Tyr Tyr Gln Lys Gln Asn Thr Gly
 35 40 45

20 His Phe Pro Asn Val Ala Gly Trp Tyr Ala Glu Asp Leu Asp Leu Gly
 50 55 60

25 Phe Ile Ser Pro Asp Gln Tyr Thr Thr Pro Asp Ile Val Cys His Lys
 65 70 75 80

30 Asn Ala Ala Pro Gly Ala Ile Ser Ala Thr Ala Ala Ala Gly Ser Asn
 85 90 95

35 Ile Val Phe Gln Trp Gly Pro Gly Val Trp Pro His Pro Tyr Gly Pro
 100 105 110

40 Ile Val Thr Tyr Val Val Glu Cys Ser Gly Ser Cys Thr Thr Val Asn
 115 120 125

45 Lys Asn Asn Leu Arg Trp Val Lys Ile Gln Glu Ala Gly Ile Asn Tyr
 130 135 140

50 Asn Thr Gln Val Trp Ala Gln Gln Asp Leu Ile Asn Gln Gly Asn Lys
 145 150 155 160

55 Trp Thr Val Lys Ile Pro Ser Ser Leu Arg Pro Gly Asn Tyr Val Phe
 165 170 175

Arg His Glu Leu Leu Ala Ala His Gly Ala Ser Ser Ala Asn Gly Met
 180 185 190

Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Val Asn Ile Ala Val Thr Gly Ser Gly Thr
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Gly Thr Pro Ala Thr Gln Leu Tyr Lys Pro Thr
 210 215 220

ES 2 636 216 T3

Asp Pro Gly Ile Leu Phe Asn Pro Tyr Thr Thr Ile Thr Ser Tyr Thr
 225 230 235 240
 5
 Ile Pro Gly Pro Ala Leu Trp Gln Gly
 245
 10
 <210> 9
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Myceliophthora thermophila
 15
 <400> 9
 Met Lys Phe Thr Ser Ser Leu Ala Val Leu Ala Ala Ala Gly Ala Gln
 1 5 10 15
 20
 Ala His Tyr Thr Phe Pro Arg Ala Gly Thr Gly Gly Ser Leu Ser Gly
 20 25 30
 25
 Glu Trp Glu Val Val Arg Met Thr Glu Asn His Tyr Ser His Gly Pro
 35 40 45
 30
 Val Thr Asp Val Thr Ser Pro Glu Met Thr Cys Tyr Gln Ser Gly Val
 50 55 60
 35
 Gln Gly Ala Pro Gln Thr Val Gln Val Lys Ala Gly Ser Gln Phe Thr
 65 70 75 80
 40
 Phe Ser Val Asp Pro Ser Ile Gly His Pro Gly Pro Leu Gln Phe Tyr
 85 90 95
 45
 Met Ala Lys Val Pro Ser Gly Gln Thr Ala Ala Thr Phe Asp Gly Thr
 100 105 110
 50
 Gly Ala Val Trp Phe Lys Ile Tyr Gln Asp Gly Pro Asn Gly Leu Gly
 115 120 125
 55
 Thr Asp Ser Ile Thr Trp Pro Ser Ala Gly Lys Thr Glu Val Ser Val
 130 135 140
 Thr Ile Pro Ser Cys Ile Asp Asp Gly Glu Tyr Leu Leu Arg Val Glu
 145 150 155 160

ES 2 636 216 T3

His Ile Ala Leu His Ser Ala Ser Ser Val Gly Gly Ala Gln Phe Tyr
 165 170 175

5 Ile Ala Cys Ala Gln Leu Ser Val Thr Gly Gly Ser Gly Thr Leu Asn
 180 185 190

10 Thr Gly Ser Leu Val Ser Leu Pro Gly Ala Tyr Lys Ala Thr Asp Pro
 195 200 205

15 Gly Ile Leu Phe Gln Leu Tyr Trp Pro Ile Pro Thr Glu Tyr Ile Asn
 210 215 220

Pro Gly Pro Ala Pro Val Ser Cys
 225 230

20
 <210> 10
 <211> 235
 <212> PRT
 <213> Myceliophthora thermophila

25
 <400> 10

Met Lys Ala Leu Ser Leu Leu Ala Ala Ala Ser Ala Val Ser Ala His
 1 5 10 15

30 Thr Ile Phe Val Gln Leu Glu Ala Asp Gly Thr Arg Tyr Pro Val Ser
 20 25 30

35 Tyr Gly Ile Arg Asp Pro Ser Tyr Asp Gly Pro Ile Thr Asp Val Thr
 35 40 45

40 Ser Asn Asp Val Ala Cys Asn Gly Gly Pro Asn Pro Thr Thr Pro Ser
 50 55 60

45 Ser Asp Val Ile Thr Val Thr Ala Gly Thr Thr Val Lys Ala Ile Trp
 65 70 75 80

50 Arg His Thr Leu Gln Ser Gly Pro Asp Asp Val Met Asp Ala Ser His
 85 90 95

Lys Gly Pro Thr Leu Ala Tyr Leu Lys Lys Val Gly Asp Ala Thr Lys
 100 105 110

55 Asp Ser Gly Val Gly Gly Gly Trp Phe Lys Ile Gln Glu Asp Gly Tyr
 115 120 125

ES 2 636 216 T3

5 Asn Asn Gly Gln Trp Gly Thr Ser Thr Val Ile Ser Asn Gly Gly Glu
 130 135 140
 His Tyr Ile Asp Ile Pro Ala Cys Ile Pro Glu Gly Gln Tyr Leu Leu
 145 150 155 160
 10 Arg Ala Glu Met Ile Ala Leu His Ala Ala Gly Ser Pro Gly Gly Ala
 165 170 175
 15 Gln Leu Tyr Met Glu Cys Ala Gln Ile Asn Ile Val Gly Gly Ser Gly
 180 185 190
 20 Ser Val Pro Ser Ser Thr Val Ser Phe Pro Gly Ala Tyr Ser Pro Asn
 195 200 205
 25 Asp Pro Gly Leu Leu Ile Asn Ile Tyr Ser Met Ser Pro Ser Ser Ser
 210 215 220
 Tyr Thr Ile Pro Gly Pro Pro Val Phe Lys Cys
 225 230 235
 30 <210> 11
 <211> 323
 <212> PRT
 <213> Myceliophthora thermophila
 35 <400> 11
 40 Met Lys Ser Phe Ala Leu Thr Thr Leu Ala Ala Leu Ala Gly Asn Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala His Ala Thr Phe Gln Ala Leu Trp Val Asp Gly Val Asp Tyr
 20 25 30
 45 Gly Ala Gln Cys Ala Arg Leu Pro Ala Ser Asn Ser Pro Val Thr Asp
 35 40 45
 50 Val Thr Ser Asn Ala Ile Arg Cys Asn Ala Asn Pro Ser Pro Ala Arg
 50 55 60
 55 Gly Lys Cys Pro Val Lys Ala Gly Ser Thr Val Thr Val Glu Met His
 65 70 75 80

ES 2 636 216 T3

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

ES 2 636 216 T3

305	310	315	320
Gln Cys Val			
5			
	<210> 12		
	<211> 310		
10	<212> PRT		
	<213> Myceliophthora thermophila		
	<400> 12		
15	Met Lys Pro Phe Ser Leu Val Ala Leu Ala Thr Ala Val Ser Gly His		
	1 5 10 15		
20	Ala Ile Phe Gln Arg Val Ser Val Asn Gly Gln Asp Gln Gly Gln Leu		
	20 25 30		
25	Lys Gly Val Arg Ala Pro Ser Ser Asn Ser Pro Ile Gln Asn Val Asn		
	35 40 45		
30	Asp Ala Asn Met Ala Cys Asn Ala Asn Ile Val Tyr His Asp Ser Thr		
	50 55 60		
35	Ile Ile Lys Val Pro Ala Gly Ala Arg Val Gly Ala Trp Trp Gln His		
	65 70 75 80		
40	Val Ile Gly Gly Pro Gln Gly Ala Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ile Ala		
	85 90 95		
45	Ala Ser His Lys Gly Pro Ile Gln Val Tyr Leu Ala Lys Val Asp Asn		
	100 105 110		
50	Ala Ala Thr Ala Ser Pro Ser Gly Leu Arg Trp Phe Lys Val Ala Glu		
	115 120 125		
55	Arg Gly Leu Asn Asn Gly Val Trp Ala Val Asp Glu Leu Ile Ala Asn		
	130 135 140		
60	Asn Gly Trp His Tyr Phe Asp Leu Pro Ser Cys Val Ala Pro Gly Gln		
	145 150 155 160		
65	Tyr Leu Met Arg Val Glu Leu Leu Ala Leu His Ser Ala Ser Ser Pro		
	165 170 175		

