(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 644 727**

(51) Int. CI.:

***C12P 1/04*** (2006.01)
***C12P 7/06*** (2006.01)
***C12N 9/54*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.11.2012 PCT/US2012/067380**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.06.2013 WO13082486**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.11.2012 E 12799456 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2785847**

(54) Título: **Proceso de licuefacción con alfa-amilasas y proteasas seleccionadas**

(30) Prioridad:

**02.12.2011 US 201161566281 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**30.11.2017**

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**DEINHAMMER, RANDALL;**
**CRAIG, JOYCE;**
**MATSUI, TOMOKO;**
**TAKAGI, SHINOBU;**
**CLARK, SUZANNE;**
**MATTHEWS, JOHN;**
**HJULMAND, ANNE GLUD y**
**SOONG, CHEE-LEONG**

(74) Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

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

## DESCRIPCIÓN

Proceso de licuefacción con alfa-amilasas y proteasas seleccionadas

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a procesos para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón. La invención también se refiere a una composición adecuada para su uso en un proceso de la invención. Los procesos y las composiciones se caracterizan por una combinación particular de alfa-amilasas y proteasas.

Listado de secuencias

[0002] Esta patente contiene un listado de secuencias.

Antecedentes de la invención

[0003] La producción de productos de fermentación, tales como etanol, a partir de material que contiene almidón es bien conocida en la técnica. Industrialmente, hoy en día se usan dos tipos diferentes de procesos. El proceso usado más frecuentemente, normalmente denominado "proceso convencional", incluye almidón gelatinizado de licuefacción a alta temperatura que utiliza típicamente una alfa-amilasa bacteriana, seguido de sacarificación y fermentación simultánea realizada en presencia de una glucoamilasa y un organismo de fermentación. Otro proceso bien conocido, a menudo denominado proceso de "hidrólisis de almidón en crudo" (proceso RSH), incluye simultáneamente sacarificación y fermentación de almidón granulado por debajo de la temperatura de gelatinización inicial típicamente en presencia de al menos una glucoamilasa.

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

[0005] La WO 2011/072191 (Novozymes) se refiere a variantes de proteasa con termoestabilidad mejorada derivadas de *Thermoascus aurantiacus*.

[0006] La WO 2006/086792 (Novozymes) se refiere a procesos de producción de los productos de fermentación a partir de material que contiene almidón que comprenden un paso de licuefacción donde una alfa-amilasa y una proteasa están presentes durante la licuefacción.

[0007] La WO 2012/088303 (Novozymes, publicada el 28 de junio de 2012) se refiere a procesos de producción de los productos de fermentación a partir de material que contiene almidón, donde la licuefacción se realiza a un pH en el rango de 4,5-5,0 en presencia de una alfa-amilasa termoestable y una proteasa termoestable.

[0008] Por lo tanto, sigue habiendo un deseo y una necesidad de suministrar procesos para producir productos de fermentación, tales como etanol, a partir de material que contiene almidón que puede proporcionar un rendimiento más alto del producto de fermentación, u otras ventajas, en comparación con un proceso convencional.

Resumen de la invención

[0009] La presente invención se refiere a procesos de producción de productos de fermentación, tales como etanol, a partir de material que contiene almidón que incluyen las etapas de:

i) licuefacción del material que contiene almidón a un pH en el rango de por encima de 5,0 a 7,0 a una temperatura por encima de la temperatura de gelatinización inicial usando:

- una alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1;
- una proteasa con al menos 80% de identidad con SEQ ID N.º: 13 y que tiene un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C; y

ii) sacarificación utilizando una enzima generadora de fuente de carbohidratos;
iii) fermentación utilizando un organismo fermentador.

[0010] En una forma de realización preferida, la licuefacción se realiza a una temperatura de 80-90°C, tal como alrededor de 85°C. En una forma de realización preferida, la licuefacción se realiza a un pH de en el rango de pH por encima de 5,0 a 6,0.

[0011] En un segundo aspecto, la invención se refiere a una composición enzimática que comprende:

i) una alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1;
ii) una proteasa que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID N.º: 13 y que tiene un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C.

Breve descripción de las figuras

[0012] La figura 1 muestra una comparación del rendimiento de fermentación de etanol de 54 horas (%) para alfa-amilasa 1407 con y sin proteasa Pfu y/o glucoamilasa PE001 añadida durante la licuefacción a pH 5,4 y 5,8, respectivamente, a 85°C durante 2 horas.

Descripción detallada de la invención

[0013] Se describen los procesos para producir productos de fermentación, tales como etanol, a partir de material que contiene almidón utilizando un organismo fermentador.

[0014] Los inventores han descubrieron que se obtiene un rendimiento de etanol aumentado cuando se licúa material que contiene almidón con una alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* madura descrita en SEQ ID N.º: 1 aquí que tiene una deleción doble (I181* + G182*) y sustitución N193F junto con proteasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu S) a 85°C, a pH 5,4 o 5,8 durante 2 horas.

[0015] En el primer aspecto, la invención se refiere a procesos para producir productos de fermentación, preferiblemente etanol, que incluyen las etapas de:

i) licuefacción del material que contiene almidón a un pH en el rango de 5,0 a 7,0 a una temperatura por encima de la temperatura de gelatinización inicial usando:

- una alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1;
- una proteasa que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID N.º: 13 y que tiene un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C; y

ii) sacarificación utilizando una enzima generadora de fuente de carbohidratos;
iii) fermentación utilizando un organismo fermentador.

[0016] Los pasos ii) y iii) se realizan bien consecutiva o simultáneamente. En una forma de realización preferida, los pasos ii) e iii) se realizan simultáneamente. La alfa-amilasa, la proteasa termoestable y opcionalmente una enzima generadora de fuente de carbohidratos, preferiblemente glucoamilasa, y/o opcionalmente una pululanasa se pueden adicionar antes y/o durante el paso de licuefacción i). Una composición de la invención se puede usar adecuadamente en un proceso de la invención. Sin embargo, las enzimas también se pueden adicionar separadamente. Ejemplos de alfa-amilasas se pueden encontrar en la sección "Alfa-amilasa presente y/o añadida durante la licuefacción" más adelante. Ejemplos de proteasas termoestables se pueden encontrar en la sección "Proteasa presente y/o añadida durante la licuefacción" más adelante. Ejemplos de enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos opcionales adecuada, enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos preferiblemente termoestables, en particular una glucoamilasa termoestable, se pueden encontrar en la sección "Enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos presentes y/o añadidas durante la licuefacción" más adelante. Una pululanasa opcional adecuada se puede encontrar en la sección "Pululanasa presente y/o añadida durante la licuefacción" más adelante.

[0017] El pH durante la licuefacción está por encima de 5,0 a 7,0. Tal como por encima de 5,0-6,5, tal como entre 5,2-6,2, tal como entre pH 5,0-6,0, tal como alrededor de 5,2, tal como alrededor de 5,4, tal como alrededor de 5,6, tal como alrededor de 5,8. En una forma de realización, el pH está entre 5,0 y 5,5.

[0018] Según la invención, la temperatura está por encima de la temperatura de gelatinización inicial. El término "temperatura de gelatinización inicial" se refiere a la temperatura mínima en la que la solubilización de almidón, típicamente por calentamiento, empieza. La temperatura puede variar para almidones diferentes.

[0019] En una forma de realización, la temperatura durante la etapa de licuefacción i) está en el rango de 70-100°C, tal como entre 75-95°C, tal como entre 75-90°C, preferiblemente entre 80-90°C, tal como alrededor de 85°C.

[0020] En una forma de realización, el proceso de la invención comprende además, antes de la etapa i), los pasos de:

a) reducción del tamaño de partícula del material que contiene almidón, preferiblemente por fresado en seco;

b) formación de un lodo que comprende el material que contiene almidón y agua.

[0021] La materia prima que contiene almidón, tal como granos enteros, se pueden reducir en tamaño de partícula, por ejemplo, por fresado, para abrir la estructura, para aumentar el área de superficie y permitir posterior tratamiento. Generalmente hay dos tipos de procesos: molienda en seco y en húmedo. En la molienda en seco los granos enteros se muelen y usan. La molienda en húmedo da una separación buena del germen y la harina (gránulos de almidón y proteína). La molienda en húmedo se aplica frecuentemente en ubicaciones en las que el hidrolizado de almidón se usa en la producción de, por ejemplo, jarabes. Tanto la molienda en seco como en húmedo se conocen bien en la técnica del tratamiento de almidón. Según la presente invención, se prefiere la molienda en seco. En una forma de realización, el tamaño de partícula se reduce a entre 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente 0,1-0,5 mm, o al menos 30%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 70%, aún más preferiblemente al menos 90% del material que contiene almidón que pasa a través de una criba con una pantalla de 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente una pantalla de 0,1-0,5 mm. En otra forma de realización, al menos 50%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, especialmente al menos 90% del material que contiene almidón que pasa a través de una criba con una pantalla # 6.

[0022] El lodo acuoso puede contener de 10-55 p/p-% de sólidos secos (DS), preferiblemente 25-45 p/p-% de sólidos secos (DS), más preferiblemente 30-40 p/p-% de sólidos secos (DS) de material que contiene almidón.

[0023] El lodo se puede calentar por encima de la temperatura de gelatinización inicial, preferiblemente entre 80-90°C, entre pH 5,0-7,0, preferiblemente entre 5,0 y 6,0, durante 30 minutos a 5 horas, tal como alrededor de 2 horas.

[0024] La alfa-amilasa, la proteasa termoestable y la enzima generadora de fuente de carbohidratos opcional, en particular la glucoamilasa termoestable, y/o la pululanasa opcional se puede añadir inicialmente al lodo acuoso para iniciar la licuefacción (adelgazamiento). En una forma de realización, solo una porción de las enzima se añade al lodo acuoso, mientras que el resto de las enzimas se agregan durante el paso de licuefacción i).

[0025] El paso de licuefacción i) se realiza según la invención durante 0,5-5 horas, tal como 1-3 horas, tal como típicamente alrededor de 2 horas.

[0026] El lodo acuoso puede, en una forma de realización, ser cocido a chorro para gelatinizar adicionalmente el lodo antes de someterlo a la etapa de licuefacción i). La cocción por chorro se puede realizar a una temperatura entre 110-145°C, preferiblemente 120-140°C, tal como 125-135°C, preferiblemente alrededor de 130°C durante aproximadamente 1-15 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 3-10 minutos, especialmente alrededor de aproximadamente 5 minutos.

Sacarificación y fermentación

[0027] Una o más enzimas generadoras de fuente de carbohidratos, en particular glucoamilasa, pueden estar presentes y/o añadirse durante la etapa de sacarificación ii) y/o la etapa de fermentación iii). La enzima generadora de fuente de carbohidratos puede preferiblemente ser una glucoamilasa, pero también puede ser una enzima seleccionada del grupo que consiste en: beta-amilasa, amilasa maltogénica y alfa-glucosidasa. La enzima generadora de fuente de carbohidratos añadida durante la etapa de sacarificación ii) y/o la etapa de fermentación iii) es diferente típicamente de la enzima generadora de fuente de carbohidratos opcional, en particular glucoamilasa termoestable, adicionada opcionalmente durante la etapa de licuefacción i). En una forma de realización, las enzimas generadoras de fuente de carbohidratos, en particular glucoamilasa, se añaden junto con una alfa-amilasa fúngica.

[0028] Ejemplos de enzimas generadoras de fuente de carbohidratos, incluyendo glucoamilasas, se pueden encontrar en la sección "Enzima generadora de fuente de carbohidratos presente y/o añadidas durante la sacarificación y/o la fermentación" más adelante.

[0029] Cuando se realiza la sacarificación y fermentación secuencial, la etapa de sacarificación ii) se puede realizar en condiciones bien conocida en la técnica. Por ejemplo, la etapa de sacarificación ii) puede durar aproximadamente de 24 a aproximadamente 72 horas. En una forma de realización, se realiza pre-sacarificación. La pre-sacarificación se realiza típicamente durante 40-90 minutos a una temperatura de 30-65°C, típicamente aproximadamente 60°C. La pre-sacarificación viene seguida de sacarificación durante la fermentación en la sacarificación y fermentación simultánea (SSF). La sacarificación se realiza típicamente a temperaturas de 20-75°C, preferiblemente de 40-70°C, típicamente alrededor de 60°C, y a un pH entre 4 y 5, normalmente en alrededor de pH 4,5.

[0030] La sacarificación y fermentación simultánea ("SSF") se usa mucho en procesos de producción de producto de fermentación a escala industrial, especialmente procesos de producción de etanol. Cuando se realiza la SSF la etapa de sacarificación ii) y la etapa de fermentación iii) se realizan simultáneamente. No hay fase de espera para la sacarificación, lo que significa que un organismo fermentador, tal como levadura, y la

enzima(s), se pueden añadir juntos. Sin embargo, se contempla también la adición del organismo fermentador y la(s) enzima(s) separadamente. La SSF se realiza según la invención típicamente a una temperatura de 25°C a 40°C, tal como de 28°C a 35°C, tal como de 30°C a 34°C, preferiblemente alrededor de aproximadamente 32°C. En una forma de realización, la fermentación se produce durante 6 a 120 horas, en particular 24 a 96 horas. En una forma de realización, el pH está entre 3,5-5, en particular entre 3,8 y 4,3.

Medio de fermentación

[0031] "Medios de fermentación" o "medio de fermentación" se refiere al entorno en el que se realiza la fermentación. El medio de fermentación incluye el sustrato de fermentación, que es, la fuente de carbohidrato que es metabolizada por el organismo fermentador. Según la invención, el medio de fermentación puede comprender nutrientes y estimulador(es) de crecimiento para el(los) organismo(s) de fermentación. Los nutrientes y estimuladores del crecimiento se usan mucho en la técnica de fermentación e incluyen fuentes de nitrógeno, tales como amoníaco; urea, vitaminas y minerales, o combinaciones de los mismos.

Organismos fermentadores

[0032] El término "organismos fermentadores" se refiere a cualquier organismo, incluyendo organismos bacterianos y fúngicos, especialmente levadura, adecuados para su uso en un proceso de fermentación y capaces de producir el producto de fermentación deseado. Los organismos fermentadores especialmente adecuados son capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares, tales como glucosa o maltosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado, tal como etanol. Ejemplos de organismos fermentadores incluyen organismos fúngicos, tales como levadura. La levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces* spp., en particular, *Saccharomyces cerevisiae*.

[0033] Concentraciones adecuadas del organismo fermentador viable durante la fermentación, tal como SSF, se conocen bien en la técnica o pueden fácilmente ser determinados por la persona experta en la técnica. En una forma de realización, el organismo fermentador, tal como levadura fermentadora de etanol, (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) se añade al medio de fermentación de modo que el recuento de organismo fermentador viable, tal como levadura, por mL de medio de fermentación está en el rango de $10^5$ a $10^{12}$, preferiblemente de $10^7$ a $10^{10}$, especialmente aproximadamente $5x10^7$.

[0034] Ejemplos de levadura disponible comercialmente incluyen, por ejemplo, levadura RED STAR™ y ETHANOL RED™ (disponible de Fermentis/Lesaffre, EE.UU.), FALI (disponible de Fleischmann's Yeast, EE.UU.), levadura fresca de SUPERSTART y THERMOSACC™ (disponible de Ethanol Technology, WI, EE.UU.), BIOFERM AFT y XR (disponible de NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, EE.UU.), GERT STRAND (disponible de Gert Strand AB, Suecia) y FERMIOL (disponible de DSM Specialties).

Materiales que contienen almidón

[0035] Cualquier material que contenga almidón adecuado se puede utilizar según la presente invención. La materia prima se selecciona generalmente según el producto de fermentación deseado. Ejemplos de materiales que contienen almidón, adecuados para su uso en un proceso de la invención, incluyen granos enteros, maíz, trigo, cebada, centeno, millo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, alubias o batatas, o mezclas derivadas o almidones derivados de los mismos, o cereales. También se contemplan tipos cerosos y no cerosos de maíz y cebada. En una forma de realización preferida, el material que contiene almidón, usado para producir etanol según la invención, es maíz o trigo.