ES 2 636 216 T3

Gly Gly Ala Gln Phe Tyr Met Gly Cys Ala Gln Ile Glu Val Thr Gly
 180 185 190
 5
 Ser Gly Thr Asn Ser Gly Ser Asp Phe Val Ser Phe Pro Gly Ala Tyr
 195 200 205
 10 Ser Ala Asn Asp Pro Gly Ile Leu Leu Ser Ile Tyr Asp Ser Ser Gly
 210 215 220
 15 Lys Pro Thr Asn Gly Gly Arg Ser Tyr Pro Ile Pro Gly Pro Arg Pro
 225 230 235 240
 20 Ile Ser Cys Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Asn Asn Gly Gly Gly Gly
 245 250 255
 Asp Asp Asn Asn Asn Asn Asn Gly Gly Gly Asn Asn Gly Gly Gly Gly
 260 265 270
 25 Gly Gly Ser Val Pro Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Thr
 275 280 285
 30 Gly Pro Thr Thr Cys Ala Gln Gly Thr Cys Lys Val Ser Asn Glu Tyr
 290 295 300
 35 Tyr Ser Gln Cys Leu Pro
 305 310
 <210> 13
 <211> 246
 40 <212> PRT
 <213> Myceliophthora thermophila
 <400> 13
 45 Met Lys Leu Ser Leu Phe Ser Val Leu Ala Thr Ala Leu Thr Val Glu
 1 5 10 15
 50 Gly His Ala Ile Phe Gln Lys Val Ser Val Asn Gly Ala Asp Gln Gly
 20 25 30
 Ser Leu Thr Gly Leu Arg Ala Pro Asn Asn Asn Asn Pro Val Gln Asp
 35 40 45
 55 Val Asn Ser Gln Asp Met Ile Cys Gly Gln Ser Gly Ser Thr Ser Asn

ES 2 636 216 T3

50

55

60

5 Thr Ile Ile Glu Val Lys Ala Gly Asp Arg Ile Gly Ala Trp Tyr Gln
65 70 75 80

10 His Val Ile Gly Gly Ala Gln Phe Pro Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ile
85 90 95

15 Ala Lys Ser His Lys Gly Pro Val Met Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp
100 105 110

20 Asn Ala Ala Thr Ala Ser Lys Thr Gly Leu Lys Trp Phe Lys Ile Trp
115 120 125

25 Glu Asp Thr Phe Asn Pro Ser Thr Lys Thr Trp Gly Val Asp Asn Leu
130 135 140

30 Ile Asn Asn Asn Gly Trp Val Tyr Phe Asn Leu Pro Gln Cys Ile Ala
145 150 155 160

35 Asp Gly Asn Tyr Leu Leu Arg Val Glu Val Leu Ala Leu His Ser Ala
165 170 175

40 Tyr Ser Gln Gly Gln Ala Gln Phe Tyr Gln Ser Cys Ala Gln Ile Asn
180 185 190

45 Val Ser Gly Gly Gly Ser Phe Thr Pro Pro Ser Thr Val Ser Phe Pro
195 200 205

50 Gly Ala Tyr Ser Ala Ser Asp Pro Gly Ile Leu Ile Asn Ile Tyr Gly
210 215 220

55 Ala Thr Gly Gln Pro Asp Asn Asn Gly Gln Pro Tyr Thr Ala Pro Gly
225 230 235 240

Pro Ala Pro Ile Ser Cys
245

50

<210> 14

<211> 354

<212> PRT

55 <213> Thermoascus aurantiacus

<400> 14

ES 2 636 216 T3

	Met	Ser	Phe	Ser	Lys	Ile	Ala	Ala	Ile	Thr	Gly	Ala	Ile	Thr	Tyr	Ala
	1				5					10					15	
5	Ser	Leu	Ala	Ala	Ala	His	Gly	Tyr	Val	Thr	Gly	Ile	Val	Ala	Asp	Gly
				20					25					30		
10	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Tyr	Ile	Val	Thr	Gln	Tyr	Pro	Tyr	Met	Ser	Thr
			35					40					45			
15	Pro	Pro	Asp	Val	Ile	Ala	Trp	Ser	Thr	Lys	Ala	Thr	Asp	Leu	Gly	Phe
		50					55					60				
20	Val	Asp	Pro	Ser	Ser	Tyr	Ala	Ser	Ser	Asp	Ile	Ile	Cys	His	Lys	Gly
	65					70					75					80
25	Ala	Glu	Pro	Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Lys	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Thr	Val
					85					90					95	
30	Glu	Leu	Gln	Trp	Thr	Asp	Trp	Pro	Glu	Ser	His	Lys	Gly	Pro	Val	Ile
				100					105					110		
35	Asp	Tyr	Leu	Ala	Ala	Cys	Asn	Gly	Asp	Cys	Ser	Thr	Val	Asp	Lys	Thr
			115					120					125			
40	Lys	Leu	Glu	Phe	Phe	Lys	Ile	Asp	Glu	Ser	Gly	Leu	Ile	Asp	Gly	Ser
		130					135					140				
45	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Trp	Ala	Ser	Asp	Asn	Leu	Ile	Ala	Asn	Asn	Asn
	145					150					155					160
50	Ser	Trp	Thr	Val	Thr	Ile	Pro	Ser	Thr	Ile	Ala	Pro	Gly	Asn	Tyr	Val
					165					170					175	
55	Leu	Arg	His	Glu	Ile	Ile	Ala	Leu	His	Ser	Ala	Gly	Asn	Thr	Asn	Gly
				180					185					190		
60	Ala	Gln	Asn	Tyr	Pro	Gln	Cys	Ile	Asn	Leu	Glu	Val	Thr	Gly	Ser	Gly
			195					200					205			
65	Thr	Asp	Thr	Pro	Ala	Gly	Thr	Leu	Gly	Thr	Glu	Leu	Tyr	Lys	Ala	Thr
		210					215					220				

ES 2 636 216 T3

Asp Pro Gly Ile Leu Val Asn Ile Tyr Gln Thr Leu Thr Ser Tyr Asp
 225 230 235 240
 5 Ile Pro Gly Pro Ala Leu Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly
 245 250 255
 10 Ser Ser Asn Thr Ala Lys Ala Thr Thr Ser Thr Ala Ser Ser Ser Ile
 260 265 270
 15 Val Thr Pro Thr Pro Val Asn Asn Pro Thr Val Thr Gln Thr Ala Val
 275 280 285
 20 Val Asp Val Thr Gln Thr Val Ser Gln Asn Ala Ala Val Ala Thr Thr
 290 295 300
 25 Thr Pro Ala Ser Thr Ala Val Ala Thr Ala Val Pro Thr Gly Thr Thr
 305 310 315 320
 30 Phe Ser Phe Asp Ser Met Thr Ser Asp Glu Phe Val Ser Leu Met Arg
 325 330 335
 35 Ala Thr Val Asn Trp Leu Leu Ser Asn Lys Lys His Ala Arg Asp Leu
 340 345 350
 Ser Tyr
 40 <210> 15
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Aspergillus fumigatus
 <400> 15
 45 Met Thr Leu Ser Lys Ile Thr Ser Ile Ala Gly Leu Leu Ala Ser Ala
 1 5 10 15
 50 Ser Leu Val Ala Gly His Gly Phe Val Ser Gly Ile Val Ala Asp Gly
 20 25 30
 55 Lys Tyr Tyr Gly Gly Tyr Leu Val Asn Gln Tyr Pro Tyr Met Ser Asn
 35 40 45
 60 Pro Pro Asp Thr Ile Ala Trp Ser Thr Thr Ala Thr Asp Leu Gly Phe
 50 55 60