Productos de fermentación

[0036] El término "producto de fermentación" se refiere a un producto producido por un proceso que incluye un paso de fermentación que utiliza un organismo fermentador. Productos de fermentación contemplados según la invención incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol; polioles tal como glicerol, sorbitol e inositol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido succínico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H2 y CO2); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B12, beta-caroteno); y hormonas. En una forma de realización preferida, el producto de fermentación es etanol, por ejemplo, etanol combustible; etanol potable, es decir, bebidas espirituosas neutrales potables; o etanol industrial o productos usados en la industria del alcohol de consumo (por ejemplo, cerveza y vino), industria láctea (por ejemplo, productos lácteos fermentados), industria del cuero e industria del tabaco. Los tipos de cerveza preferidos comprenden cerveza inglesa de malta, cerveza negra, porter, cerveza rubia, amarga, licores de malta, cerveza happoushu, cerveza alta en alcohol, cerveza baja en alcohol, cerveza baja en calorías o cerveza light. Preferiblemente los procesos de la invención se usan para producir un alcohol, tal como etanol. El producto de fermentación, tal como etanol, obtenido según la invención, se puede utilizar como combustible, que se mezcla típicamente con gasolina. Sin embargo, en el caso del etanol también se puede usar como etanol potable.

Recuperación

[0037] Después de la fermentación, o la SSF, el producto de fermentación se puede separar del medio de fermentación. El lodo se puede destilar para extraer el producto de fermentación deseado (por ejemplo, etanol). Alternativamente el producto de fermentación deseado se puede extraer del medio de fermentación por técnicas de filtración micro o de membrana. El producto de fermentación también se puede recuperar por decapado u otro método bien conocido en la técnica.

Alfa-amilasa presente y/o añadida durante la licuefacción

[0038] Según la invención, una alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1 está presente y/o se añade durante la licuefacción junto con una proteasa termoestable que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID N.º: 13 y que tiene un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C, y opcionalmente una enzima generadora de fuente de carbohidratos, en particular una glucoamilasa termoestable, y/o opcionalmente una pululanasa.

Alfa-amilasa bacteriana

[0039] La alfa-amilasa usada según la invención, tal y como se define en las reivindicaciones 1 y 8, se clasifica bajo EC 3.2.1.1. Una alfa-amilasa bacteriana usada según la invención puede, por ejemplo, derivar a partir de una cepa del género *Bacillus*, que a veces también se denomina como el género *Geobacillus*.
En una forma de realización, la alfa-amilasa de *Bacillus* se deriva de una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*, pero también se puede derivar de otra especie de *Bacillus*.

[0040] La alfa-amilasa para fines de la invención tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1 aquí, y puede ser una enzima con un grado de identidad de 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% con SEQ ID N.º: 1 aquí.

[0041] La alfa-amilasa se puede derivar de *Bacillus stearothermophilus*. La alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* puede ser un tipo salvaje maduro o una variante madura del mismo. Las alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus* maduras, o variantes del mismo, se pueden truncar naturalmente durante la producción recombinante. Por ejemplo, la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* se puede truncar de modo que tenga alrededor de 491 aminoácidos (en comparación con SEQ ID N.º: 3 en la WO 99/19467), tal como de 480-495 aminoácidos.

[0042] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o híbrido, en tanto en cuanto tenga al menos 80% de identidad con SEQ ID N.º: 1. Ejemplos de tal variante se pueden encontrar en cualquiera de WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059 y WO 02/10355. Variantes de alfa-amilasa específica se describen en las patentes de EE.UU. N.º: 6.093.562, 6.187.576, 6.297.038 y 7.713.723 e incluyen alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (frecuentemente denominada alfa-amilasa de BSG) variantes que tienen una deleción de uno o dos aminoácidos en las posiciones R179, G180, I181 y/o G182, preferiblemente una deleción doble descrita en la WO 96/23873 - véase, por ejemplo, la página 20, líneas 1-10, preferiblemente correspondientes a la deleción de las posiciones I181 y G182 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* expuesta en SEQ ID N.º: 1 aquí o la deleción de los aminoácidos R179 y G180 usando SEQ ID N.º: 1 aquí para la numeración. Aún más preferidas son las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus*, que tienen una deleción doble que se corresponde con una deleción de las posiciones 181 y 182 y además comprenden una sustitución N193F (denominada también I181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de tipo salvaje de alfa-amilasa de BSG expuesta en SEQ ID N.º: 3 descrita en la WO 99/19467 o SEQ ID N.º: 1 aquí. La alfa-amilasa bacteriana también puede tener una sustitución en una posición que corresponde a S239 en la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en SEQ ID N.º: 4 en la WO 99/19467, o una variante S242 de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* de SEQ ID N.º: 3 en la WO 99/19467 o SEQ ID N.º: 1 aquí.

[0043] La variante puede ser una variante S242A, E o Q, preferiblemente una variante S242Q, de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (usando SEQ ID N.º: 1 aquí para la numeración).

[0044] La variante puede ser una posición variante E188, preferiblemente variante E188P de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (usando SEQ ID N.º: 1 aquí para la numeración).

[0045] La alfa-amilasa bacteriana puede ser una alfa-amilasa truncada. Especialmente el truncamiento es de modo que la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en SEQ ID N.º: 3 en la WO 99/19467 o SEQ ID N.º: 1 aquí, es de alrededor de 491 aminoácidos de longitud, tal como de 480-495 aminoácidos de longitud.

Alfa-amilasa termoestable

[0046] La alfa-amilasa usada en un proceso o composición de la invención tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1 y puede ser una alfa-amilasa termoestable, tal como una alfa-amilasa bacteriana termoestable, preferiblemente de *Bacillus stearothermophilus*. La alfa-amilasa usada puede tener un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ de al menos 10.

[0047] La alfa-amilasa termoestable puede tener un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ de al menos 15.
[0048] La alfa-amilasa termoestable puede tener un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ de al menos 20.
[0049] La alfa-amilasa termoestable puede tener un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ de al menos 25.
[0050] La alfa-amilasa termoestable puede tener un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ de al menos 30.
[0051] La alfa-amilasa termoestable puede tener un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ de al menos 40.
[0052] La alfa-amilasa termoestable puede tener un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ de al menos 50.
[0053] La alfa-amilasa termoestable puede tener un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ de al menos 60.
[0054] La alfa-amilasa termoestable puede tener un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ entre 10-70.
[0055] La alfa-amilasa termoestable puede tener un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ entre 15-70.
[0056] La alfa-amilasa termoestable puede tener un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ entre 20-70.
[0057] La alfa-amilasa termoestable puede tener un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ entre 25-70.
[0058] La alfa-amilasa termoestable puede tener un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ entre 30-70.
[0059] La alfa-amilasa termoestable puede tener un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ entre 40-70.
[0060] La alfa-amilasa termoestable puede tener un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ entre 50-70.
[0061] La alfa-amilasa termoestable puede tener un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ entre 60-70.
[0062] La alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1 usada según la invención es una alfa-amilasa bacteriana, preferiblemente derivada del género *Bacillus*, especialmente una cepa de *Bacillus stearothermophilus*, en particular el *Bacillus stearothermophilus* como se describe en la WO 99/19467 como SEQ ID N.º: 3 (SEQ ID N.º: 1 aquí) con un o dos aminoácidos eliminados en las posiciones R179, G180, I181 y/o G182, en particular con R179 y G180 eliminado, o con I181 y G182 eliminado, con mutaciones en la lista de mutaciones siguiente.

[0063] La alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1 puede tener la deleción doble I181 + G182, y la sustitución opcional N193F, que comprende además mutaciones seleccionadas de la siguiente lista:

| |
|---|
| - V59A+Q89R+G112D+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S; |
| - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S; |
| - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+D269E+D281N; |
| - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+1270L; |
| - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+H274K; |
| - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+Y276F; |
| - V59A+E129V+R157Y+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S; |
| - V59A+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+S242Q+Q254S; |
| - V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S; |
| - V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+H274K; |
| - V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+Y276F; |
| - V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+D281N; |
| - V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+M284T; |
| - V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+G416V; |
| - V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S; |
| - V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+M284T; |
| - A91L+M961+E129V+KI77L+RI79E+K220P+N224L+S242Q+Q254S; |
| - E129V+K177L+R179E; |
| - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S; |
| - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+Y276F+L427M; |
| - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+M284T; |
| - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+N376*+1377*; |
| - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S; |
| - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+M284T; |
| - E129V+K177L+R179E+S242Q; |
| - E129V+K177L+R179V+K220P+N224L+S242Q+Q254S; |
| - K220P+N224L+S242Q+Q254S; |
| - M284V; |
| - V59A+Q89R+ E129V+ K177L+ R179E+ Q254S+ M284V. |

[0064] La alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1 usada de acuerdo con la invención se puede seleccionar del grupo de variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*:

- I181*+G182*+N193F+E129V+K177L+R179E;
- I181*+G182*+N193F+V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S;
- I181*+G182*+N193F+V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+Q254S+M284V; y
- I181*+G182*+N193F+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S (que usa SEQ ID N.º: 1 aquí para numeración).

[0065] Se debe entender que cuando se hace referencia a la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* y variantes de la misma normalmente se producen en forma truncada. En particular, el truncamiento puede ser de modo que la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en SEQ ID N.º: 3 en la WO 99/19467 o SEQ ID N.º: 1 aquí, o variantes de las mismas, se trunquen en el C-terminal y sean típicamente de alrededor de 491 aminoácidos de longitud, tal como de 480-495 aminoácidos de longitud.

[0066] La variante de alfa-amilasa puede ser una enzima que tiene un grado de identidad de al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%, pero menos de 100% con la secuencia mostrada en SEQ ID N.º: 3 en la WO 99/19467 o SEQ ID N.º: 1 aquí.

Proteasa presente y/o añadida durante la licuefacción

[0067] Una proteasa termoestable que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID N.º: 13 y que tiene un valor de termoestabilidad mayor del 20% determinada como actividad relativa a 80°C/70°C está presente y/o se añade durante la licuefacción junto con una alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1, tal como una alfa-amilasa termoestable, y opcionalmente una enzima generadora de fuente de carbohidratos, en particular una glucoamilasa termoestable, y/o opcionalmente una pululanasa.

[0068] Las proteasas se clasifican basándose en su mecanismo catalítico en los grupos siguientes: serina proteasas (S), cisteína proteasas (C), proteasas aspárticas (A), proteasas de metalo (M), y desconocidas, o aún sin clasificar, proteasas (U), véase Handbook of Proteolytic Enzymes, A.J.Barrett, N.D.Rawlings, J.F.Woessner (eds), Academic Press (1998), en particular la parte de introducción general.

[0069] La actividad de proteasa se puede medir utilizando cualquier ensayo adecuado, donde se emplea un sustrato, que incluye enlaces peptídicos pertinentes para la especificidad de la proteasa en cuestión. El pH de ensayo y la temperatura de ensayo se adaptan asimismo a la proteasa en cuestión. Ejemplos de valores de pH de ensayo son pH 6, 7, 8, 9, 10 u 11. Ejemplos de temperaturas de ensayo son 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 u 80°C.

[0070] Ejemplos de sustratos de proteasa son caseína, tal como caseína reticulada con azurina (AZCL-caseína). Dos ensayos de proteasa se describen a continuación en la sección "Materiales y métodos", de los cuales el denominado "Ensayo de AZCL-caseína" es el ensayo preferido.

[0071] La proteasa termoestable tiene al menos 20%, tal como al menos 30%, tal como al menos 40%, tal como al menos 50%, tal como al menos 60%, tal como al menos 70%, tal como al menos 80%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 100% de la actividad de proteasa de la Proteasa Pfu determinada por el ensayo de AZCL-caseína descrito en la sección "materiales y métodos".

[0072] No hay limitaciones en el origen de la proteasa usada en un proceso de la invención en tanto en cuanto tenga al menos 80% de identidad con SEQ ID N.º: 13 y además cumpla con las propiedades de termoestabilidad definidas a continuación.

[0073] La proteasa termoestable se puede derivar de cualquier bacteria en tanto en cuanto la proteasa tenga al menos 80% de identidad con SEQ ID N.º: 13 y además tenga las propiedades de termoestabilidad definidas según la invención.

[0074] La proteasa termoestable se puede derivar de una cepa de la bacteria de *Pyrococcus*, tal como una cepa de *Pyrococcus furiosus* (pfu proteasa).

[0075] La proteasa puede ser la mostrada como SEQ ID N.º: 1 en la patente de EE.UU. N.º: 6.358.726-B1 (Takara Shuzo Company) y SEQ ID N.º: 13 aquí.

[0076] La proteasa termoestable puede ser la descrita como SEQ ID N.º: 13 aquí o una proteasa con al menos 80% de identidad, tal como al menos 85%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 96%, tal como al menos 97%, tal como al menos 98%, tal como al menos 99% identidad con SEQ ID N.º: 13 aquí. La proteasa de *Pyrococcus furiosus* se puede comprar de Takara Bio, Japón.

[0077] La proteasa de *Pyrococcus furiosus* es una proteasa termoestable según la invención. El producto comercial de proteasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu S) se descubrió que tenía una termoestabilidad de 110% (80°C/70°C) y 103% (90°C/70°C) a pH 4,5 determinado como se describe en el ejemplo 2 aquí.

[0078] Una proteasa termoestable usada en un proceso de la invención tiene un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C determinado como se describe en el ejemplo 2.

[0079] La proteasa puede tener una termoestabilidad superior al 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 100%, tal como más del 105%, tal como más del 110%, tal como más del 115%, tal como más del 120% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C.

[0080] La proteasa puede tener una termoestabilidad de entre 20 y 50%, tal como entre 20 y 40%, tal como 20 y 30% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C.

[0081] La proteasa puede tener una termoestabilidad entre 50 y 115%, tal como entre 50 y 70%, tal como entre 50 y 60%, tal como entre 100 y 120%, tal como entre 105 y 115% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C.

[0082] La proteasa puede tener un valor de termoestabilidad superior al 10% determinado como actividad relativa a 85°C/70°C determinado como se describe en el ejemplo 2.

[0083] La proteasa puede tener una termoestabilidad superior al 10%, tal como más del 12%, más del 14%, más del 16%, más del 18%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, mayor que 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 100%, más del 110% determinado como actividad relativa a 85°C/70°C.

[0084] La proteasa puede tener una termoestabilidad de entre 10 y 50%, tal como entre 10 y 30%, tal como entre 10 y 25% determinado como actividad relativa a 85°C/70°C.

[0085] La proteasa puede tener más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90% determinado como actividad restante a 80°C.

[0086] La proteasa puede tener más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90% determinado como actividad restante a 84°C.

[0087] La determinación de "actividad relativa" y "actividad restante" se hace como se describe en el ejemplo 2.

[0088] La proteasa puede tener una termoestabilidad de por encima de 90, tal como por encima de 100 a 85°C como se determina utilizando el ensayo de ceína-BCA como se describe en el ejemplo 3.

[0089] La proteasa puede tener una termoestabilidad por encima del 60%, tal como por encima del 90%, tal como por encima del 100%, tal como por encima del 110% a 85°C como se determina utilizando el ensayo de ceína-BCA.

[0090] La proteasa puede tener una termoestabilidad entre 60-120, tal como entre 70-120%, tal como entre 80-120%, tal como entre 90-120%, tal como entre 100-120%, tal como 110-120% a 85°C como se determina utilizando el ensayo de ceína-BCA.

[0091] La proteasa termoestable puede tener al menos 20%, tal como al menos 30%, tal como al menos 40%, tal como al menos 50%, tal como al menos 60%, tal como al menos 70%, tal como al menos 80%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como al menos 100% de la actividad de proteasa Pfu mostrada como SEQ ID N.º: 13 determinada por el ensayo de AZCL- caseína.