ES 2 636 216 T3

Val Asp Gly Thr Gly Tyr Gln Ser Pro Asp Ile Ile Cys His Arg Asp
 65 70 75 80
 5
 Ala Lys Asn Gly Lys Leu Thr Ala Thr Val Ala Ala Gly Ser Gln Ile
 85 90 95
 10
 Glu Phe Gln Trp Thr Thr Trp Pro Glu Ser His His Gly Pro Leu Ile
 100 105 110
 15
 Thr Tyr Leu Ala Pro Cys Asn Gly Asp Cys Ala Thr Val Asp Lys Thr
 115 120 125
 20
 Thr Leu Lys Phe Val Lys Ile Ala Ala Gln Gly Leu Ile Asp Gly Ser
 130 135 140
 25
 Asn Pro Pro Gly Val Trp Ala Asp Asp Glu Met Ile Ala Asn Asn Asn
 145 150 155 160
 30
 Thr Ala Thr Val Thr Ile Pro Ala Ser Tyr Ala Pro Gly Asn Tyr Val
 165 170 175
 35
 Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Gly Asn Leu Asn Gly
 180 185 190
 40
 Ala Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Phe Asn Ile Gln Ile Thr Gly Gly Gly
 195 200 205
 45
 Ser Ala Gln Gly Ser Gly Thr Ala Gly Thr Ser Leu Tyr Lys Asn Thr
 210 215 220
 50
 Asp Pro Gly Ile Lys Phe Asp Ile Tyr Ser Asp Leu Ser Gly Gly Tyr
 225 230 235 240
 55
 Pro Ile Pro Gly Pro Ala Leu Phe Asn Ala
 245 250
 <210> 16
 <211> 322
 <212> PRT
 <213> Penicillium pinophilum
 <400> 16

ES 2 636 216 T3

	Met	Pro	Ser	Thr	Lys	Val	Ala	Ala	Leu	Ser	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Ala
	1				5					10					15	
5	Ser	Thr	Val	Ala	Gly	His	Gly	Phe	Val	Gln	Asn	Ile	Val	Ile	Asp	Gly
				20					25					30		
10	Lys	Ser	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Leu	Val	Asn	Gln	Phe	Pro	Tyr	Glu	Ser	Asn
			35					40					45			
15	Pro	Pro	Ala	Val	Ile	Gly	Trp	Ala	Thr	Thr	Ala	Thr	Asp	Leu	Gly	Phe
		50					55						60			
20	Val	Ala	Pro	Ser	Glu	Tyr	Thr	Asn	Ala	Asp	Ile	Ile	Cys	His	Lys	Asn
	65					70					75					80
25	Ala	Thr	Pro	Gly	Ala	Leu	Ser	Ala	Pro	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Thr	Val
				85						90					95	
30	Glu	Leu	Gln	Trp	Thr	Thr	Trp	Pro	Asp	Ser	His	His	Gly	Pro	Val	Ile
				100					105					110		
35	Ser	Tyr	Leu	Ala	Asn	Cys	Asn	Gly	Asn	Cys	Ser	Thr	Val	Asp	Lys	Thr
			115					120						125		
40	Lys	Leu	Asp	Phe	Val	Lys	Ile	Asp	Gln	Gly	Gly	Leu	Ile	Asp	Asp	Thr
		130					135					140				
45	Thr	Pro	Pro	Gly	Thr	Trp	Ala	Ser	Asp	Lys	Leu	Ile	Ala	Ala	Asn	Asn
	145					150					155					160
50	Ser	Trp	Thr	Val	Thr	Ile	Pro	Ser	Thr	Ile	Ala	Pro	Gly	Asn	Tyr	Val
				165						170					175	
55	Leu	Arg	His	Glu	Ile	Ile	Ala	Leu	His	Ser	Ala	Gly	Asn	Ala	Asp	Gly
				180					185					190		
60	Ala	Gln	Asn	Tyr	Pro	Gln	Cys	Ile	Asn	Leu	Glu	Ile	Thr	Gly	Ser	Gly
			195					200					205			
65	Thr	Ala	Ala	Pro	Ser	Gly	Thr	Ala	Gly	Glu	Lys	Leu	Tyr	Thr	Ser	Thr
		210					215					220				
70	Asp	Pro	Gly	Ile	Leu	Val	Asn	Ile	Tyr	Gln	Ser	Leu	Ser	Thr	Tyr	Val

ES 2 636 216 T3

225 230 235 240

5 Ile Pro Gly Pro Thr Leu Trp Ser Gly Ala Ala Asn Gly Ala Val Ala
245 250 255

10 Thr Gly Ser Ala Thr Ala Val Ala Thr Thr Ala Thr Ala Ser Ala Thr
260 265 270

15 Ala Thr Pro Thr Thr Leu Val Thr Ser Val Ala Pro Ala Ser Ser Thr
275 280 285

Phe Ala Thr Ala Val Val Thr Thr Val Ala Pro Ala Val Thr Asp Val
290 295 300

20 Val Thr Val Thr Asp Val Val Thr Val Thr Thr Val Ile Thr Thr Thr
305 310 315 320

25 Val Leu

30 <210> 17
<211> 444
<212> PRT
<213> Thermoascus sp.

<400> 17

35 Met Leu Ser Phe Ala Ser Ala Lys Ser Ala Val Leu Thr Thr Leu Leu
1 5 10 15

40 Leu Leu Gly Ser Ala Gln Ala His Thr Leu Met Thr Thr Leu Phe Val
20 25 30

45 Asp Gly Val Asn Gln Gly Asp Gly Val Cys Ile Arg Met Asn Asn Asn
35 40 45

Gly Ser Thr Ala Asn Thr Tyr Ile Gln Pro Val Thr Ser Lys Asp Ile
50 55 60

50 Ala Cys Gly Ile Gln Gly Glu Ile Gly Ala Ala Arg Val Cys Pro Ala
65 70 75 80

55 Lys Ala Ser Ser Thr Leu Thr Phe Gln Phe Arg Glu Gln Pro Ser Asn
85 90 95

ES 2 636 216 T3

Pro Asn Ser Ala Pro Leu Asp Pro Ser His Lys Gly Pro Ala Ala Val
 100 105 110
 5
 Tyr Leu Lys Lys Val Asp Ser Ala Ile Ala Ser Asn Asn Ala Ala Gly
 115 120 125
 10 Asp Gly Trp Phe Lys Ile Trp Glu Ser Val Tyr Asp Glu Ser Thr Gly
 130 135 140
 15 Lys Trp Gly Thr Thr Lys Met Ile Glu Asn Asn Gly His Ile Ser Val
 145 150 155 160
 20 Lys Val Pro Asp Asp Ile Glu Gly Gly Tyr Tyr Leu Ala Arg Thr Glu
 165 170 175
 Leu Leu Ala Leu His Ala Ala Asn Glu Gly Asp Pro Gln Phe Tyr Val
 180 185 190
 25 Gly Cys Ala Gln Leu Phe Ile Asp Ser Ala Gly Thr Ala Lys Pro Pro
 195 200 205
 30 Thr Val Ser Ile Gly Glu Gly Thr Tyr Asp Leu Ser Met Pro Ala Met
 210 215 220
 35 Thr Tyr Asn Ile Tyr Gln Thr Pro Leu Ala Leu Pro Tyr Pro Met Tyr
 225 230 235 240
 40 Gly Pro Pro Val Tyr Thr Pro Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 245 250 255
 Ser Gly Ser Ala Ser Ala Thr Arg Ser Ser Ala Ile Pro Thr Ala Thr
 260 265 270
 45 Ala Val Thr Asp Cys Ser Ser Glu Glu Asp Arg Glu Asp Ser Val Met
 275 280 285
 50 Ala Thr Gly Val Pro Val Ala Arg Ser Thr Leu Arg Thr Trp Val Asp
 290 295 300
 55 Arg Leu Ser Trp His Gly Lys Ala Arg Glu Asn Val Lys Pro Ala Ala
 305 310 315 320

ES 2 636 216 T3

Arg Arg Ser Ala Leu Val Gln Thr Glu Gly Leu Lys Pro Glu Gly Cys
 325 330 335

5 Ile Phe Val Asn Gly Asn Trp Cys Gly Phe Glu Val Pro Asp Tyr Asn
 340 345 350

10 Asp Ala Glu Ser Cys Trp Ala Ala Ser Asp Asn Cys Trp Lys Gln Ser
 355 360 365

15 Asp Ser Cys Trp Asn Gln Thr Gln Pro Thr Gly Tyr Asn Asn Cys Gln
 370 375 380

Ile Trp Gln Asp Gln Lys Cys Lys Pro Ile Gln Asp Ser Cys Ser Gln
 385 390 395 400

20 Ser Asn Pro Thr Gly Pro Pro Asn Lys Gly Lys Asp Ile Thr Pro Thr
 405 410 415

25 Trp Pro Pro Leu Glu Gly Ser Met Lys Thr Phe Thr Lys Arg Thr Val
 420 425 430

30 Ser Tyr Arg Asp Trp Ile Met Lys Arg Lys Gly Ala
 435 440

<210> 18
 <211> 253
 35 <212> PRT
 <213> Penicillium sp.