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

[0092] Según la invención, una enzima generadora de fuente de carbohidratos, en particular una glucoamilasa, preferiblemente una glucoamilasa termoestable, puede estar presente y/o se puede añadir durante la licuefacción junto con una alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1 y una proteasa termoestable que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 13 y que tiene un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C. Como se ha mencionado anteriormente, una pululanasa también puede estar presente y/o se puede añadir durante la etapa de licuefacción i).

[0093] El término "enzima generadora de fuente de carbohidratos" incluye cualquier enzima que genere azúcares fermentables. Una enzima generadora de fuente de carbohidratos es capaz de producir un carbohidrato que puede ser usado como una fuente de energía por el(los) organismo(s) de fermentación en cuestión, por ejemplo,

cuando se usa en un proceso de la invención para producir un producto de fermentación, tal como etanol. Los carbohidratos generados se pueden convertir directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado, preferiblemente etanol. Según la invención, una mezcla de enzimas generadoras de fuente de carbohidratos se puede utilizar. Ejemplos específicos incluyen glucoamilasa (que son generadoras de glucosa), beta-amilasa y amilasa maltogénica (que son generadoras de maltosa).

[0094] La enzima generadora de fuente de carbohidratos puede ser termoestable. La enzima generadora de fuente de carbohidratos, en particular glucoamilasa termoestable, se puede añadir junto con o separadamente de la alfa-amilasa y la proteasa termoestable.

[0095] La enzima generadora de fuente de carbohidratos, preferiblemente una glucoamilasa termoestable, puede tener una estabilidad térmica de actividad relativa a 85°C de al menos 20%, al menos 30%, preferiblemente al menos 35% determinada como se describe en el ejemplo 4 (estabilidad térmica).

[0096] La enzima generadora de fuente de carbohidratos puede ser una glucoamilasa con un a pH óptimo de actividad relativa a pH 5,0 de al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, preferiblemente al menos 97%, tal como 100% determinado como se describe en el ejemplo 4 (pH óptimo).

[0097] La enzima generadora de fuente de carbohidratos puede ser una glucoamilasa con una estabilidad de pH a pH 5,0 de al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% determinada como se describe en el ejemplo 4 (estabilidad de pH).

[0098] La enzima generadora de fuente de carbohidratos puede ser una glucoamilasa termoestable, preferiblemente de origen fúngico, preferiblemente unos hongos filamentosos, tal como a partir de una cepa del género Penicillium, especialmente una cepa de *Penicillium oxalicum*, en particular la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* descrita como SEQ ID N.º: 2 en la PCT/CN10/071753 publicada como WO 2011/127802 y mostrada en SEQ ID N.º: 9 o 14 aquí.

[0099] La glucoamilasa termoestable puede tener al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 91%, más preferiblemente al menos 92%, aún más preferiblemente al menos 93%, de la forma más preferible al menos 94%, e incluso de la forma más preferible al menos 95%, tal como incluso al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% de identidad con polipéptido maduro mostrado en SEQ ID N.º: 2 en la WO 2011/127802 o SEQ ID N.º: 9 o 14 aquí.

[0100] La enzima generadora de fuente de carbohidratos, en particular la glucoamilasa termoestable, puede ser la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*.

[0101] La enzima generadora de fuente de carbohidratos puede ser una variante de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* descrita como SEQ ID N.º: 2 en la WO 2011/127802 y mostrada en SEQ ID N.º: 9 y 14 aquí, que tiene una sustitución K79V (denominada PE001) (que usa la secuencia madura mostrada en SEQ ID N.º: 14 para numeración). La variante de glucoamilasa K79V tiene sensibilidad reducida para degradación de proteasa con respecto al original. La glucoamilasa termoestable puede ser una variante de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* descrita como SEQ ID N.º: 2 en la WO 2011/127802 y mostrada en SEQ ID N.º: 9 y 14 aquí. La glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* puede ser la descrita como SEQ ID N.º: 2 en la WO 2011/127802 y mostrada en SEQ ID N.º: 9 y 14 aquí que tiene Val (V) en la posición 79 (usando SEQ ID N.º: 14 para numeración). Estas variantes han reducido la sensibilidad a la degradación de proteasa. Estas variantes han mejorado la termoestabilidad en comparación con el original.

[0102] Más específicamente, la glucoamilasa puede tener una sustitución K79V usando SEQ ID N.º: 14 para numeración), que corresponde a la variante PE001, y comprende además al menos una de las siguientes sustituciones o combinación de sustituciones:

T65A; o
Q327F; o
E501V; o
Y504T; o
Y504*; o
T65A + Q327F; o
T65A + E501V; o
T65A + Y504T; o
T65A + Y504*; o
Q327F + E501V; o
Q327F + Y504T; o
Q327F + Y504*; o
E501V + Y504T; o

E501V + Y504*; o
T65A + Q327F + E501V; o
T65A + Q327F + Y504T; o
T65A + E501V + Y504T; o
Q327F + E501V + Y504T; o
T65A + Q327F + Y504*; o
T65A + E501V + Y504*; o
Q327F + E501V + Y504*; o
T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
T65A + Q327F + E501V + Y504*;
E501V + Y504T; o
T65A + K161S; o
T65A + Q405T; o
T65A + Q327W; o
T65A + Q327F; o
T65A + Q327Y; o
P11 F + T65A + Q327F; o
R1K + D3W + K5Q + G7V + N8S + T10K + P11S + T65A + Q327F; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F; o
P11 F + D26C + K33C + T65A + Q327F; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327W + E501V + Y504T; o
R1E + D3N + P4G + G6R + G7A + N8A + T10D+ P11 D + T65A + Q327F; o
P11 F + T65A + Q327W; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P11 F + T65A + Q327W + E501V + Y504T; o
T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
T65A + S105P + Q327W; o
T65A + S105P + Q327F; o
T65A + Q327W + S364P; o
T65A + Q327F + S364P; o
T65A + S103N + Q327F; o
P2N + P4S + P11 F + K34Y + T65A + Q327F; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + D445N + V447S; o
P2N + P4S + P11F + T65A + 1172V + Q327F; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + N502*; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + N502T + P563S + K571 E; o
P2N + P4S + P11F + R31S + K33V + T65A + Q327F + N564D + K571S; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + S377T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + V325T+ Q327W; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + D445N + V447S + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + 1172V + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + S377T + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + D26N + K34Y + T65A + Q327F; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + I375A + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + K218A + K221 D + Q327F + E501 V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + S103N + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + T10D + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + F12Y + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
K5A + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + T10E + E18N + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + T10E + E18N + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + T568N; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + K524T + G526A; o
P2N + P4S + P11 F + K34Y + T65A + Q327F + D445N + V447S + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + R31S + K33V + T65A + Q327F + D445N + V447S + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + D26N + K34Y + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + F80* + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + K112S + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + T516P + K524T + G526A; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + N502T + Y504*; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + S103N + Q327F + E501V + Y504T; o
K5A + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + T516P + K524T + G526A; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + V79A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + V79G + Q327F + E501V + Y504T; o

P2N + P4S + P11 F + T65A + V79I + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + V79L + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + V79S + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + L72V + Q327F + E501V + Y504T; o
S255N + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + E74N +Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + G220N + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Y245N + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q253N + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + D279N + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + S359N + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + D370N + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + V460S + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + V460T + P468T + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + T463N + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + S465N + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + T477N + E501V + Y504T.

[0103] La variante de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* puede tener una sustitución K79V (usando SEQ ID N.º: 14 para numeración), que corresponde a la variante PE001, y comprende además una de las siguientes mutaciones:

P11 F + T65A + Q327F; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F; o
P11 F + D26C + K33C + T65A + Q327F; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327W + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P11 F + T65A + Q327W + E501V + Y504T.

[0104] La enzima generadora de fuente de carbohidratos, en particular, se puede añadir en cantidades de 0,1-100 microgramos EP/g, tal como 0,5-50 microgramos EP/g, tal como 1-25 microgramos EP/g, tal como 2-12 microgramos EP/g DS.

Pululanasa presente y/o añadida durante la licuefacción

[0105] Opcionalmente una pululanasa puede estar presente y/o se puede añadir durante la etapa de licuefacción i) junto con una alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1 y una proteasa termoestable que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID N.º: 13 y además con un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C. Como se ha mencionado anteriormente, una enzima generadora de fuente de carbohidratos, preferiblemente una glucoamilasa termoestable, también puede estar presente y/o se puede añadir durante la etapa de licuefacción i).

[0106] La pululanasa puede estar presente y/o se puede añadir durante la etapa de licuefacción i) y/o la etapa de sacarificación ii) o sacarificación y fermentación simultánea.

[0107] Las pululanasas (E.C. 3.2.1.41, pululano 6-glucano-hidrolasa), son enzimas desramificantes caracterizadas por su capacidad para hidrolizar los enlaces alfa-1,6-glicosídicos en, por ejemplo, amilopectina y pululano.

[0108] Las pululanasas contempladas incluyen las pululanasas de *Bacillus amyloderamificans* descritas en la patente de EE.UU. n.º: 4.560.651, la pululanasa descrita como SEQ ID N.º: 2 en la WO 01/151620, el *Bacillus deramificans* descrito como SEQ ID N.º: 4 en la WO 01/151620, y la pululanasa de *Bacillus acidopullulyticus* descrita como SEQ ID N.º: 6 en la WO 01/151620 y también descrita en FEMS Mic. Let. (1994) 115, 97-106.

[0109] Las pululanasas adicionales contempladas según la presente invención incluyen las pululanasas de *Pyrococcus woesei,* específicamente de *Pyrococcus woesei* DSM n.º: 3773 descrita en la WO 92/02614.

[0110] La pululanasa puede ser una pululanasa de la familia GH57. La pululanasa puede incluir un dominio X47 como se describe en la US 61/289,040 publicada como WO 2011/087836. Más específicamente, la pululanasa se puede derivar de una cepa del género *Thermococcus,* incluyendo *Thermococcus litoralis* y *Thermococcus hydrothermalis,* tal como la pululanasa de *Thermococcus hydrothermalis* mostrada en SEQ ID N.º: 11 truncada en el sitio X4 justo después del dominio X47 (es decir, los aminoácidos 1-782 en SEQ ID N.º: 11 y 12 aquí).
La pululanasa también puede ser un híbrido de las pululanasas de *Thermococcus litoralis* y de *Thermococcus hydrothermalis* o una enzima híbrida de *T. hydrothermalis* /*T. litoralis* con sitio de truncamiento X4 descrito en la US 61/289,040 publicada como WO 2011/087836 y descrito en SEQ ID N.º: 12 aquí.

[0111] La pululanasa puede ser una que incluya un dominio X46 descrito en la WO 2011/076123 (Novozymes).

[0112] La pululanasa se puede añadir en una cantidad eficaz que incluye la cantidad preferida de aproximadamente 0,0001-10 mg de proteína enzimática por gramo DS, preferiblemente 0,0001-0,10 mg de proteína enzimática por gramo DS, más preferiblemente 0,0001-0,010 mg de proteína enzimática por gramo DS. Actividad de pululanasa se puede determinar como NPUN. Un ensayo para determinar la NPUN se describe en la sección "Materiales y métodos" más adelante.

[0113] Productos de pululanasa adecuados disponibles comercialmente incluyen PROMOZYME D, PROMOZYME™ D2 (Novozymes A/S, Dinamarca), OPTIMAX L-300 (Genencor Int., EE.UU.), y AMANO 8, (Amano Japón).

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

[0114] Según la invención, una enzima generadora de fuente de carbohidratos, preferiblemente una glucoamilasa, está presente y/o se añade durante la sacarificación y/o la fermentación.

[0115] En una forma de realización preferida, la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una glucoamilasa, de origen fúngico, preferiblemente de una cepa de *Aspergillus,* preferiblemente A. *niger, A. awamori* o *A. oryzae*; o una cepa de Trichoderma, preferiblemente *T. reesei*; o una cepa de *Talaromyces*, preferiblemente *T. emersonii,* Glucoamilasa

[0116] Según la invención, la glucoamilasa presente y/o añadida durante la sacarificación y/o la fermentación se puede derivar de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, de un microorganismo o una planta. Las glucoamilasas preferidas son de origen fúngico o bacteriano, seleccionadas del grupo que consiste en glucoamilasas de *Aspergillus,* en particular glucoamilasa G1 o G2 de *Aspergillus niger* (Boel et al. (1984), EMBO J. 3 (5), p. 1097-1102), o variantes de las mismas, tal como las descritas en la WO 92/00381, WO 00/04136 y WO 01/04273 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa de *A. awamori* descrita en la WO 84/02921, la glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* (Agric. Biol. Chem. (1991), 55 (4), p. 941-949) o variantes o fragmentos de las mismas. Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes con termoestabilidad mejorada: G137A y G139A (Chen et al. (1996), Prot. Eng. 9,499-505); D257E y D293E/Q (Chen et al. (1995), Prot. Eng. 8, 575-582); N182 (Chen et al. (1994), Biochem. J. 301, 275-281); enlaces de disulfuro, A246C (Fierobe et al. (1996), Biochemistry, 35, 8698-8704; e introducción de residuos Pro en la posición A435 y S436 (Li et al. (1997), Protein Eng. 10, 1199-1204.

[0117] Otras glucoamilasas incluyen glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (denominada previamente *Corticium rolfsii*) (véase patente EE.UU. Nº 4.727.026 y Nagasaka et al. (1998) "Purification and properties of the raw-starch-degrading glucoamylases from Corticium rolfsii, Appl Microbiol Biotechnol 50:323-330), glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular derivadas de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente de EE.UU. n.º Re. 32.153), *Talaromyces duponti*, *Talaromyces thermophilus* (patente de EE.UU. n.º 4.587.215). En una forma de realización preferida, la glucoamilasa usada durante la sacarificación y/o la fermentación es la glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* descrita en la WO 99/28448.

[0118] Glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135.138), y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831).

[0119] Glucoamilasas fúngicas contempladas incluyen *Trametes* cingulata, *Pachykytospora papyracea*; y *Leucopaxillus giganteus* todas descrita en la WO 2006/069289; y *Peniophora rufomarginata* descrita en la WO2007/124285 o una mezcla de las mismas. También se contempla la glucoamilasa híbrida según la invención. Ejemplos incluyen las glucoamilasas híbridas descritas en la WO 2005/045018. Ejemplos específicos incluyen la glucoamilasa híbrida descrita en la tabla 1 y 4 del ejemplo 1.

[0120] La glucoamilasa puede derivar a partir de una cepa del género *Pycnoporus*, en particular una cepa de *Pycnoporus* como se describe en la US 61/264,977 publicada como WO 2011/066576 (SEQ ID N.º: 2, 4 o 6), o a partir de una cepa del género *Gloephyllum*, en particular una cepa de *Gloephyllum* como se describe en la US 61/406,741 publicada como WO 2011/068803 (SEQ ID N.º: 2, 4, 6, 8, 10, 12,14 o 16) o una cepa del género *Nigrofomes*, en particular una cepa de *Nigrofomes* sp. descrita en la WO 2012/064351 (SEQ ID N.º: 2). También se contemplan las glucoamilasas que muestran una alta identidad con cualquiera de las glucoamilasas anteriormente mencionadas, es decir, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o incluso 100% de identidad con cualquiera de las partes maduras de las secuencias enzimáticas mencionadas anteriormente.

[0121] Las glucoamilasas se pueden añadir en una forma de realización a la sacarificación y/o la fermentación 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.

[0122] Composiciones disponibles comercialmente que comprenden glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L, SPIRIZYME™ PLUS, SPIRIZYME™ FUEL, SPIRIZYME™ B4U, SPIRIZYME™ ULTRA, SPIRIZYME™ EXCEL and AMG™ E (de Novozymes A/S); OPTIDEX™ 300, GC480, GC417 (de Genencor Int.); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME™ G900, G-ZYME™ y G990 ZR (de Genencor Int.).