<400> 18

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

45 Leu Leu Ser Ala Pro Leu Val Lys Ala His Gly Phe Val Gln Gly Ile
 20 25 30

50 Val Ile Gly Asp Gln Phe Tyr Ser Gly Tyr Ile Val Asn Ser Phe Pro
 35 40 45

Tyr Glu Ser Asn Pro Pro Pro Val Ile Gly Trp Ala Thr Thr Ala Thr
 50 55 60

55 Asp Leu Gly Phe Val Asp Gly Thr Gly Tyr Gln Gly Pro Asp Ile Ile
 65 70 75 80

ES 2 636 216 T3

5 Cys His Arg Asn Ala Thr Pro Ala Pro Leu Thr Ala Pro Val Ala Ala
 85 90 95
 Gly Gly Thr Val Glu Leu Gln Trp Thr Pro Trp Pro Asp Ser His His
 100 105 110
 10 Gly Pro Val Ile Thr Tyr Leu Ala Pro Cys Asn Gly Asn Cys Ser Thr
 115 120 125
 15 Val Asp Lys Thr Thr Leu Glu Phe Phe Lys Ile Asp Gln Gln Gly Leu
 130 135 140
 20 Ile Asp Asp Thr Ser Pro Pro Gly Thr Trp Ala Ser Asp Asn Leu Ile
 145 150 155 160
 25 Ala Asn Asn Asn Ser Trp Thr Val Thr Ile Pro Asn Ser Val Ala Pro
 165 170 175
 Gly Asn Tyr Val Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Asn
 180 185 190
 30 Asn Lys Asp Gly Ala Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Ile Asn Ile Glu Val
 195 200 205
 35 Thr Gly Gly Gly Ser Asp Ala Pro Glu Gly Thr Leu Gly Glu Asp Leu
 210 215 220
 40 Tyr His Asp Thr Asp Pro Gly Ile Leu Val Asp Ile Tyr Glu Pro Ile
 225 230 235 240
 45 Ala Thr Tyr Thr Ile Pro Gly Pro Pro Glu Pro Thr Phe
 245 250
 <210> 19
 <211> 223
 <212> PRT
 50 <213> Thielavia terrestris
 <400> 19
 55 Met Lys Leu Ser Ser Gln Leu Ala Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Ser
 1 5 10 15

ES 2 636 216 T3

	Val	Ser	Gly	His	Tyr	Ile	Phe	Glu	Gln	Ile	Ala	His	Gly	Gly	Thr	Lys
				20					25					30		
5	Phe	Pro	Pro	Tyr	Glu	Tyr	Ile	Arg	Arg	Asn	Thr	Asn	Tyr	Asn	Ser	Pro
			35					40					45			
10	Val	Thr	Ser	Leu	Ser	Ser	Asn	Asp	Leu	Arg	Cys	Asn	Val	Gly	Gly	Glu
		50					55					60				
15	Thr	Ala	Gly	Asn	Thr	Thr	Val	Leu	Asp	Val	Lys	Ala	Gly	Asp	Ser	Phe
	65					70					75					80
20	Thr	Phe	Tyr	Ser	Asp	Val	Ala	Val	Tyr	His	Gln	Gly	Pro	Ile	Ser	Leu
					85					90					95	
25	Tyr	Met	Ser	Lys	Ala	Pro	Gly	Ser	Val	Val	Asp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Gly
				100					105					110		
30	Ala	Ser	Trp	Pro	Leu	Arg	Asp	Asn	Tyr	Gln	Tyr	Asn	Ile	Pro	Thr	Cys
		130					135					140				
35	Ile	Pro	Asn	Gly	Glu	Tyr	Leu	Leu	Arg	Ile	Gln	Ser	Leu	Ala	Ile	His
	145					150					155					160
40	Asn	Pro	Gly	Ala	Thr	Pro	Gln	Phe	Tyr	Ile	Ser	Cys	Ala	Gln	Val	Arg
					165					170					175	
45	Val	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Pro	Ser	Pro	Thr	Ala	Lys	Ile	Pro
				180					185					190		
50	Gly	Ala	Phe	Lys	Ala	Thr	Asp	Pro	Gly	Tyr	Thr	Ala	Asn	Ile	Tyr	Asn
			195					200					205			
55	Asn	Phe	His	Ser	Tyr	Thr	Val	Pro	Gly	Pro	Ala	Val	Phe	Gln	Cys	
		210					215					220				
	<210>	20														
	<211>	246														
	<212>	PRT														
	<213>	Thielavia terrestris														

ES 2 636 216 T3

<400> 20

Met Lys Phe Ser Leu Val Ser Leu Leu Ala Tyr Gly Leu Ser Val Glu
 1 5 10 15
 5
 Ala His Ser Ile Phe Gln Arg Val Ser Val Asn Gly Gln Asp Gln Gly
 20 25 30
 10
 Leu Leu Thr Gly Leu Arg Ala Pro Ser Asn Asn Asn Pro Val Gln Asp
 35 40 45
 15
 Val Asn Ser Gln Asn Met Ile Cys Gly Gln Ser Gly Ser Lys Ser Gln
 50 55 60
 20
 Thr Val Ile Asn Val Lys Ala Gly Asp Arg Ile Gly Ser Leu Trp Gln
 65 70 75 80
 25
 His Val Ile Gly Gly Ala Gln Phe Ser Gly Asp Pro Asp Asn Pro Ile
 85 90 95
 30
 Ala His Ser His Lys Gly Pro Val Met Ala Tyr Leu Ala Lys Val Asp
 100 105 110
 35
 Asn Ala Ala Ser Ala Ser Gln Thr Gly Leu Lys Trp Phe Lys Ile Trp
 115 120 125
 40
 Gln Asp Gly Phe Asp Thr Ser Ser Lys Thr Trp Gly Val Asp Asn Leu
 130 135 140
 45
 Ile Lys Asn Asn Gly Trp Val Tyr Phe His Leu Pro Gln Cys Leu Ala
 145 150 155 160
 50
 Pro Gly Gln Tyr Leu Leu Arg Val Glu Val Leu Ala Leu His Ser Ala
 165 170 175
 55
 Tyr Gln Gln Gly Gln Ala Gln Phe Tyr Gln Ser Cys Ala Gln Ile Asn
 180 185 190
 Val Ser Gly Ser Gly Ser Phe Ser Pro Ser Gln Thr Val Ser Ile Pro
 195 200 205
 Gly Val Tyr Ser Ala Thr Asp Pro Ser Ile Leu Ile Asn Ile Tyr Gly
 210 215 220

ES 2 636 216 T3

Ser Thr Gly Gln Pro Asp Asn Gly Gly Lys Ala Tyr Asn Pro Pro Gly
 225 230 235 240

5
 Pro Ala Pro Ile Ser Cys
 245

10 <210> 21
 <211> 334
 <212> PRT
 <213> Thielavia terrestris

15 <400> 21

Met Arg Thr Thr Phe Ala Ala Ala Leu Ala Ala Phe Ala Ala Gln Glu
 1 5 10 15

20 Val Ala Gly His Ala Ile Phe Gln Gln Leu Trp His Gly Ser Ser Cys
 20 25 30

25 Val Arg Met Pro Leu Ser Asn Ser Pro Val Thr Asn Val Gly Ser Arg
 35 40 45

30 Asp Met Ile Cys Asn Ala Gly Thr Arg Pro Val Ser Gly Lys Cys Pro
 50 55 60

35 Val Lys Ala Gly Gly Thr Val Thr Val Glu Met His Gln Gln Pro Gly
 65 70 75 80

Asp Arg Ser Cys Asn Asn Glu Ala Ile Gly Gly Ala His Trp Gly Pro
 85 90 95

40 Val Gln Val Tyr Leu Ser Lys Val Glu Asp Ala Ser Thr Ala Asp Gly
 100 105 110

45 Ser Thr Gly Trp Phe Lys Ile Phe Ala Asp Thr Trp Ser Lys Lys Ala
 115 120 125

50 Gly Ser Ser Val Gly Asp Asp Asp Asn Trp Gly Thr Arg Asp Leu Asn
 130 135 140

55 Ala Cys Cys Gly Lys Met Gln Val Lys Ile Pro Ala Asp Ile Pro Ser
 145 150 155 160

Gly Asp Tyr Leu Leu Arg Ala Glu Ala Leu Ala Leu His Thr Ala Gly

ES 2 636 216 T3

				165					170							175
5	Gln	Val	Gly	Gly	Ala	Gln	Phe	Tyr	Met	Ser	Cys	Tyr	Gln	Ile	Thr	Val
				180					185					190		
10	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Pro	Ala	Thr	Val	Lys	Phe	Pro	Gly	Ala
			195					200					205			
15	Tyr	Ser	Ala	Asn	Asp	Pro	Gly	Ile	His	Ile	Asn	Ile	His	Ala	Ala	Val
		210					215					220				
20	Ser	Asn	Tyr	Val	Ala	Pro	Gly	Pro	Ala	Val	Tyr	Ser	Gly	Gly	Thr	Thr
	225					230					235					240
25	Lys	Val	Ala	Gly	Ser	Gly	Cys	Gln	Gly	Cys	Glu	Asn	Thr	Cys	Lys	Val
					245					250					255	
30	Gly	Ser	Ser	Pro	Thr	Ala	Thr	Ala	Pro	Ser	Gly	Lys	Ser	Gly	Ala	Gly
				260					265					270		
35	Ser	Asp	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Gly	Gly	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro
			275					280					285			
40	Asp	Thr	Gly	Ser	Ala	Cys	Ser	Val	Gln	Ala	Tyr	Gly	Gln	Cys	Gly	Gly
		290					295					300				
45	Asn	Gly	Tyr	Ser	Gly	Cys	Thr	Gln	Cys	Ala	Pro	Gly	Tyr	Thr	Cys	Lys
	305					310					315					320
50	Ala	Val	Ser	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Ser	Gln	Cys	Ala	Pro	Ser	Ser		
				325						330						
55	<210>	22														
	<211>	227														
	<212>	PRT														
	<213>	Thielavia terrestris														
	<400>	22														
50	Met	Lys	Leu	Ser	Val	Ala	Ile	Ala	Val	Leu	Ala	Ser	Ala	Leu	Ala	Glu
	1				5					10				15		
55	Ala	His	Tyr	Thr	Phe	Pro	Ser	Ile	Gly	Asn	Thr	Ala	Asp	Trp	Gln	Tyr
				20					25					30		

ES 2 636 216 T3

	Val	Arg	Ile	Thr	Thr	Asn	Tyr	Gln	Ser	Asn	Gly	Pro	Val	Thr	Asp	Val
			35					40					45			
5	Thr	Ser	Asp	Gln	Ile	Arg	Cys	Tyr	Glu	Arg	Asn	Pro	Gly	Thr	Gly	Ala
		50					55					60				
10	Gln	Gly	Ile	Tyr	Asn	Val	Thr	Ala	Gly	Gln	Thr	Ile	Asn	Tyr	Asn	Ala
	65					70					75				80	
15	Lys	Ala	Ser	Ile	Ser	His	Pro	Gly	Pro	Met	Ser	Phe	Tyr	Ile	Ala	Lys
					85					90					95	
20	Val	Pro	Ala	Gly	Gln	Thr	Ala	Ala	Thr	Trp	Asp	Gly	Lys	Gly	Ala	Val
				100					105					110		
25	Trp	Thr	Lys	Ile	Tyr	Gln	Asp	Met	Pro	Lys	Phe	Gly	Ser	Ser	Leu	Thr
			115					120					125			
30	Trp	Pro	Thr	Met	Gly	Ala	Lys	Ser	Val	Pro	Val	Thr	Ile	Pro	Arg	Cys
		130					135					140				
35	Leu	Gln	Asn	Gly	Asp	Tyr	Leu	Leu	Arg	Ala	Glu	His	Ile	Ala	Leu	His
	145					150					155				160	
40	Ser	Ala	Ser	Ser	Val	Gly	Gly	Ala	Gln	Phe	Tyr	Leu	Ser	Cys	Ala	Gln
					165					170					175	
45	Leu	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Thr	Trp	Asn	Pro	Lys	Asn	Arg	Val
				180					185					190		
50	Ser	Phe	Pro	Gly	Ala	Tyr	Lys	Ala	Thr	Asp	Pro	Gly	Ile	Leu	Ile	Asn
			195					200					205			
55	Ile	Tyr	Tyr	Pro	Val	Pro	Thr	Ser	Tyr	Ser	Pro	Pro	Gly	Pro	Pro	Ala
		210					215						220			
60	Glu	Thr	Cys													
	225															
65	<210>	23														
	<211>	368														
	<212>	PRT														
	<213>	Thielavia terrestris														

ES 2 636 216 T3

<400> 23

```

5  Met Pro Ser Phe Ala Ser Lys Thr Leu Leu Ser Thr Leu Ala Gly Ala
    1          5          10          15

10  Ala Ser Val Ala Ala His Gly His Val Ser Asn Ile Val Ile Asn Gly
    20          25          30

15  Val Ser Tyr Gln Gly Tyr Asp Pro Thr Ser Phe Pro Tyr Met Gln Asn
    35          40          45

15  Pro Pro Ile Val Val Gly Trp Thr Ala Ala Asp Thr Asp Asn Gly Phe
    50          55          60

20  Val Ala Pro Asp Ala Phe Ala Ser Gly Asp Ile Ile Cys His Lys Asn
    65          70          75          80

25  Ala Thr Asn Ala Lys Gly His Ala Val Val Ala Ala Gly Asp Lys Ile
    85          90          95

30  Phe Ile Gln Trp Asn Thr Trp Pro Glu Ser His His Gly Pro Val Ile
    100         105         110

35  Asp Tyr Leu Ala Ser Cys Gly Ser Ala Ser Cys Glu Thr Val Asp Lys
    115         120         125

35  Thr Lys Leu Glu Phe Phe Lys Ile Asp Glu Val Gly Leu Val Asp Gly
    130         135         140

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

45  Asn Ser Trp Leu Val Glu Ile Pro Pro Thr Ile Ala Pro Gly Asn Tyr
    165         170         175

50  Val Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Glu Asn Ala Asp
    180         185         190

55  Gly Ala Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Phe Asn Leu Gln Ile Thr Gly Thr
    195         200         205

55  Gly Thr Ala Thr Pro Ser Gly Val Pro Gly Thr Ser Leu Tyr Thr Pro
    210         215         220

```

ES 2 636 216 T3

5 Thr Asp Pro Gly Ile Leu Val Asn Ile Tyr Ser Ala Pro Ile Thr Tyr
 225 230 235 240
 Thr Val Pro Gly Pro Ala Leu Ile Ser Gly Ala Val Ser Ile Ala Gln
 245 250 255
 10 Ser Ser Ser Ala Ile Thr Ala Ser Gly Thr Ala Leu Thr Gly Ser Ala
 260 265 270
 15 Thr Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr Thr Ser Thr Thr Asn Ala
 275 280 285
 20 Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Thr Ser Thr Thr
 290 295 300
 25 Thr Thr Ser Ala Ala Ala Val Val Gln Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 305 310 315 320
 Ala Pro Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Ala Ser
 325 330 335
 30 Ala Arg Pro Thr Gly Cys Ser Ser Gly Arg Ser Arg Lys Gln Pro Arg
 340 345 350
 35 Arg His Ala Arg Asp Met Val Val Ala Arg Gly Ala Glu Glu Ala Asn
 355 360 365
 40 <210> 24
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Thielavia terrestris
 45 <400> 24
 Met Pro Pro Ala Leu Pro Gln Leu Leu Thr Thr Val Leu Thr Ala Leu
 1 5 10 15
 50 Thr Leu Gly Ser Thr Ala Leu Ala His Ser His Leu Ala Tyr Ile Ile
 20 25 30
 55 Val Asn Gly Lys Leu Tyr Gln Gly Phe Asp Pro Arg Pro His Gln Ala
 35 40 45