Amilasa maltogénica

[0123] La enzima generadora de fuente de carbohidratos presente y/o añadida durante la sacarificación y/o la fermentación también puede ser una alfa-amilasa maltogénica. Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa, E.C. 3.2.1.133) es capaz de hidrolizar amilosa y amilopectina en maltosa en la configuración alfa. Una amilasa maltogénica de la cepa de *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está comercialmente disponible de Novozymes A/S. Alfa-amilasas maltogénicas se describen las patentes estadounidenses número: 4.598.048, 4.604.355 y 6.162.628. La amilasa maltogénica se puede añadir en una forma de realización preferida en una cantidad de 0,05-5 mg de proteína total/gramo de DS o 0,05-5 MANU/g DS.

Ejemplos de procesos preferidos de la invención

[0124] En una forma de realización, la invención se refiere a un procedimiento para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluye las etapas de:

i) licuefacción del material que contiene almidón a un pH en el rango de 5,0-7,0 a una temperatura por encima de la temperatura de gelatinización inicial usando:

- una alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1, preferiblemente derivada de *Bacillus stearothermophilus*, con un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM CaCl2 de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, tal como entre 10-70, tal como entre 15-70, tal como entre 20-70, tal como entre 25-70, tal como entre 30-70, tal como entre 40-70, tal como entre 50-70, tal como entre 60-70;
- una proteasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 13, preferiblemente derivada de *Pyrococcus furiosus* que tiene un valor de termoestabilidad superior al 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 90%, más del 100%, más del 105%, más del 110%, más del 115%, más del 120%, tal como entre 20 y 50%, entre 20 y 40%, 20 y 30%, entre 50 y 115%, entre 50 y 70%, entre 50 y 60%, entre 100 y 120%, entre 105 y 115% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C determinado como actividad relativa a 80°C/70°C;
- opcionalmente una glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*

ii) sacarificación utilizando una enzima de glucoamilasa;
iii) fermentación utilizando un organismo fermentador.

[0125] En otra forma de realización preferida la invención se refiere a un procedimiento para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluyen las etapas de:

i) licuefacción del material que contiene almidón a un pH en el rango de 5,0-6,0 a una temperatura entre 80-90°C usando:

- una alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1, preferiblemente derivada de *Bacillus stearothermophilus*, con un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM CaCl2 de al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, tal como entre 10-70, tal como entre 15-70, tal como entre 20-70, tal como entre 25-70, tal como entre 30-70, tal como entre 40-70, tal como entre 50-70, tal como entre 60-70;
- una proteasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 13, preferiblemente se deriva de *Pyrococcus furiosus* que tiene un valor de termoestabilidad superior al 20%, superior al 30%, superior al 40%, superior al 50%, superior al 60%, superior al 70%, superior al 80%, superior al 90%, superior al 100%, superior al 105%, superior al 110%, superior al 115%, superior al 120%; tal como entre 20 y 50%, entre 20 y 40%, 20 y 30%, entre 50 y 115%, entre 50 y 70%, entre 50 y 60%, entre 100 y 120%, entre 105 y 115% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C determinado como actividad relativa a 80°C/70°C;
- opcionalmente una glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*

ii) sacarificación utilizando una enzima de glucoamilasa;
iii) fermentación utilizando un organismo fermentador.

[0126] En otra forma de realización preferida, la invención se refiere a un procedimiento para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón que incluyen las etapas de:

i) licuefacción del material que contiene almidón a un pH en el rango de 5,0-7,0 a una temperatura por encima de la temperatura de gelatinización inicial usando:

- una alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1 y derivada de *Bacillus stearothermophilus* que tiene una deleción doble I181 + G182 y opcionalmente sustitución N193F; y opcionalmente otra del siguiente conjunto de sustituciones:

- E129V+K177L+R179E;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S (usando SEQ ID N.º: 1 aquí para numeración).

- una proteasa que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID N.º: 13, preferiblemente derivada de *Pyrococcus furiosus*, que tiene un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C; y
- opcionalmente glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en SEQ ID N.º: 14 que tiene sustituciones seleccionadas del grupo de:

- K79V;
- K79V+ P11 F + T65A + Q327F; o
- K79V+P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F; o
- K79V +P11 F + D26C + K33C + T65A + Q327F; o
- K79V +P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327W + E501V + Y504T; o
- K79V +P2N + P4S + P11 F + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
- K79V +P11F + T65A + Q327W + E501V + Y504T (usando SEQ ID N.º: 14 para numeración);

ii) sacarificación utilizando una enzima de glucoamilasa;
iii) fermentación utilizando un organismo fermentador.

[0127] En otra forma de realización preferida, el proceso para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón comprende las etapas de:

i) de licuefacción del material que contiene almidón a un pH en el rango de 5,0-6,0 a una temperatura entre 80-90°C usando:

- una alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1 y derivada de *Bacillus stearothermophilus* que tiene una deleción doble I181 + G182 y sustitución opcional N193F; y opcionalmente otra del siguiente conjunto de sustituciones:

- E129V+K177L+R179E;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S (usando SEQ ID N.º: 1 aquí para numeración).

- una proteasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 13, preferiblemente derivada de *Pyrococcus furiosus* y/o *Thermoascus aurantiacus*, que tiene un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C; y
- opcionalmente una glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en SEQ ID N.º: 14 que tiene sustituciones seleccionadas del grupo de:

- K79V;
- K79V+ P11F+T65A+Q327F; o
- K79V+P2N+P4S + P11F+T65A+Q327F; o
- K79V +P11 F+D26C + K33C+T65A+Q327F; o
- K79V +P2N+P4S+P11F+T65A+Q327W+E501V+Y504T; o
- K79V +P2N+P4S+P11F+T65A+Q327F+E501V+Y504T; o
- K79V +P11F+T65A+Q327W+E501V+Y504T (usando SEQ ID N.º: 14 para numeración);

ii) sacarificación utilizando una enzima de glucoamilasa;
iii) fermentación utilizando un organismo fermentador.

[0128] La alfa-amilasa mencionada anteriormente se deriva de *Bacillus stearothermophilus* (SEQ ID N.º: 1 aquí), o una variante de la misma, es la alfa-amilasa madura o las alfa-amilasas maduras correspondientes que tienen

al menos 80% de identidad, al menos 90% de identidad, al menos 95% de identidad, al menos 96% de identidad, al menos 97% de identidad, al menos 99% de identidad con la SEQ ID N.º: 1.

[0129] La proteasa mencionada anteriormente, derivada de *Pyrococcus furiosus* (SEQ ID N.º: 13) es la proteasa madura o proteasas maduras correspondientes que tienen al menos 80% de identidad, al menos 90% de identidad, al menos 95% de identidad, al menos 96% de identidad, al menos 97% de identidad, al menos 99% de identidad con la SEQ ID N.º: 13.

[0130] La glucoamilasa mencionada anteriormente derivada de *Penicillium oxalicum* (SEQ ID N.º: 14 aquí), o una variante de la misma, es la glucoamilasa madura o glucoamilasas maduras correspondientes que tienen al menos 80% de identidad, al menos 90% de identidad, al menos 95% de identidad, al menos 96% de identidad, al menos 97% de identidad, al menos 99% de identidad con la SEQ ID N.º: 14 aquí.

Una composición que comprende alfa-amilasa y proteasa termoestable

[0131] Una composición de la invención comprende una alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1, tal como una alfa-amilasa termoestable, y una proteasa termoestable una proteasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 13 y que tiene un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C. La composición puede también comprender una enzima generadora de fuente de carbohidratos termoestable, en particular una glucoamilasa, y/o opcionalmente una pululanasa también.

[0132] Por lo tanto, en este aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende:

i) una alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1;
ii) una proteasa que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID N.º: 13, preferiblemente derivada de *Pyrococcus furiosus* con un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C; y
iii) opcionalmente una enzima generadora de fuente de carbohidratos.

Alfa-amilasa: la alfa-amilasa puede ser cualquier alfa-amilasa que tenga al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1, tales como las alfa-amilasas bacterianas, tales como las alfa-amilasas derivadas del género *Bacillus*, tal como *Bacillus stearothermophilus*.

[0133] La alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1 puede ser una alfa-amilasa termoestable. La alfa-amilasa termoestable puede tener un T ½ (min) a pH 4.5, 85°C, 0,12 mM CaCl2) de al menos 10, tal como al menos 15, tal como al menos 20, tal como al menos 25, tal como al menos 30, tal como al menos 40, tal como al menos 50, tal como al menos 60, tal como entre 10-70, tal como entre 15-70, tal como entre 20-70, tal como entre 25-70, tal como entre 30-70, tal como entre 40-70, tal como entre 50-70, tal como entre 60-70.

[0134] La alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1 se puede seleccionar del grupo de variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, en particular truncado para tener 491 aminoácidos de longitud, tal como de 480 a 495 aminoácidos de longitud, con mutaciones seleccionadas del grupo de:

- I181*+G182*+N193F+E129V+K177L+R179E;
- I181*+G182*+N193F+V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S;
- I181*+G182*+N193F +V59A Q89R+ E129V+ K177L+ R179E+ Q254S+ M284V; y
- I181*+G182*+N193F+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S (usando SEQ ID N.º: 1 aquí para numeración).

[0135] Se debe entender que estas alfa-amilasas son sólo ejemplos específicos. Cualquier alfa-amilasa descrita anteriormente en la sección "Alfa-amilasa presente y/o añadida durante la licuefacción" anterior se puede utilizar como el componente de alfa-amilasa en una composición de la invención, en tanto en cuanto tenga al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1. Proteasa: una composición de la invención comprende una proteasa termoestable que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID N.º: 13 y otra con un valor de termoestabilidad superior a 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C.

[0136] No hay limitación en el origen del componente de proteasa en tanto que esta cumpla la secuencia y las propiedades de termoestabilidad definidas aquí.

[0137] La proteasa se puede derivar de una cepa de *Pyrococcus furiosus*, tal como la mostrada en SEQ ID N.º: 1 en la US 6.358.726 o SEQ ID N.º: 13 aquí.

[0138] Se debe entender que estas proteasas son solo ejemplos. Cualquier la proteasa descrita anteriormente en la sección "Proteasa presente y/o añadida durante la licuefacción" se puede utilizar como el componente de proteasa en una composición de la invención, siempre que tenga al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID Nº: 13 y el valor de termoestabilidad requerido. Enzimas generadoras de fuente de carbohidratos: una composición de la invención puede comprender además una enzima generadora de fuente de carbohidratos, en particular una glucoamilasa, que tiene una estabilidad térmica a 85°C, pH 5,3, de al menos 30%, preferiblemente al menos 35%.

[0139] Dicha enzima generadora de fuente de carbohidratos puede ser una glucoamilasa termoestable que tiene una estabilidad térmica de actividad relativa a 85°C de al menos 20%, al menos 30%, preferiblemente al menos 35% determinada como se describe en el ejemplo 4 (estabilidad térmica).

[0140] La enzima generadora de fuente de carbohidratos puede ser una glucoamilasa que tenga un pH óptimo de actividad relativa a pH 5,0 de al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, preferiblemente al menos 97%, tal como 100% determinado como se describe en el ejemplo 4 (pH óptimo).

[0141] La enzima generadora de fuente de carbohidratos puede ser una glucoamilasa que tiene una estabilidad de pH a pH 5,0 de al menos 80%, al menos 85%, al menos 90% determinado como se describe en el ejemplo 4 (estabilidad de pH).

[0142] La enzima generadora de fuente de carbohidratos puede ser una glucoamilasa termoestable, preferiblemente de origen fúngico, preferiblemente hongos filamentosos, tal como a partir de una cepa del género Penicillium, especialmente una cepa de *Penicillium oxalicum* descrita como SEQ ID N.º: 2 en PCT/CN10/071753 publicada como WO 2011/127802, o una variante de la misma, y mostrada en SEQ ID N.º: 9 o 14 aquí.

[0143] La glucoamilasa o una variante de la misma, puede tener al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 91%, más preferiblemente al menos 92%, aún más preferiblemente al menos 93%, de la forma más preferible al menos 94%, e incluso de la forma más preferible al menos 95%, tal como incluso al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o 100% de identidad con el polipéptido maduro mostrado en SEQ ID N.º: 2 en la WO 2011/127802 o SEQ ID N.º: 9 o 14 aquí.

[0144] La enzima generadora de fuente de carbohidratos puede ser una variante de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* descrita como SEQ ID N.º: 2 en la WO 2011/127802 y mostrada en SEQ ID N.º: 9 y 14 aquí, que tiene una sustitución K79V (utilizando la secuencia madura mostrada en SEQ ID N.º: 14 para numeración). La variante de glucoamilasa K79V ha reducido la sensibilidad a la degradación de proteasa con respecto al original. Ejemplos de variantes de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* termoestable adecuadas se enumeran anteriormente y en ejemplos 17 y 18 más adelante.

[0145] La enzima generadora de fuente de carbohidratos puede tener actividad secundaria de pululanasa.

[0146] Se debe entender que estas enzimas generadoras de fuente de carbohidratos, en particular las glucoamilasas, son solo ejemplos. Cualquier enzima generadora de fuente de carbohidratos descrita anteriormente en la sección "Enzima generadora de fuente de carbohidratos presente y/o añadida durante la licuefacción" se puede utilizar como componente en una composición de la invención. Pululanasa: una composición de la invención puede comprender además una pululanasa. La pululanasa puede ser una pululanasa de la familia GH57. La pululanasa puede incluir un dominio X47 como se describe en la US 61/289.040 publicada como WO 2011/087836.

[0147] Específicamente la pululanasa se puede derivar de una cepa del género *Thermococcus,* incluyendo *Thermococcus litoralis* y *Thermococcus hydrothermalis* o un híbrido de los mismos. [0148] La pululanasa puede ser pululanasa de *Thermococcus hydrothermalis* truncada en el sitio X4 o una enzima híbrida de *Thermococcus hydrothermalis* /*T. litoralis* con sitio de truncamiento X4 como se describe en la US 61/289.040 publicada como WO 2011/087836.

[0149] La pululanasa puede ser una que incluya un dominio X46 descrito en la WO 2011/076123 (Novozymes).

[0150] Se debe entender que estas pululanasas son ejemplos específicos solo. Cualquier pululanasa descrita anteriormente en la sección "Pululanasa presente y/o añadida durante la licuefacción" se puede utilizar como el componente de pululanasa opcional en una composición de la invención.

[0151] En una forma de realización preferida la composición de la invención comprende:

- una alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1 y derivada de *Bacillus stearothermophilus*;

- una proteasa que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID N.º: 13, preferiblemente derivada de *Pyrococcus furiosus* y con un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C; y
- opcionalmente una glucoamilasa derivada de *Penicillium oxalicum*.

[0152] En una forma de realización preferida la composición de la invención comprende:

- una alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1, preferiblemente derivada de *Bacillus stearothermophilus*, con un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM CaCl2 de al menos 10;
- una proteasa que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID N.º: 13, preferiblemente derivada de *Pyrococcus furiosus*, con un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C;
- opcionalmente una glucoamilasa derivada de *Penicillium oxalicum*.

[0153] En una forma de realización preferida la composición comprende:

- una alfa-amilasa con al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1 y derivada de *Bacillus stearothermophilus* que tiene una deleción doble I181 + G182 y opcionalmente sustitución N193F; y opcionalmente una del siguiente conjunto de sustituciones:
- E129V+K177L+R179E;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S (usando SEQ ID N.º: 1 aquí para numeración).
- una proteasa con al menos 80% de identidad con SEQ ID N.º: 13, preferiblemente derivada de *Pyrococcus furiosus* y con un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C; y
- opcionalmente una glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en SEQ ID N.º: 14 que tiene sustituciones seleccionadas del grupo de:

  - K79V;
  - K79V+P11F+T65A+Q327F; o
  - K79V+P2N+P4S+P11F+T65A+Q327F; o
  - K79V+P11F+D26C+K33C+T65A+Q327F; o
  - K79V+P2N+P4S+P11F+T65A+Q327W+E501V+Y504T; o
  - K79V+P2N+P4S+P11F+T65A+Q327F+E501V+Y504T; o
  - K79V+P11F+T65A+Q327W+E501V+Y504T (usando SEQ ID N.º: 14 para numeración);

[0154] La alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (SEQ ID N.º: 1 aquí), o una variante de la misma, puede ser la alfa-amilasa madura o la alfa-amilasa madura correspondiente que tiene al menos 80% de identidad, al menos 90% de identidad, al menos 95% de identidad, al menos 96% de identidad, al menos 97% de identidad, al menos 99% de identidad con la SEQ ID N.º: 1.