ES 2 636 216 T3

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

ES 2 636 216 T3

	275		280		285											
5	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Ala	Gly	Thr	Pro	Val	Val	Val	Thr	Arg	Thr	Ser
	290						295						300			
	Glu	Thr	Ala	Pro	Tyr	Thr	Gly	Ala	Met	Thr	Pro	Thr	Val	Ala	Ala	Arg
10	305					310					315					320
	Met	Lys	Gly	Arg	Gly	Tyr	Asp	Arg	Arg	Gly						
					325					330						
15	<210>	25														
	<211>	236														
	<212>	PRT														
	<213>	Thielavia terrestris														
20	<400>	25														
	Met	Lys	Thr	Phe	Thr	Ala	Leu	Leu	Ala	Ala	Ala	Gly	Leu	Val	Ala	Gly
25	1				5				10					15		
	His	Gly	Tyr	Val	Asp	Asn	Ala	Thr	Ile	Gly	Gly	Gln	Phe	Tyr	Gln	Asn
				20					25					30		
30	Pro	Ala	Val	Leu	Thr	Phe	Phe	Gln	Pro	Asp	Arg	Val	Ser	Arg	Ser	Ile
			35					40					45			
35	Pro	Gly	Asn	Gly	Pro	Val	Thr	Asp	Val	Thr	Leu	Ile	Asp	Leu	Gln	Cys
	50						55					60				
40	Asn	Ala	Asn	Ser	Thr	Pro	Ala	Lys	Leu	His	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly
	65					70				75						80
	Ser	Asp	Val	Ile	Leu	Arg	Trp	Thr	Leu	Trp	Pro	Glu	Ser	His	Val	Gly
45					85					90					95	
	Pro	Val	Ile	Thr	Tyr	Met	Ala	Arg	Cys	Pro	Asp	Thr	Gly	Cys	Gln	Asp
				100					105					110		
50	Trp	Met	Pro	Gly	Thr	Ser	Ala	Val	Trp	Phe	Lys	Ile	Lys	Glu	Gly	Gly
			115					120					125			
55	Arg	Asp	Gly	Thr	Ser	Asn	Thr	Trp	Ala	Asp	Thr	Pro	Leu	Met	Thr	Ala
	130						135					140				

ES 2 636 216 T3

Pro Thr Ser Tyr Thr Tyr Thr Ile Pro Ser Cys Leu Lys Lys Gly Tyr
 145 150 155 160
 5
 Tyr Leu Val Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ala Ala Tyr Thr Tyr
 165 170 175
 10 Pro Gly Ala Gln Phe Tyr Pro Gly Cys His Gln Leu Asn Val Thr Gly
 180 185 190
 15 Gly Gly Ser Thr Val Pro Ser Ser Gly Leu Val Ala Phe Pro Gly Ala
 195 200 205
 20 Tyr Lys Gly Ser Asp Pro Gly Ile Thr Tyr Asp Ala Tyr Lys Ala Gln
 210 215 220
 25 Thr Tyr Gln Ile Pro Gly Pro Ala Val Phe Thr Cys
 225 230 235
 30
 <210> 26
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Thielavia terrestris
 35 Met Ala Leu Leu Leu Leu Ala Gly Leu Ala Ile Leu Ala Gly Pro Ala
 1 5 10 15
 40 His Ala His Gly Gly Leu Ala Asn Tyr Thr Val Gly Asn Thr Trp Tyr
 20 25 30
 45 Arg Gly Tyr Asp Pro Phe Thr Pro Ala Ala Asp Gln Ile Gly Gln Pro
 35 40 45
 50 Trp Met Ile Gln Arg Ala Trp Asp Ser Ile Asp Pro Ile Phe Ser Val
 50 55 60
 55 Asn Asp Lys Ala Leu Ala Cys Asn Thr Pro Ala Thr Ala Pro Thr Ser
 65 70 75 80
 Tyr Ile Pro Ile Arg Ala Gly Glu Asn Ile Thr Ala Val Tyr Trp Tyr
 85 90 95
 60 Trp Leu His Pro Val Gly Pro Met Thr Ala Trp Leu Ala Arg Cys Asp

ES 2 636 216 T3

		100						105								110
5	Gly	Asp	Cys	Arg	Asp	Ala	Asp	Val	Asn	Glu	Ala	Arg	Trp	Phe	Lys	Ile
			115					120					125			
10	Trp	Glu	Ala	Gly	Leu	Leu	Ser	Gly	Pro	Asn	Leu	Ala	Glu	Gly	Met	Trp
		130					135					140				
15	Tyr	Gln	Lys	Ala	Phe	Gln	Asn	Trp	Asp	Gly	Ser	Pro	Asp	Leu	Trp	Pro
	145					150					155					160
20	Val	Thr	Ile	Pro	Ala	Gly	Leu	Lys	Ser	Gly	Leu	Tyr	Met	Ile	Arg	His
					165					170					175	
25	Glu	Ile	Leu	Ser	Ile	His	Val	Glu	Asp	Lys	Pro	Gln	Phe	Tyr	Pro	Glu
				180					185					190		
30	Cys	Ala	His	Leu	Asn	Val	Thr	Gly	Gly	Gly	Asp	Leu	Leu	Pro	Pro	Asp
			195					200					205			
35	Glu	Phe	Leu	Val	Lys	Phe	Pro	Gly	Ala	Tyr	Lys	Glu	Asp	Asn	Pro	Ser
		210					215					220				
40	Ile	Lys	Ile	Asn	Ile	Tyr	Ser	Asp	Gln	Tyr	Ala	Asn	Thr	Thr	Asn	Tyr
	225					230					235					240
45	Thr	Ile	Pro	Gly	Gly	Pro	Ile	Trp	Asp	Gly						
					245					250						
50	<210>	27														
	<211>	478														
	<212>	PRT														
	<213>	Thielavia terrestris														
55	<400>	27														
	Met	Met	Pro	Ser	Leu	Val	Arg	Phe	Ser	Met	Gly	Leu	Ala	Thr	Ala	Phe
	1				5					10					15	
50	Ala	Ser	Leu	Ser	Thr	Ala	His	Thr	Val	Phe	Thr	Thr	Leu	Phe	Ile	Asn
				20					25					30		
55	Gly	Val	Asp	Gln	Gly	Asp	Gly	Thr	Cys	Ile	Arg	Met	Ala	Lys	Lys	Gly
			35					40					45			

ES 2 636 216 T3

Ser Val Cys Thr His Pro Ile Ala Gly Gly Leu Asp Ser Pro Asp Met
 50 55 60

5

Ala Cys Gly Arg Asp Gly Gln Gln Ala Val Ala Phe Thr Cys Pro Ala
 65 70 75 80

10

Pro Ala Gly Ser Lys Leu Ser Phe Glu Phe Arg Met Trp Ala Asp Ala
 85 90 95

15

Ser Gln Pro Gly Ser Ile Asp Pro Ser His Leu Gly Ser Thr Ala Ile
 100 105 110

20

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

25

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

30

Trp Ala Thr Glu Lys Leu Ile Asp Asn Gly Gly Leu Leu Ser Ile Glu
 145 150 155 160

35

Leu Pro Pro Thr Leu Pro Ala Gly Tyr Tyr Leu Ala Arg Ser Glu Ile
 165 170 175

40

Val Thr Ile Gln Asn Val Thr Asn Asp His Val Asp Pro Gln Phe Tyr
 180 185 190

45

Val Gly Cys Ala Gln Leu Phe Val Gln Gly Pro Pro Thr Thr Pro Thr
 195 200 205

50

Val Pro Pro Asp Arg Leu Val Ser Ile Pro Gly His Val His Ala Ser
 210 215 220

55

Asp Pro Gly Leu Thr Phe Asn Ile Trp Arg Asp Asp Pro Ser Lys Thr
 225 230 235 240

60

Ala Tyr Thr Val Val Gly Pro Ala Pro Phe Ser Pro Thr Ala Ala Pro
 245 250 255

65

Thr Pro Thr Ser Thr Asn Thr Asn Gly Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 260 265 270

ES 2 636 216 T3

Gln Ala Ile Lys Gln Thr Asp Gly Val Ile Pro Ala Asp Cys Gln Leu
 275 280 285

5 Lys Asn Ala Asn Trp Cys Gly Ala Glu Val Pro Ala Tyr Ala Asp Glu
 290 295 300

10 Ala Gly Cys Trp Ala Ser Ser Ala Asp Cys Phe Ala Gln Leu Asp Ala
 305 310 315 320

15 Cys Tyr Thr Ser Ala Pro Pro Thr Gly Ser Arg Gly Cys Arg Leu Trp
 325 330 335

20 Glu Asp Trp Cys Thr Gly Ile Gln Gln Gly Cys Arg Ala Gly Arg Trp
 340 345 350

Arg Gly Pro Pro Pro Phe His Gly Glu Gly Ala Ala Ala Glu Thr Ala
 355 360 365

25 Ser Ala Gly Arg Gly Gly Ala Arg Ile Ala Ala Val Ala Gly Cys Gly
 370 375 380

30 Gly Gly Thr Gly Asp Met Val Glu Glu Val Phe Leu Phe Tyr Trp Asp
 385 390 395 400

35 Ala Cys Ser Gly Trp Arg Arg Ser Arg Gly Gly Gly Ser Ile Leu Ala
 405 410 415

40 Arg Leu Ile Leu His Val Leu Leu Pro Leu Leu Arg Pro Arg Arg Ala
 420 425 430

45 Pro Arg Val His Leu Leu Leu Phe His Leu Tyr Leu Asn Phe Cys Tyr
 435 440 445

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

50 Trp Pro Ser Lys Met Ser Pro Asp Val Ala His Tyr Val Lys
 465 470 475

<210> 28
 <211> 230
 55 <212> PRT
 <213> Thielavia terrestris

ES 2 636 216 T3

<400> 28

5 Met Gln Leu Leu Val Gly Leu Leu Leu Ala Ala Val Ala Ala Arg Ala
 1 5 10 15
 His Tyr Thr Phe Pro Arg Leu Val Val Asn Gly Gln Pro Glu Asp Lys
 20 25 30
 10 Asp Trp Ser Val Thr Arg Met Thr Lys Asn Ala Gln Ser Lys Gln Gly
 35 40 45
 15 Val Gln Asp Pro Thr Ser Pro Asp Ile Arg Cys Tyr Thr Ser Gln Thr
 50 55 60
 20 Ala Pro Asn Val Ala Thr Val Pro Ala Gly Ala Thr Val His Tyr Ile
 65 70 75 80
 Ser Thr Gln Gln Ile Asn His Pro Gly Pro Thr Gln Tyr Tyr Leu Ala
 85 90 95
 25 Lys Val Pro Ala Gly Ser Ser Ala Lys Thr Trp Asp Gly Ser Gly Ala
 100 105 110
 30 Val Trp Phe Lys Ile Ser Thr Thr Met Pro Tyr Leu Asp Asn Asn Lys
 115 120 125
 35 Gln Leu Val Trp Pro Asn Gln Asn Thr Tyr Thr Thr Val Asn Thr Thr
 130 135 140
 40 Ile Pro Ala Asp Thr Pro Ser Gly Glu Tyr Leu Leu Arg Val Glu Gln
 145 150 155 160
 Ile Ala Leu His Leu Ala Ser Gln Pro Asn Gly Ala Gln Phe Tyr Leu
 165 170 175
 45 Ala Cys Ser Gln Ile Gln Ile Thr Gly Gly Gly Asn Gly Thr Pro Gly
 180 185 190
 50 Pro Leu Val Ala Leu Pro Gly Ala Tyr Lys Ser Asn Asp Pro Gly Ile
 195 200 205
 55 Leu Val Asn Ile Tyr Ser Met Gln Pro Gly Asp Tyr Lys Pro Pro Gly
 210 215 220

ES 2 636 216 T3

Pro Pro Val Trp Ser Gly
225 230

5

<210> 29
<211> 257
<212> PRT
<213> Thielavia terrestris

10

<400> 29

Met Lys Leu Tyr Leu Ala Ala Phe Leu Gly Ala Val Ala Thr Pro Gly
1 5 10 15

15

Ala Phe Ala His Gln Ile His Gly Ile Leu Leu Val Asn Gly Thr Glu
20 25 30

20

Thr Pro Glu Trp Lys Tyr Val Arg Asp Val Ala Trp Glu Gly Ala Tyr
35 40 45

25

Glu Pro Glu Lys Tyr Pro Asn Thr Glu Phe Phe Lys Thr Pro Pro Gln
50 55 60

30

Thr Asp Ile Asn Asn Pro Asn Ile Thr Cys Gly Arg Asn Ala Phe Asp
65 70 75 80

35

Ser Ala Ser Lys Thr Glu Thr Ala Asp Ile Leu Ala Gly Ser Glu Val
85 90 95

40

Gly Phe Arg Val Ser Trp Asp Gly Asn Gly Lys Tyr Gly Val Phe Trp
100 105 110

45

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

50

Leu Glu Asp Tyr Arg Gly Asp Gly Asp Trp Phe Lys Ile Ala Thr Gly
130 135 140

55

Ala Ala Val Ser Asn Thr Glu Trp Leu Leu Trp Asn Lys His Asp Phe
145 150 155 160

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

Ile Glu Gln Phe Met Pro Ser Thr Val Glu Tyr Ser Gln Trp Tyr Val

ES 2 636 216 T3

				180					185							190
5	Asn	Cys	Ala	His	Val	Asn	Ile	Ile	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Thr	Pro	Thr
			195					200					205			
10	Gly	Phe	Ala	Arg	Phe	Pro	Gly	Thr	Tyr	Thr	Val	Asp	Asp	Pro	Gly	Ile
		210					215					220				
15	Lys	Val	Pro	Leu	Asn	Gln	Ile	Val	Asn	Ser	Gly	Glu	Leu	Pro	Gln	Asp
	225					230					235					240
20	Gln	Leu	Arg	Leu	Leu	Glu	Tyr	Lys	Pro	Pro	Gly	Pro	Ala	Leu	Trp	Thr
				245						250					255	
25	<210>	30														
	<211>	251														
	<212>	PRT														
	<213>	Thermoascus crustaceus														
30	<400>	30														
35	Met	Ala	Phe	Ser	Gln	Ile	Met	Ala	Ile	Thr	Gly	Val	Phe	Leu	Ala	Ser
	1				5					10					15	
40	Ala	Ser	Leu	Val	Ala	Gly	His	Gly	Phe	Val	Gln	Asn	Ile	Val	Ile	Asp
				20					25						30	
45	Gly	Lys	Ser	Tyr	Gly	Gly	Tyr	Ile	Val	Asn	Gln	Tyr	Pro	Tyr	Met	Ser
			35					40					45			
50	Asp	Pro	Pro	Glu	Val	Val	Gly	Trp	Ser	Thr	Thr	Ala	Thr	Asp	Leu	Gly
	50						55					60				
55	Phe	Val	Asp	Gly	Thr	Gly	Tyr	Gln	Gly	Pro	Asp	Ile	Ile	Cys	His	Arg
	65					70					75					80
60	Gly	Ala	Lys	Pro	Ala	Ala	Leu	Thr	Ala	Gln	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Thr
					85					90					95	
65	Val	Lys	Leu	Glu	Trp	Thr	Pro	Trp	Pro	Asp	Ser	His	His	Gly	Pro	Val
				100					105					110		