[0155] La proteasa de *Pyrococcus furiosus* (SEQ ID N.º: 13) puede ser la proteasa madura o proteasa madura correspondiente que tiene al menos 80% de identidad, al menos 90% de identidad, al menos 95% de identidad, al menos 96% de identidad, al menos 97% de identidad, al menos 99% de identidad con SEQ ID N.º: 13.

[0156] La glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* (SEQ ID N.º: 14 aquí), o un variante de la misma, puede ser la glucoamilasa madura o glucoamilasa madura correspondiente que tiene al menos 80% de identidad, al menos 90% de identidad, al menos 95% de identidad, al menos 96% de identidad, al menos 97% de identidad, al menos 99% de identidad con la SEQ ID N.º: 14 aquí.

[0157] La enzima generadora de fuente de carbohidratos, en particular glucoamilasa, puede ser una glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*. La glucoamilasa puede opcionalmente ser sustituida o combinada con una pululanasa, como se ha descrito anteriormente en la sección "Pululanasa", preferiblemente derivada de *Thermococcus litoralis* o *Thermococcus hydrothermalis.*

Materiales y métodos

Materiales:

[0158]

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

Alfa-amilasa 1407 (AA1407): alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones I181*+G182*+N193F+V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S truncada a 491 aminoácidos (SEQ ID N.º: 1)

Alfa-amilasa 369 (AA369): alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones: I181*+G182*+N193F+V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+Q254S+M284V truncada a 491 aminoácidos (SEQ ID N.º: 1).

Proteasa WT: metalo proteasa derivada de *Thermoascus aurantiacus* CGMCC n.º 0670 descrita como los aminoácidos 1-177 en SEQ ID N.º: 3 aquí y aminoácidos 1-177 en SEQ ID N.º: 2 en la WO 2003/048353.

Proteasa 036: metalo proteasa derivada de *Thermoascus aurantiacus* CGMCC nº 0670 descrita como los aminoácidos 1-177 en SEQ ID N.º: 3 aquí y aminoácidos 1-177 en SEQ ID N.º: 2 en la WO 2003/048353 con las mutaciones siguientes: D079L+S87P+0142L.

Proteasa 050: metalo proteasa derivada de *Thermoascus aurantiacus* CGMCC n.º 0670 descrita como los aminoácidos 1-177 en SEQ ID N.º: 3 aquí y los aminoácidos 1-177 en SEQ ID N.º: 2 en la WO 2003/048353 con las mutaciones siguientes: D79L+S87P+ A112P+ D142L.

Proteasa 196: metalo proteasa derivada de *Thermoascus aurantiacus* CGMCC nº 0670 descrita como los aminoácidos 1-177 en SEQ ID N.º: 3 aquí y los aminoácidos 1-177 en SEQ ID N.º: 2 en la WO 2003/048353 con las mutaciones siguientes: A27K+D79L+Y82F+S87G+D104P+A112P+A126V+D142L.

Proteasa Pfu: proteasa derivada de *Pyrococcus furiosus* adquirida de Takara Bio (Japón) como Pfu proteasa S (actividad 10,5 mg/mL) y también mostrada en SEQ ID N.º: 13 aquí.

Glucoamilasa PO: parte madura de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* descrita como SEQ ID N.º: 2 en PCT/CN10/071753 publicada como WO 2011/127802 y mostrada en SEQ ID N.º: 9 aquí.

Glucoamilasa PE001: variante de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* que tiene una sustitución K79V utilizando la secuencia madura mostrada en SEQ ID N.º: 14 para numeración.

Glucoamilasa 493 (GA493): variante de la variante PE001 de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* que además tiene las mutaciones siguientes: P11F+ T65A+ Q327F (usando SEQ ID N.º: 14 para numeración).

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

Glucoamilasa BL2: mezcla que comprende la glucoamilasa de *Talaromyces* emersonii descrita en la WO99/28448, la glucoamilasa de Trametes cingulata descrita en la WO 06/69289, y la alfa-amilasa de Rhizomucor pusillus con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD descrita como V039 en la tabla 5 en la WO 2006/069290 como actividades secundarias (proporción aproximadamente 65:15:1).

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

Sustrato en los ejemplos 6 y 20: Maíz molido y retroceso se obtuvo de plantas comerciales en los EE.UU.

Métodos

[0159] Identidad: la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro "identidad".

[0160] Para fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos, al igual que el grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos, se puede determinar mediante el programa "Align" que es un alineamiento de Needleman-Wunsch (es decir, un alineamiento global). El programa se usa para el alineamiento de polipéptido, al igual que secuencias de nucleótidos. La matriz de puntuación por defecto BLOSUM50 se usa para alineaciones de polipéptidos, y la matriz de identidad predeterminada se usa para alineaciones de nucleótidos. La penalización para el primer residuo de un espacio es -12 para polipéptidos y -16 para nucleótidos. Las penalizaciones para otros residuos de un espacio son -2 para polipéptidos y -4 para nucleótidos.

[0161] "Align" es parte del paquete FASTA versión v20u6 (véase W. R. Pearson and D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448, y W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA," Methods in Enzymology 183:63- 98). Las alineaciones de proteína de FASTA usan el algoritmo de Smith-Waterman sin limitación en el tamaño del espacio (véase "Smith-Waterman algorithm", T. F. Smith and M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147:195-197).

Ensayos de proteasa

Ensayo de AZCL-caseína

[0162] Una solución de 0,2% del sustrato azul AZCL-caseína se suspende en tampón Borax/NaH2PO4 pH 9 mientras se agita. La solución se distribuye mientras se agita en placas de microtitulación (100 microL en cada pocillo), se añaden 30 microL de muestra enzimática y las placas se incuban en un termomezclador Eppendorf durante 30 minutos a 45°C y 600 r.p.m.. La muestra enzimática desnaturalizada (100°C de ebullición durante 20min) se usa como un espacio en blanco. Tras la incubación la reacción se detiene por transferencia de la placa de microtitulación sobre hielo y la solución coloreada se separa del sólido por centrifugación a 3.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. 60 MicroL de sobrenadante se transfieren a una placa de microtitulación y la absorbancia a 595 nm se mide utilizando un lector de microplacas BioRad.

Ensayo de pNA

[0163] 50 microL de muestra que contiene proteasa se añaden a una placa de microtitulación y el ensayo comienza añadiendo 100 microL 1 mM de sustrato pNA (5 mg disueltos en 100 microL de DMSO y además diluidos a 10 mL con tampón Borax/NaH2PO4 pH 9,0). El aumento en OD405 a temperatura ambiente se monitoriza como una medida de la actividad de proteasa.

Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0164] La actividad de glucoamilasa se puede medir en unidades de glucoamilasa (AGU).

[0165] La unidad Novo de glucoamilasa (AGU) se define como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándar 37°C, pH 4,3, sustrato: maltosa 23,2 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

[0166] Se puede utilizar un sistema autoanalizador. Se añade mutarotasa al reactivo de glucosa deshidrogenasa de modo que cualquier alfa-D-glucosa presente se vuelva beta-D-glucosa. La glucosa deshidrogenasa reacciona específicamente con beta-D-glucosa en la reacción mencionada anteriormente, formando NADH que se determinada usando un fotómetro a 340 nm como una medida de la concentración de glucosa original.

| Incubación de AMG: | |
|---|---|
| Sustrato: | maltosa 23,2 mM |
| Tampón: | acetato 0,1 M |
| pH: | 4,30 ± 0,05 |
| Temperatura de incubación: | 37°C ± 1 |
| Tiempo de reacción: | 5 minutos |
| Rango de trabajo de enzima: | 0,5-4,0 AGU/mL |

| Reacción de color: | |
|---|---|
| GlucDH: | 430 U/L |
| Mutarotasa: | 9 U/L |
| NAD: | 0,21 mM |
| Tampón: | fosfato 0,12 M; 0,15 M NaCl |
| pH: | 7,60 ± 0,05 |
| Temperatura de incubación: | 37°C ± 1 |
| Tiempo de reacción: | 5 minutos |
| Longitud de onda: | 340 nm |

[0167] Una carpeta (EB-SM-0131.02/01) que describe este método analítico con más detalle está disponible en la solicitud de Novozymes A/S, Dinamarca.

Actividad de alfa-amilasa (KNU)

[0168] La actividad de alfa-amilasa se puede determinar utilizando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición de almidón de patata modificado por la enzima, y la reacción es seguida de 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.

[0169] Una Unidad de amilasa alfa Kilo Novo (KNU) se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (decir, a 37°C +/- 0,05,0,0003 M Ca2+; y pH 5,6) dextriniza 5260 mg de sustancia seca de almidón Merck Amylum soluble.

[0170] Una carpeta EB-SM-0009.02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible bajo pedido de Novozymes A/S, Dinamarca.

Determinación de la actividad de pululanasa (NPUN)

[0171] La actividad de endo-pululanasa en NPUN se mide con respecto a un estándar de pululanasa de Novozymes. Una unidad de pululanasa (NPUN) se define como la cantidad de enzima que libera 1 micro mol de glucosa por minuto bajo las condiciones estándar (0,7% de pululano rojo, (Megazyme) pH 5, 40°C, 20 minutos). La actividad se mide en NPUN/ml utilizando pululano rojo.

[0172] 1 mL de muestra diluida o estándar se incuba a 40°C durante 2 minutos. 0,5 ML 2% pululano rojo, 0,5 M KCl, 50 mM ácido cítrico, pH 5 se agrega y mezcla. Los tubos se incuban a 40°C durante 20 minutos y se detienen añadiendo 2,5 ml 80% de etanol. Los tubos se dejan en reposo a temperatura ambiente durante 10-60 minutos seguido de centrifugación 10 minutos a 4.000 r.p.m.. OD de los sobrenadantes se mide luego a 510 nm y la actividad se calcula utilizando una curva estándar.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1**

Estabilidad de las variantes de alfa-amilasa

[0173] La estabilidad de una alfa-amilasa de referencia (alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones I181*+G182*+N193F truncadas a 491 aminoácidos (SEQ ID N.º: 1 numeración)) y variantes de alfa-amilasa de la misma se determinó por incubación de la alfa-amilasa de referencia y variantes a pH 4,5 y 5,5 y temperaturas de 75°C y 85°C con 0,12 mM $CaCl_2$ seguido de determinación de actividad residual utilizando el sustrato EnzChek® (equipo de ensayo EnzChek® Ultra Amylase, E33651, Molecular Probes).

[0174] Muestras enzimáticas purificadas se diluyeron a concentraciones de trabajo de 0,5 y 1 o 5 y 10 ppm (microgramos/ml) en el tampón de dilución enzimática (10 mM acetato, 0,01% Tritón X100, 0,12 mM $CaCl_2$, pH 5,0). Veinte microlitros de muestra enzimática se transfirieron a PCR MTP de 48-pocillos y 180 microlitros de tampón de estabilidad (150 mM acetato, 150 mM MES, 0,01% Tritón X100, 0,12 mM $CaCl_2$, pH 4,5 o 5,5) se añadió a cada pocillo y se mezcló. El ensayo se realizó utilizando dos concentraciones de enzima por duplicado. Antes de la incubación a 75°C u 85°C, 20 microlitros se retiraron y almacenan en hielo como muestras de control. La incubación fue realizada en una máquina de PCR a 75°C y 85°C. Después de la incubación las muestras fueron diluidas a 15 ng/mL en el tampón de actividad residual (100 mM acetato, 0,01% Tritón X100, 0,12 mM $CaCl_2$, pH 5,5) y 25 microlitros de enzima diluida se transfirieron a negro 384-MTP. La actividad residual fue determinada utilizando el sustrato EnzChek añadiendo 25 microlitros a la solución de sustrato (100 microgramos/ml) a cada pocillo. La fluorescencia se determinó cada minuto durante 15 minutos usando filtro de excitación a 485-P nm y filtro de emisión a 555 nm (lector de fluorescencia es Polarstar, BMG). La actividad residual se normalizó para muestras de control para cada configuración.

[0175] Asumiendo que la vida media de desintegración logarítmica (T ½ (min)) se calculó utilizando la ecuación: T ½ (min) = T(min)*LN(0,5)/LN(%RA/100), donde T es tiempo de incubación de ensayo en minutos, y %RA es % de actividad residual determinada en el ensayo.

[0176] Usando esta configuración de ensayo la vida media se determinó para la alfa-amilasa de referencia y la variante de la misma como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

| **Mutaciones** | **T½ (min) (pH 4,5, 75°C, 0,12 mM $CaCl_2$)** | **T½ (min) (pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$)** | **T½ (min) (pH 5,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$)** |
|---|---|---|---|

| **Mutaciones** | **T½ (min) (pH 4,5, 75°C, 0,12 mM $CaCl_2$)** | **T½ (min) (pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$)** | **T½ (min) (pH 5,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$)** |
|---|---|---|---|
| Referencia alfa-amilasa A | 21 | 4 | 111 |
| Referencia alfa-amilasa A con la sustitución V59A | 32 | 6 | 301 |
| Referencia alfa-amilasa A con la sustitución V59E | 28 | 5 | 230 |
| Referencia alfa-amilasa A con la sustitución V59I | 28 | 5 | 210 |
| Referencia alfa-amilasa A con la sustitución V59Q | 30 | 6 | 250 |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones V59A+Q89R+ G112D+E129V+K177L+R179E+ K220P+N224L+Q254S | 149 | 22 | ND |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones V59A+Q89R+E129V+ K177L+R179E+H208Y+K220P+ | >180 | 28 | ND |
| N224L+Q254S | | | |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones V59A+Q89R+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ Q254S+D269E+D281N | 112 | 16 | ND |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones V59A+Q89R+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ Q254S+I270L | 168 | 21 | ND |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones V59A+Q89R+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ Q254S+H274K | >180 | 24 | ND |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones V59A+Q89R+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ Q254S+Y276F | 91 | 15 | ND |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones V59A+E129V+ R157Y+K177L+R179E+K220P+ N224L+S242Q+Q254S | 141 | 41 | ND |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+H208Y+K220P+ N224L+S242Q+Q254S | >180 | 62 | ND |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ S242Q+Q254S | >180 | 49 | >480 |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ S242Q+Q254S+H274K | >180 | 53 | ND |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ S242Q+Q254S+Y276F | >180 | 57 | ND |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ S242Q+Q254S+D281 N | >180 | 37 | ND |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ S242Q+Q254S+M284T | >180 | 51 | ND |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ S242Q+Q254S+G416V | >180 | 45 | ND |

| **Mutaciones** | **T½ (min) (pH 4,5, 75°C, 0,12 mM $CaCl_2$)** | **T½ (min) (pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$)** | **T½ (min) (pH 5,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$)** |
|---|---|---|---|
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ Q254S | 143 | 21 | >480 |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones V59A+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ Q254S+M284T | >180 | 22 | ND |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones A91L+M961+E129V+ K177L+R179E+K220P+N224L+ S242Q+Q254S | >180 | 38 | ND |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones E129V+K177L+ R179E | 57 | 11 | 402 |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones E129V+K177L+ R179E+K220P+N224L+S242Q+ Q254S | 174 | 44 | >480 |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones E129V+K177L+ R179E+K220P+N224L+S242Q+ Q254S+Y276F+L427M | >180 | 49 | >480 |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones E129V+K177L+ R179E+K220P+N224L+S242Q+ Q254S+M284T | >180 | 49 | >480 |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones E129V+K177L+ R179E+K220P+N224L+S242Q+ Q254S+N376*+1377* | 177 | 36 | >480 |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones E129V+K177L+ R179E+K220P+N224L+Q254S | 94 | 13 | >480 |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones E129V+K177L+ R179E+K220P+N224L+Q254S+ M284T | 129 | 24 | >480 |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones E129V+K177L+ R179E+S242Q | 148 | 30 | >480 |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones E129V+K177L+ R179V | 78 | 9 | >480 |
| Referencia alfa-amilasa A con | 178 | 31 | >480 |
| las sustituciones E129V+K177L+ R179V+K220P+N224L+S242Q+ Q254S | | | |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones K220P+N224L+ S242Q+Q254S | 66 | 17 | >480 |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones K220P+N224L+ Q254S | 30 | 6 | 159 |
| Referencia alfa-amilasa A con la sustitución M284T | 35 | 7 | 278 |
| Referencia alfa-amilasa A con las sustituciones M284V | 59 | 13 | ND |
| ND no determinado | | | |

[0177] Los resultados demostraron que las variantes de alfa-amilasa tienen una vida media y estabilidad significativamente superior que la alfa-amilasa de referencia.