ES 2 636 216 T3

Ile Asn Tyr Leu Ala Pro Cys Asn Gly Asp Cys Ser Thr Val Asp Lys
 115 120 125

5
 Thr Gln Leu Lys Phe Phe Lys Ile Ala Gln Ala Gly Leu Ile Asp Asp
 130 135 140

10
 Asn Ser Pro Pro Gly Ile Trp Ala Ser Asp Asn Leu Ile Ala Ala Asn
 145 150 155 160

15
 Asn Ser Trp Thr Val Thr Ile Pro Thr Thr Thr Ala Pro Gly Asn Tyr
 165 170 175

20
 Val Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Gly Asn Lys Asp
 180 185 190

25
 Gly Ala Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Ile Asn Leu Lys Val Thr Gly Asn
 195 200 205

30
 Asp Thr Asp Pro Gly Ile Leu Ile Asn Ile Tyr Gln Lys Leu Ser Ser
 225 230 235 240

35
 Tyr Val Ile Pro Gly Pro Ala Leu Tyr Thr Gly
 245 250

40
 <210> 31
 <211> 349
 <212> PRT
 <213> Thermoascus crustaceus

<400> 31

45
 Met Ser Phe Ser Lys Ile Leu Ala Ile Ala Gly Ala Ile Thr Tyr Ala
 1 5 10 15

50
 Ser Ser Ala Ala Ala His Gly Tyr Val Gln Gly Ile Val Val Asp Gly
 20 25 30

55
 Ser Tyr Tyr Gly Gly Tyr Met Val Thr Gln Tyr Pro Tyr Thr Ala Gln
 35 40 45

Pro Pro Glu Leu Ile Ala Trp Ser Thr Lys Ala Thr Asp Leu Gly Phe

ES 2 636 216 T3

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

ES 2 636 216 T3

Ala Ser Val Ala Ala Thr Thr Pro Ala Ser Thr Ser Ala Val Thr Ala
 290 295 300
 5
 Ser Pro Ala Pro Asp Thr Gly Ser Asp Val Thr Lys Tyr Leu Asp Ser
 305 310 315 320
 10
 Met Ser Ser Asp Glu Val Leu Thr Leu Val Arg Gly Thr Leu Ser Trp
 325 330 335
 15
 Leu Val Ser Asn Lys Lys His Ala Arg Asp Leu Ser His
 340 345
 20
 <210> 32
 <211> 436
 <212> PRT
 <213> Thermoascus crustaceus
 <400> 32
 25
 Met Leu Ser Phe Ile Pro Thr Lys Ser Ala Ala Leu Thr Thr Leu Leu
 1 5 10 15
 30
 Leu Leu Gly Thr Ala His Ala His Thr Leu Met Thr Thr Met Phe Val
 20 25 30
 35
 Asp Gly Val Asn Gln Gly Asp Gly Val Cys Ile Arg Met Asn Asn Asp
 35 40 45
 40
 Gly Gly Thr Ala Asn Thr Tyr Ile Gln Pro Ile Thr Ser Lys Asp Ile
 50 55 60
 45
 Ala Cys Gly Ile Gln Gly Glu Ile Gly Ala Ser Arg Val Cys Pro Val
 65 70 75 80
 50
 Lys Ala Ser Ser Thr Leu Thr Phe Gln Phe Arg Glu Gln Pro Asn Asn
 85 90 95
 55
 Pro Asn Ser Ser Pro Leu Asp Pro Ser His Lys Gly Pro Ala Ala Val
 100 105 110
 55
 Tyr Leu Lys Lys Val Asp Ser Ala Ile Ala Ser Asn Asn Ala Ala Gly
 115 120 125

ES 2 636 216 T3

	Asp	Ser	Trp	Phe	Lys	Ile	Trp	Glu	Ser	Val	Tyr	Asp	Glu	Ser	Thr	Gly
	130						135					140				
5	Lys	Trp	Gly	Thr	Thr	Lys	Met	Ile	Glu	Asn	Asn	Gly	His	Ile	Ser	Val
	145					150					155					160
10	Lys	Val	Pro	Asp	Asp	Ile	Glu	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Ala	Arg	Thr	Glu
					165					170					175	
15	Leu	Leu	Ala	Leu	His	Ser	Ala	Asp	Gln	Gly	Asp	Pro	Gln	Phe	Tyr	Val
				180					185					190		
20	Gly	Cys	Ala	Gln	Leu	Phe	Ile	Asp	Ser	Asp	Gly	Thr	Ala	Lys	Pro	Pro
			195					200					205			
25	Thr	Val	Ser	Ile	Gly	Glu	Gly	Thr	Tyr	Asp	Leu	Ser	Met	Pro	Ala	Met
		210					215					220				
30	Thr	Tyr	Asn	Ile	Trp	Glu	Thr	Pro	Leu	Ala	Leu	Pro	Tyr	Pro	Met	Tyr
	225					230					235					240
35	Gly	Pro	Pro	Val	Tyr	Thr	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Val	Arg	Ala
					245					250					255	
40	Thr	Ser	Ser	Ser	Ala	Val	Pro	Thr	Ala	Thr	Glu	Ser	Ser	Phe	Val	Glu
				260					265					270		
45	Glu	Arg	Ala	Asn	Pro	Val	Thr	Ala	Asn	Ser	Val	Tyr	Ser	Ala	Arg	Gly
			275					280					285			
50	Lys	Phe	Lys	Thr	Trp	Ile	Asp	Lys	Leu	Ser	Trp	Arg	Gly	Lys	Val	Arg
		290					295					300				
55	Glu	Asn	Val	Arg	Gln	Ala	Ala	Gly	Arg	Arg	Ser	Thr	Leu	Val	Gln	Thr
	305					310					315					320
60	Val	Gly	Leu	Lys	Pro	Lys	Gly	Cys	Ile	Phe	Val	Asn	Gly	Asn	Trp	Cys
					325					330					335	
65	Gly	Phe	Glu	Val	Pro	Asp	Tyr	Asn	Asp	Ala	Glu	Ser	Cys	Trp	Ala	Ala
				340					345					350		
70	Ser	Asp	Asn	Cys	Trp	Lys	Gln	Ser	Asp	Ala	Cys	Trp	Asn	Lys	Thr	Gln

ES 2 636 216 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Proceso de producción de un producto de fermentación, que comprende la conversión de un material que contiene almidón a una dextrina con una alfa-amilasa; sacarificación de la dextrina a un azúcar con una enzima de
 5 sacarificación; y fermentación del azúcar utilizando un organismo de fermentación en presencia de un polipéptido de familia de glicósido hidrolasa 61 en un paso único a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial del material que contiene almidón, donde el polipéptido de familia glicósido hidrolasa 61 está presente en una
 10 cantidad que resulta en una cantidad superior del producto de fermentación que la cantidad de fermentación producida por el mismo proceso sin el polipéptido de familia glicósido hidrolasa 61, donde el polipéptido de familia glicósido hidrolasa 61 comprende los motivos siguientes:

[ILMV]-P-X(4,5)-G-X-Y-[ILMV]-X-R-X-[EQ]-X(4)-[HNQ] y [FW]-[TF]-K-[AIV],

15 donde X es cualquier aminoácido, X (4,5) es cualquier cuatro o cinco aminoácidos contiguos y X (4) es cualquier cuatro aminoácidos contiguos.

2. Proceso de producción de un producto de fermentación, que comprende la conversión de un material que contiene almidón a una dextrina con una alfa-amilasa; sacarificación de la dextrina a un azúcar con una enzima de
 20 sacarificación; y fermentación del azúcar utilizando un organismo de fermentación en presencia de un polipéptido de familia glicósido hidrolasa 61 en un paso único a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial del material que contiene almidón, donde el polipéptido de familia glicósido hidrolasa 61 está presente en una
 25 cantidad que resulta en una cantidad menor de disacárido que la cantidad de disacárido producida por el mismo proceso sin el polipéptido de familia glicósido hidrolasa 61, donde el polipéptido de familia glicósido hidrolasa 61 comprende los motivos siguientes:

[ILMV]-P-X(4,5)-G-X-Y-[ILMV]-X-R-X-[EQ]-X(4)-[HNQ] y [FW]-[TF]-K-[AIV],

30 donde X es cualquier aminoácido, X (4,5) es cualquier cuatro o cinco aminoácidos contiguos y X (4) es cualquier cuatro aminoácidos contiguos.

3. Proceso, según la reivindicación 1 o 2, donde la enzima de sacarificación es una beta-amilasa, glucoamilasa o alfa-amilasa maltogénica.

35 4. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que se realiza en presencia de una pululanasa y/o una isoamilasa.

5. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que se realiza en presencia de una proteasa.

40 6. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que se realiza a una temperatura de 20-40°C.

7. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el material que contiene almidón está seleccionado del grupo que consiste en cebada, alubias, mandioca, cereales, maíz, sorgo, guisantes, patatas, arroz, centeno, sagú, sorgo, patatas dulces, tapioca, trigo y granos enteros o cualquier mezcla de los mismos.

45 8. Proceso; según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el organismo fermentador es una levadura.

9. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde el producto de fermentación está seleccionado del grupo que consiste en alcoholes (por ejemplo, butanol, etanol, metanol, 1,3-propanediol) ácidos orgánicos (por
 50 ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido itacónico, ácido glucónico, gluconato, ácido láctico, ácido succínico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico); cetonas (por ejemplo, de acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H₂ y CO₂) y compuestos más complejos, que incluyen, por ejemplo, antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B12, beta-caroteno); y hormonas.

55 10. Proceso, según la reivindicación 9, donde el producto de fermentación es etanol.

11. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además la recuperación del producto de fermentación.

60 12. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el polipéptido de familia glicósido hidrolasa 61 tiene al menos 70% de identidad de secuencia con cualquier SEQ ID N. °: 25, por ejemplo, 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.

13. Proceso, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el polipéptido de familia glicósido hidrolasa 61 se deriva de *Aurantiporus alborubescens*.