**Ejemplo 2**

Preparación de variantes de proteasa y prueba de termoestabilidad

Cepas y plásmidos

[0178] Se usó DH12S de *E. coli* (disponible de Gibco BRL) para rescate del plásmido de levadura. pJTP000 es un vector transportador de *S. cerevisiae* y *E. coli* bajo el control del promotor TPI, construido a partir de pJC039 descrito en la WO 01/92502, donde el gen de proteasa M35 de *Thermoascus aurantiacus* (WO 03/048353) ha sido insertado.

[0179] Células competentes YNG318 de *Saccharomyces cerevisiae*: MATa Dpep4[cir+] ura3-52, leu2-D2, his 4-539 se usó para expresión de variantes de proteasa. Se describe en J. Biol. Chem. 272 (15), págs. 9720-9727, 1997.

Medios y sustratos

[0180]

10X Solución basal: base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (DIFCO) 66,8 g/l, succinato 100 g/l, NaOH 60 g/l.
SC-glucosa: 20 % glucosa (es decir, una concentración final de 2 % = 2 g/100 ml)) 100 ml/l, 5% treonina 4 ml/l, 1 % triptófano10 ml/l, 20 % ácidos de casamino 25 ml/l, 10 X solución basal 100 ml/l. La solución se esteriliza utilizando un filtro de un tamaño de poro de 0,20 micrómetros. Agar (2%) y $H_2O$ (aprox. 761 Ml) se someten a autoclave juntos, y la solución de SC-glucosa esterilizada separadamente se añade a la solución de agar.
YPD: bacto-peptona 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l, 20 % glucosa 100 ml/l.
YPD+Zn: YPD+0,25 mM $ZnSO_4$.
Solución PEG/LiAc: 40 % PEG4000 50 ml, 5 M acetato de litio 1 ml.
Placa de microtitulación ceína de 96 pocillos:

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

Manipulaciones de ADN

[0181] A menos que se establezca de otro modo, las manipulaciones y transformaciones de ADN se realizaron utilizando métodos estándar de biología molecular como se describe en Sambrook et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab. Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. et al. (eds.) "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R. and Cutting, S. M. (Eds.).

Transformación de levadura

[0182] La transformación de levadura se realizó utilizando el método de acetato de litio. 0,5 microL de vector (digerido por endonucleasas de restricción) y 1 microL de fragmentos de la PCR se mezclaron. La mezcla de ADN, 100 microL de células competentes YNG318, y 10 microL de ADN portador de YEAST MAKER (Clontech) se añadieron a un tubo de 12 ml de polipropileno (Falcon 2059). Añadir 0,6 ml de solución PEG/LiAc y mezclar suavemente. Incubar durante 30 min a 30°C, y 200 r.p.m. seguido de 30 min a 42°C (choque térmico). Transferir a un tubo Eppendorf y centrifugar durante 5 seg. Eliminar el sobrenadante y diluir en 3 ml de YPD. Incubar la suspensión celular durante 45 min a 200 r.p.m. a 30°C. Verter la suspensión en placas de SC-glucosa e incubar a 30°C durante 3 días para hacer crecer colonias. El ADN total de levadura se extrae mediante el equipo Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep (ZYMO research).

Secuenciación del ADN

[0183] La transformación de *E. coli* para la secuenciación del ADN de se efectuó por electroporación (BIO-RAD Gene Pulser). Los plásmidos de ADN fueron preparados por el método alcalino (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor) o con el equipo Qiagen® Plasmid. Fragmentos de ADN fueron recuperados del gel de agarosa mediante el equipo de extracción en gel de Qiagen. La PCR se realizó utilizando un motor de ADN PTC-200. El analizador genético ABI PRISMTM 310 se usó para determinar todas las secuencias de ADN.

Construcción de vector de expresión de proteasa

[0184] El gen de proteasa M35 de *Themoascus* fue amplificado con el par de cebadores Prot F (SEQ ID N.º: 4) y Prot R (SEQ ID N.º: 45). Los fragmentos de la PCR resultantes fueron introducidos en el YNG318 de *S. cerevisiae* con el vector pJC039 (descritos en la WO2001/92502) digeridos con enzimas de restricción para eliminar el gen de cutinasa de *Humicola insolens*.

[0185] El plásmido en los clones de levadura en las placas de SC-glucosa fue recuperado para confirmar la secuencia interna y se denominó pJTP001. Construcción de biblioteca de levadura y variantes dirigidas al sitio.

[0186] Se construyeron bibliotecas en levaduras y variantes dirigidas al sitio por el método de PCR de SOE (empalme por extensión de superposición, véase "PCR: A practical approach", p. 207-209, Oxford University press, eds. McPherson, Quirke, Taylor), seguido de recombinación *in vivo* de levadura.

Cebadores generales para amplificación y secuenciación

[0187] Los cebadores AM34 (SEQ ID N.º:5) y AM35 (SEQ ID N.º: 6) se usaron para hacer que los fragmentos de ADN que contienen cualquier fragmento mutado por el método SOE junto con cebadores degenerados (AM34 + cebador antisentido y AM35 + cebador sentido) o sólo para amplificar un gen de proteasa entero (AM34 + AM35).

| Sistema de reacción por PCR: | Condiciones: | |
|---|---|---|
| 48,5 microL $H_2O$ | 1 | 94°C 2 min |
| 2 microesferas de PCR puRe Taq listas para uso (Amersham Biosciences) | 2 | 94°C 30 seg. |
| 0,5 micro L X 2 100 pmol/microL de cebadores | 3 | 55°C 30 seg. |
| 0,5 microL DNA modelo | 4 | 72°C 90 seg. |
| | 2-4 | 25 ciclos |
| | 5 | 72°C 10 min |

[0188] Los fragmentos de ADN se recuperaron del gel de agarosa mediante el equipo de extracción de gel Qiagen. Los fragmentos purificados resultantes fueron mezclados con la asimilación vectorial. La solución mezclada se introdujo en *Saccharomyces cerevisiae* para construir bibliotecas o variantes dirigidas al sitio por recombinación *in vivo*.

Ensayo de actividad relativa

[0189] Clones de levadura en SC-glucosa fueron inoculados en un pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos que contiene medio YPD+Zn y se cultivó a 28°C durante 3 días. Los sobrenadantes de cultivo se aplicaron a una placa de microtitulación de 96 pocillos de ceína y se incubaron a al menos 2 temperaturas (p. ej. 60°C y 65°C, 70°C y 75°C, 70°C y 80°C) durante más de 4 horas o durante toda la noche. La turbidez de ceína en la placa se midió como A630 y la actividad relativa (temperaturas superior/inferior) fue determinada como un indicador de mejora de la termoactividad. Los clones con actividad relativa más alta que la variante parental fueron seleccionados y la secuencia fue determinada.

Ensayo de actividad restante

[0190] Los clones de levadura en la SC-glucosa fueron inoculadas a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se cultivaron a 28°C durante 3 días. La actividad de proteasa fue medida a 65°C usando azocaseína (Megazyme) después de la incubación del sobrenadante del cultivo en 20 mM de tampón de acetato sódico, pH 4,5, durante 10 min a una temperatura determinada (80°C o 84°C con 4°C como una referencia) para determinar la actividad restante. Los clones con actividad restante más alta que la variante parental fueron seleccionados y la secuencia fue determinada.

Ensayo de azocaseína

[0191] 20 microL de muestras fueron mezclados con 150 microL de solución de sustrato (4 ml de 12,5% de azocaseína en etanol en 96 ml de 20 mM de acetato sódico, pH 4,5, conteniendo 0,01 % triton-100 y 0,25 mM $ZnSO_4$) e incubado durante 4 horas o más.

[0192] Después de añadir 20 microL/pocillo de solución al 100 % de ácido tricloroacético (ATC), la placa fue centrifugada y 100 microL de sobrenadantes se sacaron con pipeta para medir A440. Expresión de variantes de proteasa en *Aspergillus oryzae*

[0193] Los constructos que comprenden los genes de la variante de proteasa se usaron para construir vectores de expresión para *Aspergillus.* Los vectores de expresión de *Aspergillus* consisten en un casete de expresión basado en el promotor de amilasa II neutra de *Aspergillus niger* fusionado con la secuencia líder no traducida de triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans* (Pna2/tpi) y el terminador de amiloglicosidasa de *Aspergillus niger* (Tamg). También estaba presente en el plásmido el marcador selectivo de *Aspergillus* amdS de *Aspergillus nidulans* que permite el crecimiento en la acetamida como única fuente de nitrógeno. Los plásmidos de expresión para variantes de proteasa fueron transformados en *Aspergillus* como se describe en Lassen et al. (2001), Appl.

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

Purificación de variantes expresadas

[0194]

1. Ajustar pH de 0.22 µm de muestra de fermentación filtrada a 4,0.
2. Poner la muestra en un baño de hielo con agitación magnética. Añadir (NH4)2SO4 en partes alícuotas pequeña (correspondientes a aprox. 2,0-2,2 M (NH4)2SO4 sin tener en cuenta el aumento de volumen cuando se añade el compuesto).
3. Después de la adición final de (NH4)2SO4, incubar la muestra en el baño de hielo con agitación magnética suave durante min. 45 min.
4. Centrifugación: Centrifugadora refrigerada de alta velocidad Hitachi himac CR20G equipada con cabeza de rotor R20A2, 5°C, 20.000 r.p.m., 30 min.
5. Disolver el precipitado formado en 200 ml 50 mM de Na-acetato pH 4,0.
6. Filtrar la muestra por succión en vacío utilizando una membrana de 0,22 µm PES (IWAKI).
7. Desalar/intercambiar tampón la muestra a 50 mM de Na-acetato pH 4,0 usando ultrafiltración (Vivacell 250 de VivaScience equipado con membrana de 5 kDa PES MWCO) durante toda la noche en una cámara fría. Diluir la muestra de retenido a 200 ml utilizando 50 mM de Na-acetato pH 4,0. La conductividad de la muestra es preferiblemente menor de 5 mS/cm.
8. Cargar la muestra sobre una columna de intercambio de cationes equilibrada con 50 mM de Na-acetato pH 4,0. Lavar la muestra no unida fuera de la columna utilizando 3 volúmenes de columna del tampón de unión (50 mM de Na-acetato pH 4,0), y eluir la muestra utilizando un gradiente lineal, 0-100% tampón de elución (50 mM Na-acetato + 1 M de NaCl pH 4,0) en 10 volúmenes de columna.
9. Las fracciones recogidas se ensayan mediante un ensayo de endoproteasa (véase más adelante) seguido de SDS-PAGE estándar (condiciones de reducción) en fracciones seleccionadas. Las fracciones se agrupan basadas en el ensayo de endoproteasa y SDS-PAGE.

Ensayo de endoproteasa

[0195]

1. Tableta de Protazyme OL/5 ml 250 mM de Na-acetato pH 5,0 se disuelve por agitación magnética (sustrato: endoproteasa tableta de Protazyme AK de Megazyme - número de catálogo PRAK 11/08).
2. Con agitación, 250 microL de solución de sustrato se transfieren a un tubo de 1,5 ml Eppendorf.
3. 25 microL de muestra se añaden a cada tubo (el blanco es tampón de muestra).
4. Los tubos se incuban en un termomezclador con agitación (1.000 r.p.m.) a 50°C durante 15 minutos.
5. 250 microL de 1 M NaOH se añade a cada tubo, seguido de agitación en vórtex.
6. Centrifugación durante 3 min. a 16.100 × G y 25°C.
7. 200 microL del sobrenadante se transfiere a un MTP, y la absorbancia a 590 nm se registra.

Resultados

[0196]

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

| **Variante** | **Sustitución(es)** | **Actividad relativa 65°C/60°C** |
|---|---|---|
| WT | ninguna | 31% |
| JTP004 | S87P | 45% |
| JTP005 | A112P | 43% |
| JTP008 | R2P | 71% |
| JTP009 | D79K | 69% |
| JTP010 | D79L | 75% |
| JTP011 | D79M | 73% |
| JTP012 | D79L/S87P | 86% |
| JTP013 | D79L/S87P/A112P | 90% |

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

| **Variante** | **Sustitución(es)** | **Actividad relativa 65°C/60°C** |
|---|---|---|
| JTP014 | D79L/S87P/A112P | 88% |
| JTP016 | A73C | 52% |
| JTP019 | A126V | 69% |
| JTP021 | M152R | 59% |

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

| **Variante** | **Sustitución(es) y/o deleción(es)** | **Actividad relativa** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **70°C/65°C** | **75°C/65°C** | **75°C/70°C** |
| WT | ninguna | 59% | 17% | |
| JTP036 | D79L/S87P/D142L | 73% | 73% | |
| JTP040 | T54R/D79L/S87P | | 71% | |
| JTP042 | Q53K/D79L/S87P/I173V | | 108% | |
| JTP043 | Q53R/D79L/S87P | | 80% | |
| JTP045 | S41 R/D79L/S87P | | 82% | |
| JTP046 | D79L/S87P/Q158W | | 96% | |
| JTP047 | D79L/S87P/S157K | | 85% | |
| JTP048 | D79L/S87P/D104R | | 88% | |
| JTP050 | D79L/S87P/A112P/D142L | | 88% | |
| JTP051 | S41 R/D79L/S87P/A112P/D142L | | | 102% |
| JTP052 | D79L/S87P/A112P/D142L/S157K | | | 111% |
| JTP053 | S41 R/D79L/S87P/A112P/D142L/S157K | | | 113% |
| JTP054 | ΔS5/D79L/S87P | | | 92% |
| JTP055 | ΔG8/D79L/S87P | | | 95% |
| JTP059 | C6R/D79L/S87P | | | 92% |
| JTP061 | T46R/D79L/S87P | | | 111% |
| JTP063 | S49R/D79L/S87P | | | 94% |
| JTP064 | D79L/S87P/N88R | | | 92% |
| JTP068 | D79L/S87P/T114P | | | 99% |
| JTP069 | D79L/S87P/S115R | | | 103% |
| JTP071 | D79L/S87P/T116V | | | 105% |
| JTP072 | N26R/D79L/S87P | | 92% | |
| JTP077 | A27K/D79L/S87P/A112P/D142L | | 106% | |
| JTP078 | A27V/D79L/S87P/A112P/D142L | | 100% | |
| JTP079 | A27G/D79L/S87P/A112P/D142L | | 104% | |

Tabla 4. Actividad relativa de variantes de proteasa. Numeración de sustitución(es) comienza a partir del N-terminal del péptido maduro en los aminoácidos 1 a 177 de SEQ ID N.º: 2.

| **Variante** | **Sustitución(es) y/o deleción(es)** | **Actividad relativa 75°C/65°C** | **Actividad restante** | |
|---|---|---|---|---|
| | | | **80°C** | **84°C** |
| JTP082 | ΔS5/D79L/S87P/A112P/D142L | 129% | | 53% |
| JTP083 | T46R/D79L/S87P/A112P/D142L | 126% | | |
| JTP088 | Y43F/D79L/S87P/A112P/D142L | 119% | | |
| JTP090 | D79L/S87P/A112P/T124L/D142L | 141% | | |
| JTP091 | D79L/S87P/A112P/T124V/D142L | 154% | 43% | |
| JTP092 | ΔS5/N26R/D79L/S87P/A112P/D142L | | | 60% |
| JTP095 | N26R/T46R/D79L/S87P/A112P/D142L | | | 62% |
| JTP096 | T46R/D79L/S87P/T116V/D142L | | | 67% |
| JTP099 | D79L/P81 R/S87P/A112P/D142L | | | 80% |
| JTP101 | A27K/D79L/S87P/A112P/T124V/D142L | | 81% | |
| JTP116 | D79L/Y82F/S87P/A112P/T124V/D142L | | 59% | |
| JTP117 | D79L/Y82F/S87P/A112P/T124V/D142L | | 94% | |
| JTP127 | D79L/S87P/A112P/T124V/A126V/D142L | | 53% | |

Tabla 5. Actividad relativa de variantes de proteasa. Numeración de sustitución(es) comienza a partir del N-terminal del péptido maduro en los aminoácidos 1 a 177 de SEQ ID N.º: 2.

| **Variante** | **Sustituciones** | **Actividad relativa** | | |
|---|---|---|---|---|
| | | **75°C/70°C** | **80°C/70°C** | **85°C/70°C** |
| JTP050 | D79L S87P A112P D142L | 55% | 23% | 9% |
| JTP134 | D79L Y82F S87P A112P D142L | | 40% | |
| JTP135 | S38T D79L S87P A112P A126V D142L | | 62% | |
| JTP136 | D79L Y82F S87P A112P A126V D142L | | 59% | |
| JTP137 | A27K D79L S87P A112P A126V D142L | | 54% | |
| JTP140 | D79L S87P N98C A112P G135C D142L | 81% | | |
| JTP141 | D79L S87P A112P D142L T141C M161C | 68% | | |
| JTP143 | S36P D79L S87P A112P D142L | 69% | | |
| JTP144 | A37P D79L S87P A112P D142L | 57% | | |
| JTP145 | S49P D79L S87P A112P D142L | 82% | 59% | |
| JTP146 | S50P D79L S87P A112P D142L | 83% | 63% | |
| JTP148 | D79L S87P D104P A112P D142L | 76% | 64% | |
| JTP161 | D79L Y82F S87G A112P D142L | | 30% | 12% |
| JTP180 | S70V D79L Y83F S87G Y97W A112P D142L | | 53% | |
| JTP181 | D79L Y82F S87G Y97W D104P A112P D142L | | 45% | |
| JTP187 | S79V D79L Y82F S87G A112P D142L | | 45% | |
| JTP188 | D79L Y82F S87G D104P A112P D142L | | 43% | |

| Tabla 5. Actividad relativa de variantes de proteasa. Numeración de sustitución(es) comienza a partir del N-terminal del péptido maduro en los aminoácidos 1 a 177 de SEQ ID N.º: 2. | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Variante** | **Sustituciones** | **Actividad relativa** | | |
| | | **75°C/70°C** | **80°C/70°C** | **85°C/70°C** |
| JTP189 | D79L Y82F S87G A112P A126V D142L | | 46% | |
| JTP193 | Y82F S87G S70V D79L D104P A112P D142L | | | 15% |
| JTP194 | Y82F S87G D79L D104P A112P A126V D142L | | | 22% |
| JTP196 | A27K D79L Y82F S87G D104P A112P A126V D142L | | | 18% |

| Tabla 5. Actividad relativa de variantes de proteasa. Numeración de sustitución(es) comienza a partir del N-terminal del péptido maduro en los aminoácidos 1 a 177 de SEQ ID N.º: 2. | | | |
|---|---|---|---|
| **Variante** | **Sustituciones** | **Actividad relativa** | |
| | | **75°C/70°C** | **80°C/70°C** |
| JTP196 | A27K D79L Y82F S87G D104P A112P A126V D142L | 102% | 55% |
| JTP210 | A27K Y82F S87G D104P A112P A126V D142L | 107% | 36% |
| JTP211 | A27K D79L Y82F D104P A112P A126V D142L | 94% | 44% |
| JTP213 | A27K Y82F D104P A112P A126V D142L | 103% | 37% |

**Ejemplo 3**

Perfil de temperatura de variantes seleccionadas utilizando enzimas purificadas

[0197] Se purificaron variantes seleccionadas con buena termoestabilidad y las enzimas purificadas se usaron en un ensayo de ceína-BCA como se describe abajo. La actividad de proteasa restante fue determinada a 60°C tras la incubación de la enzima a temperaturas elevadas como se indica durante 60 min.

Ensayo de ceína-BCA:

[0198] El ensayo de ceína-BCA se realizó para detectar cuantificación de proteína soluble liberada de la ceína por proteasas variantes a varias temperaturas.

Protocolo:

[0199]

1) Mezclar 10 microlitros de 10 microgramos/ml de soluciones enzimáticas y 100ul de 0,025% de solución de ceína en una placa de microtitulación (MTP).
2) Incubar a varias temperaturas durante 60min.
3) Añadir 10 microlitros de solución al 100% de ácido tricloroacético (ATC).
4) Centrifugar MTP a 3.500 r.p.m. durante 5 min.
5) Sacar 15 microlitros para un nuevo MTP conteniendo 100 microlitros de solución de ensayo BCA (número de catálogo de Pierce: 23225, equipo de ensayo de proteína BCA).
6) Incubar durante 30 min. a 60°C.
7) Medir A562.

[0200] Los resultados se muestran en la tabla 5. Todas las variantes evaluadas mostraron una termoestabilidad mejorada en comparación con el peso de la proteasa.

Tabla 5. Ensayo de ceína-BCA

| WT/Variante | Muestra incubada 60 min a temperaturas indicadas (°C) (µg/ml péptido equivalente de albúmina de suero bovino liberado) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 60°C | 70°C | 75°C | 80°C | 85°C | 90°C | 95°C |

| WT/Variante | Muestra incubada 60 min a temperaturas indicadas (°C) (µg/ml péptido equivalente de albúmina de suero bovino liberado) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 60°C | 70°C | 75°C | 80°C | 85°C | 90°C | 95°C |
| WT | 94 | 103 | 107 | 93 | 58 | 38 | |
| JTP050 | 86 | 101 | 107 | 107 | 104 | 63 | 36 |
| JTP077 | 82 | 94 | 104 | 105 | 99 | 56 | 31 |
| JTP188 | 71 | 83 | 86 | 93 | 100 | 75 | 53 |
| JTP196 | 87 | 99 | 103 | 106 | 117 | 90 | 38 |

**Ejemplo 4**

Caracterización de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*

[0201] La glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se describe en SEQ ID N.º: 9 aquí.

Sustrato. Sustrato: 1% de almidón soluble (Sigma S-9765) en agua desionizada
Tampón de reacción: 0,1 M de tampón acetato a pH 5,3
Equipo de determinación de concentración de glucosa: equipo de ensayo de glucosa Wako (glucosa LabAssay, WAKO, número de catálogo 298-65701).
Condición de reacción. 20 MicroL de almidón soluble y 50 microL de tampón acetato a pH 5,3 se mezclaron. 30 MicroL de solución enzimática (50 micro g de proteína enzimática/ml) se añadió a un volumen final de 100 microL seguido de incubación a 37°C durante 15 min.
La concentración de glucosa fue determinada por equipos Wako.
Todo el trabajo se realizó en paralelo.
Temperatura óptima. Para evaluar la temperatura óptima de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* el ensayo de "condición de reacción" anteriormente descrito se realizó a 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90 y 95°C. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Temperatura óptima

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

[0202] De los resultados se puede observar que la temperatura óptima para la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en las condiciones dadas está entre 50°C y 70°C y la glucoamilasa mantiene más del 80% de actividad a 95°C.
Estabilidad térmica. Para evaluar la estabilidad térmica de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* el ensayo de condición de reacción se modificó en que la solución enzimática y el tampón acetato se preincubaron durante 15 min a 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90 y 95°C. Después de la incubación, 20 microL de almidón se añadieron a la solución y el ensayo se realizó como se ha descrito anteriormente.

[0203] Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7.Estabilidad térmica

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

[0204] De los resultados se puede observar que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* es estable hasta 70 °C después de la preincubación durante 15 min en que ésta mantiene más del 80% de actividad.
pH óptimo. Para evaluar el pH óptimo de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*, el ensayo de condición de reacción anteriormente descrito se realizó a pH 2,0, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0,6,0 7,0, 8,0, 9,0,10,0 y 11,0. En vez de usar el tampón de acetato descrito en el ensayo de la condición de reacción, se usó el siguiente tampón 100mM

de ácido succínico, HEPES, CHES, CAPSO, 1 mM $CaCl_2$, 150mM KCl, 0,01% Tritón X-100, pH ajustado a 2,0, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0,6,0, 7,0, 8,0, 9,0,10,0 o 11,0 con HCl o NaOH.

[0205] Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. pH óptimo

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

[0206] De los resultados se puede observar que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en las condiciones dadas tiene la actividad máxima a pH 5,0. La glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* está activa en un amplio rango de pH en el que mantiene más del 50% de la actividad de pH 2 a 7.
Estabilidad de pH. Para evaluar la estabilidad térmica de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* el ensayo de condición de reacción se modificó en que la solución enzimática (50micro g/mL) fue preincubada durante 20 horas en tampones con pH 2,0, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0,6,0 7,0, 8,0, 9,0,10,0 y 11,0 utilizando los tampones descritos como pH óptimo. Después de la preincubación, 20 microL de almidón soluble a un volumen final de 100 microL se añadió a la solución y el ensayo se realizó como se ha descrito anteriormente.

[0207] Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Estabilidad de pH

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

[0208] De los resultados se puede observar que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* es estable a partir de pH 3 a pH 7 después de la preincubación durante 20 horas y reduce su actividad a pH 8.

**Ejemplo 5**

Termoestabilidad de proteasa Pfu

[0209] La termoestabilidad de la proteasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu S) comprada de Takara Bio Inc, (Japón) fue evaluada usando los mismos métodos que en el ejemplo 2. Se ha observado que la termoestabilidad (actividad relativa) fue 110% a (80°C/70°C) y 103% (90°C/70°C) a pH 4,5.

**Ejemplo 6 (forma de realización de la invención)**

Producción de etanol usando alfa-amilasa 1407 y proteasa Pfu para licuefacción

[0210] El fin de este experimento era evaluar el rendimiento de la aplicación de proteasa Pfu derivada de *Pyrococcus furiosus* añadida durante la licuefacción a pH 5,4 y 5,8, respectivamente, a 85°C durante 2 horas.

Licuefacción (Labomat)

[0211] Cada licuefacción recibió maíz molido (84,19% DS), retroceso (6,27% DS), y agua del grifo buscando un peso total de 100 g para 32,50% de sólidos secos (DS). El retroceso fue mezclado a 30% p/p del peso total de lodo. El pH del lodo inicial fue aproximadamente 5,2 y se ajustó a pH 5,4 o 5,8 con 50% p/p de hidróxido sódico antes de la licuefacción. Todas las enzimas fueron añadidas según el diseño experimental de la tabla 11 a continuación. La licuefacción se produjo en un Labomat utilizando las condiciones siguientes: 5°C/min. Rampa, rampa de 17 minutos, tiempo de espera de 103 minutos a 85°C, 40 r.p.m. para todo el ciclo, recipientes de 200 mL de acero inoxidable. Después de la licuefacción, todos los recipientes se enfriaron en un baño de hielo y se prepararon para fermentación basado en el protocolo enumerado más adelante bajo SSF.

Sacarificación y fermentación simultánea (SSF)

[0212] Cada pasta se ajustó a pH 5,0 con 50% p/p hidróxido sódico o 40% v/v ácido sulfúrico. Se aplicó penicilina a cada pasta a una concentración total de 3 ppm. Los tubos se prepararon con pasta alicuotando aproximadamente 4,5 g de la pasta por tubos de ensayo pre-perforados de 15 mL para permitir la liberación de $CO_2$. Los tubos de ensayo se dejaron quietos, durante toda la noche, a 4°C hasta la mañana siguiente.

[0213] Todos los tubos de ensayo de pasta se retiraron del almacenamiento en frío y se calentaron hasta 32°C en la cámara de incubación de entrada. Una vez calentada, la glucoamilasa se dosificó en cada tubo de pasta a 0,50 AGU/g DS, se añadió agua de modo que todos los tubos recibieron 120 µL de líquido y cada muestra de pasta recibió 100 µL de levadura rehidratada. Se preparó levadura rehidratada mediante la mezcla de 5,5 g de Fermentis RED STAR en 100 mL de agua del grifo a 32°C durante al menos 15 minutos.

[0214] Al supervisar la pérdida de peso del CO2 en el tiempo, cada unidad de $CO_2$ generada y perdida se convierte en etanol en gramo producido por gramo de sólidos secos (g EtOH/g DS) mediante el siguiente:

$$\text{g etanol/ g DS} = \frac{\text{g CO2 pérdida peso} \times \frac{44{,}0098\ \text{g CO2}}{1\ \text{mol CO2}} \times \frac{1\ \text{mol etanol}}{1\ \text{mol CO2}} \times \frac{46{,}094\ \text{g etanol}}{1\ \text{mol etanol}}}{\text{g pasta en tubo} \times \%\text{DS de pasta}}$$

Análisis de HPLC

[0215] El muestreo de fermentación se produjo después de 54 horas de fermentación tomando 3 tubos por tratamiento. Cada muestra fue desactivada con 50 µL de 40% v/v $H_2SO_4$, agitada en vórtex, centrifugada a 1460xg durante 10 minutos, y filtración a través de un filtro Whatman pp de 0,45 µm. Las muestras de 54 horas se analizaron bajo HPLC sin más dilución. Las muestras fueron almacenadas a 4°C antes y durante el análisis de HPLC.

| | |
|---|---|
| Sistema HPLC | Serie Agilent 1100/1200 con software Chem Station<br>Degasser, bomba cuaternaria, automuestreador, compartimento de columna /con calentador<br>Detector de índice de refracción (RI) |
| Columna | Columna de exclusión iónica HPX- Bio-Rad 87H 300mm x 7,8mm part# 125-0140<br>Catión de cartucho de seguridad Bio-Rad H part# 125-0129, soporte part# 125-0131 |
| Método | 0,005M $H_2SO_4$ fase móvil<br>Caudal: 0,6 ml/min<br>Temperatura de columna: 65°C<br>Temperatura detectora RI: 55°C |

[0216] El método cuantificó analito(s) utilizando estándares de calibración de utilización para etanol (% p/v). Una calibración de cuatro puntos incluyendo el origen se usa para la cuantificación.

[0217] Cuando fue aplicable, los datos se analizaron utilizando el software JMP (Cary, NC) con Oneway ANOVA de pares usando Tukey-Kramer HSD o Dunnett's. Las barras de error indican que el 95% del nivel de confianza se estableció multiplicando el error típico del análisis Oneway Anova por 1,96.

| Licuefacción a 85°C durante 2 horas | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| pH | Alfa-amilasa | Dosis µg/g DS | Proteasa | Dosis µg/g DS | Glucoamilasa | Dosis µg/g DS |
| 5.4 | 1407 | 1.4 | - | - | - | - |
| 5.4 | 1407 | 1.4 | Pfu | 2 | - | - |
| 5.4 | 1407 | 1.4 | Pfu | 2 | PE001 | 10 |
| 5.8 | 1407 | 1.4 | - | - | - | - |
| 5.8 | 1407 | 1.4 | Pfu | 2 | - | - |
| 5.8 | 1407 | 1.4 | Pfu | 2 | PE001 | 10 |

Tabla 11. Plano experimental

Resultados:

[0218]

| | | | JMP Std | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Tratamiento | pH | EtOH (%p/v) | EtOH (%) | Error | 95%CI |
| Control | 5,8 | 8,6 | 100% | 0,015 | 0,029 |
| | 5,4 | 8,9 | 100% | 0,012 | 0,024 |
| Pfu | 5,8 | 11,0 | 128% | 0,015 | 0,029 |
| | 5,4 | 10,8 | 122% | 0,012 | 0,024 |
| Pfu+PE001 | 5,8 | 11,0 | 128% | 0,015 | 0,029 |
| | 5,4 | 11,0 | 124% | 0,012 | 0,024 |

**Ejemplo 7**

Producción de etanol con alfa-amilasa A y proteasa termoestable 050 y proteasa 036

[0219] El fin de este experimento fue evaluar el rendimiento de aplicación de dos variantes de proteasa termoestable de la proteasa de *Thermoascus auranticus* añadida durante la licuefacción a pH 5,4 a 85°C durante 2 horas.

Licuefacción

[0220] Maíz molido, retroceso y agua del grifo se mezclaron con 32,50 % de DS y se ajustaron a pH 5,4 con 50% v/v hidróxido sódico. Cada proteasa respectiva, se añadió mezclado bien, y seguido de adición alfa-amilasa a una dosis de 0,02% (p/p) por g de maíz. Se incubaron muestras al baño maría a 85°C durante dos horas y recibieron mezcla frecuente durante los primeros 15 minutos de incubación, cada 15 minutos a partir de entonces. Todas las pastas fueron refrigeradas después de la licuefacción y se mantuvieron hasta la fermentación.

Sacarificación y fermentación simultánea (SSF)

[0221] Las pastas se ajustaron a 32% DS con agua del grifo antes de SSF según se necesitó y dosificadas a una concentración total de 500 ppm de urea y 3 ppm de penicilina. No se hizo ningún ajuste de pH para la SSF después de la licuefacción. Aproximadamente 4,5g de pasta se añadió a tubos de ensayo de 15mL que estaban pre-perforados en la parte superior para permitir la liberación de $CO_2$. La glucoamilasa BL2 fue dosificada a 0,50 AGU/g DS, y se añadió agua a cada de tubo para asegurar que todas las muestras se procesaron con los mismos sólidos. Se preparó levadura rehidratada mediante la mezcla de 5,5 g de Fermentis RED STAR en 100mL de agua del grifo a 32°C durante al menos 15 minutos y cada probeta fue inoculada con 100µL, correspondiente a 30 millones de células por mL de pasta.

[0222] Todas las muestras de fermentación de 54 horas se seleccionaron para análisis de HPLC y se desactivaron con 50 µL de 40% v/v $H_2SO_4$, agitado en vórtex centrifugado a 1460xg durante 10 min., y luego filtrado a través de un filtro de 0,45 µm Whatman. Las muestras fueron almacenadas a 4°C antes del análisis de HPLC. El análisis de HPLC se hizo como se describe en el ejemplo 6.

[0223] Al controlar la pérdida de peso de $CO_2$ en el tiempo, cada unidad de pérdida de $CO_2$ se convirtió en gramo de etanol producido por gramo de sólidos secos (g EtOH/g DS) utilizando la fórmula del ejemplo 6.

[0224] Todas las licuefacciones incluyeron alfa-amilasa A.

| Tratamiento | EtOH (%p/v) | EtOH (%?) |
|---|---|---|
| Control | 12,26 | 100,0 |
| Proteasa WT | 12,39 | 101,0 |

| Tratamiento | EtOH (%p/v) | EtOH (%?) |
|---|---|---|
| Proteasa 036 | 12,55 | 102,4 |
| Proteasa 050 | 12,67 | 103,3 |

**Ejemplo 8**

Clonación de gen de glucoamilasa de cepa de *Penicillium oxalicum*

Preparación de ADNc de cepa de *Penicillium oxalicum*.

[0225] El ADNc fue sintetizado siguiendo la instrucción del 3' Rapid Amplifiction of cDNA End System (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.). Clonación del gen de glucoamilasa de la cepa de *Penicillium oxalicum*.

[0226] El gen de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* fue clonado utilizando el cebador de oligonucleótidos mostrado a continuación diseñado para amplificar el gen de glucoamilasa a partir del extremo 5'.

Cebador sentido: 5'-ATGCGTCTCACTCTATTATCAGGTG-3' (SEQ ID N.º: 15)

[0227] El gen de longitud total fue amplificado por PCR con cebador sentido y AUAP (suministrado por 3' Rapid Amplifiction of cDNA End System) usando Platinum HIFI Taq DNA polymerase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE.UU.). La reacción de amplificación estaba compuesta por 5 µl de 10x tampón PCR, 2 µl de 25mM MgCl2,1 µl de 10mM dNTP, 1 µl de 10uM cebador sentido, 1 µl de 10 uM AUAP, 2 µl de la primera cadena de ADNc, 0,5 µl de HIFI Taq, y 37,5 µl de agua desionizada. El programa de PCR fue: 94°C, 3mins; 10 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 60°C 40 segundos con 1°C reducción por ciclo, 68°C durante 2min; 25 ciclos de 94°C durante 40 segundos, 50°C durante 40 segundos, 68°C durante 2 min.; extensión final a 68°C durante 10 min.

[0228] El fragmento de PCR obtenido fue clonado en el vector pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.) utilizando un Sistema de vector pGEM-Tv (Promega Corporation, Madison, WI, EE.UU.) para generar el plásmido AMG 1. El gen de glucoamilasa insertado en el plásmido AMG 1 fue confirmado por secuenciación. La cepa de *E. coli* TOP10 conteniendo el plásmido AMG 1 (designado NN059173), fue depositado en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) el 23 de noviembre de 2009, y se le asignó el número de registro DSM 23123.

**Ejemplo 9**

Expresión de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* clonada

[0229] El gen de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* fue reclonado a partir del plásmido AMG 1 en un vector de expresión de *Aspergillus* por PCR usando dos cebador de clonación F y el cebador R mostrados a continuación, que fueron diseñados basados en la secuencia conocida y se añadieron etiquetas para la clonación directa por estrategia de IN-FUSION™.

Cebador F: 5' ACACAACTGGGGATCCACCATGCGTCTCACTCTATTATC (SEQ ID N.º: 16)
Cebador R: 5' AGATCTCGAGAAGCTTAAAACTGCCACACGTCGTTGG (SEQ ID N.º: 17)

[0230] Una reacción por PCR fue realizada con el plásmido AMG 1 para amplificar el gen en toda su longitud. La reacción por PCR estaba compuesta por 40 µg del ADN del plásmido AMG 1, 1 µl de cada cebador (100 µM); 12,5 µl de 2X Extensor Hi-Fidelity master mix (Extensor Hi-Fidelity master mix, ABgene, Reino Unido), y 9,5 µl de agua de grado PCR. La reacción por PCR fue realizada utilizando una máquina de DYAD PCR (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.) programada durante 2 minutos a 94°C seguido de 25 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 50°C durante 30 segundos, y 72°C durante 1 minuto; y luego 10 minutos a 72°C.

[0231] Los productos reactivos fueron aislados por 1,0% electroforesis en gel de agarosa utilizando 1 x tampón TAE donde una banda de producto PCR de aproximadamente 1,9 kb fue extirpada del gel y purificada utilizando un ADN de PCR GFX® y equipo de purificación de banda en gel (GE Healthcare, Reino Unido) según instrucciones del fabricante. El ADN correspondiente al gen de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* fue clonado en un vector de expresión de *Aspergillus* linealizado con BamHI e HindIII, utilizando un equipo de clonación de PCR Dry-Down IN-FUSION™ (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La construcción del vector linealizado es como se describe en la WO 2005/042735 A1.

[0232] Un volumen de 2 µl de la mezcla de ligamiento se usó para transformar 25 µl de células de *E. coli* Fusion Blue (incluidas en el equipo de clonación de PCR Dry-Down IN-FUSION™). Después de un choque térmico a 42°C durante 45 seg, y enfriamiento en el hielo, se añadió 250 µl de medio SOC y las células fueron incubadas a

37°C a 225 r.p.m. durante 90 min antes de ser colocadas en placas de LB agar conteniendo 50 µg de ampicilina por ml, y cultivadas durante toda la noche a 37°C. Las colonias seleccionadas fueron inoculadas en 3 ml de medio LB suplementado con 50 µg de ampicilina por ml e incubadas a 37°C a 225 r.p.m. durante toda la noche. El ADN plásmido de las colonias seleccionadas fue purificado utilizando Mini JETSTAR (Genomed, Alemania) según las instrucciones del fabricante. La secuencia génica de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* fue verificada por secuenciación de Sanger antes de expresión heteróloga. Uno de los plásmidos fue seleccionado para más expresión, y se denominaron XYZ XYZ1471-4.

[0233] Protoplastos de *Aspergillus niger* MBin118 se prepararon como se describe en la WO 95/02043. Cien µl de suspensión de protoplasto se mezclaron con 2,5 µg del plásmido XYZ1471-4 y 250 microlitros de 60% PEG 4000 (Applichem) (polietilenglicol, peso molecular 4.000), 10 mM $CaCl_2$, y 10 mM Tris-HCl pH 7,5 fueron adicionados y suavemente mezclados. La mezcla fue incubada a 37°C durante 30 minutos y los protoplastos fueron mezcladas con 6% de agarosa de fusión baja (Biowhittaker Molecular Applications) en placas de sacarosa de COVE (Cove, 1996, Biochim. Biophys. Acta 133:51-56) (1 M) suplementadas con 10 mM de acetamida y 15 mM CsCl y se añadieron como capa superior en las placas de sacarosa de COVE (1 M) suplementadas con 10 mM de acetamida y 15 mM de CsCl para selección de transformantes (4 ml topagar por placa). Tras la incubación durante 5 días a 37°C, las esporas de dieciséis transformantes fueron recogidas y plantadas en 750 µl YP-2% medio de maltosa en placas de microtitulación 96 pocillos profundos. Después de 5 días de cultivo estacionario a 30°C, 10 µl del caldo de cultivo de cada pocillo se analizaron en un gel SDS-PAGE (electroforesis en gel de sodio dodecil sulfato-poliacrilamida), gel Griton XT Precast (BioRad, CA, EE.UU.) para identificar los mejores transformantes basados en la capacidad para producir gran cantidad de glucoamilasa. Un transformante seleccionado fue identificado en la placa de transformación original y fue conservado como esporas en un caldo de glicerol al 20% y almacenado en congelación (-80°C). [0234] Cultivo. El transformante seleccionado fue inoculado en 100ml de medio MLC y cultivado a 30 °C durante 2 días en frascos de agitación de 500 ml en una coctelera giratoria. 3 Ml del caldo de cultivo fue inoculado a 100ml de medio M410 y cultivado a 30°C durante 3 días. El caldo de cultivo fue centrifugado y el sobrenadante fue filtrado utilizando filtros de membrana de 0,2 µm.

[0235] Gel de afinidad de alfa-ciclodextrina. Diez gramos de polvo de Sefarosa 6B activada con epoxi (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, U.K) se suspendió y lavó con agua destilada en un filtro de vidrio sinterizado. El gel fue suspendido en la solución de acoplamiento (100 ml de 12,5 mg/ml alfa-ciclodextrina, 0,5 M NaOH) e incubó a temperatura ambiente durante un día con agitación suave. El gel fue lavado con agua destilada en un filtro de vidrio sinterizado, suspendido en 100 ml de 1 M etanolamina, pH 10, e incubado a 50 °C durante 4 horas para bloqueo. El gel fue luego lavado varias veces utilizando 50 mM Tris-HCl, pH 8 y 50 mM NaOAc, pH 4,0 alternativamente. El gel fue finalmente envasado en una columna de 35-40 ml usando tampón de equilibrado (50 mM NaOAc, 150 mM NaCl, pH 4,5). [0236] Purificación de glucoamilasa a partir del caldo de cultivo. El caldo de cultivo de la fermentación de *A. niger* MBin118 que alberga el gen de glucoamilasa fue filtrado a través de un filtro 0,22 µm PES, y se aplicó en una columna de gel de afinidad de alfa-ciclodextrina previamente equilibrada en 50 mM NaOAc, 150 mM NaCl, tampón de pH 4,5. El material no unido se lavó de la columna con tampón de equilibrado y la glucoamilasa se eluyó usando el mismo tampón conteniendo 10 mM de beta-ciclodextrina sobre 3 volúmenes de columna.

[0237] La actividad de glucoamilasa del eluyente fue controlada para ver si la glucoamilasa se había ligado al gel de afinidad de alfa-ciclodextrina. La muestra de glucoamilasa purificada fue luego dializada contra 20 mM NaOAc, pH 5,0. La pureza fue controlada finalmente por SDS-PAGE, y solo una banda única se encontró.

**Ejemplo 10**

Construcción y expresión de una variante dirigida al sitio de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* (PE001)

[0238] Dos reacciones de la PCR fueron realizadas con plásmido XYZ1471-4, descrito en el ejemplo 9, usando cebadores K79V F y K79VR mostrados a continuación, que fueron diseñados para sustituir a la lisina K en la posición 79 a partir de la secuencia madura en varina V y los cebadores F-NP003940 y R-NP003940 mostrados a continuación, que fueron diseñados basados en la secuencia conocida y etiquetas añadidas para la clonación directa por estrategia IN-FUSION™.

Cebador K79V F 18 meros GCAGTCTTTCCAATTGAC (SEQ ID N.º: 18)
Cebador K79V R 18 meros AATTGGAAAGACTGCCCG (SEQ ID N.º: 19)
Cebador F-NP003940: 5' ACACAACTGGGGATCCACCATGCGTCTCACTCTATTATC (SEQ ID N.º: 20)
Cebador R-NP003940: 5' AGATCTCGAGAAGCTTAAAACTGCCACACGTCGTTGG (SEQ ID N.º: 21)

[0239] La PCR se realizó utilizando un motor de ADN PTC-200 bajo las condiciones descritas a continuación. Sistema de reacción por PCR: condiciones:

| Sistema de reacción de PCR: | Condiciones: |
|---|---|

| Sistema de reacción de PCR: | Condiciones: | | |
|---|---|---|---|
| 48,5 micro L H2O | 1 | 94°C | 2 min |
| 2 microesferas de PCR puRe Taq listas para uso | 2 | 94°C | 30 seg |
| Esferas (Amersham bioscineces) | 3 | 55°C | 30 seg |
| 0,5micro L X 2100 pmol/micro L Cebadores | 4 | 72°C | 90 seg |
| (K79V F + Cebador R-NP003940, K79V R + | 2-4 | 25 ciclos | |
| Cebador F-NP003940) 0.5 micro L ADN molde | 5 | 72°C | 10 min |

[0240] Los fragmentos de ADN fueron recuperados del gel de agarosa por el equipo de extracción en gel de Qiagen según las instrucciones del fabricante. Los dos fragmentos purificados resultantes fueron clonados en un vector de expresión de *Aspergillus* linealizados con BamHI e HindIII, utilizando un equipo de clonación por PCR IN-FUSION™ Dry-Down (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE.UU.) según las instrucciones del fabricante. La construcción del vector linealizado es como se describe en la WO 2005/042735 A1.

[0241] La mezcla de ligación se usó para transformar células de *E. coli* DH5α (Toyobo). Las colonias seleccionadas fueron inoculadas en 3 ml de medio LB suplementado con 50 µg de ampicilina por ml e incubadas a 37°C a 225 r.p.m. durante toda la noche. ADN plásmido de las colonias seleccionadas fue purificado utilizando el equipo mini de plásmido Qiagen (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. La de secuencia de la secuencia génica de la variante dirigida al sitio de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* fue verificada antes de expresión heteróloga y uno de los plásmidos fue seleccionado para más expresión, y se denominó pPoPE001.

[0242] Protoplastos de *Aspergillus niger* MBin118 fueron preparados como se describe en la WO 95/02043. Cien microlitros de suspensión de protoplasto se mezclaron con 2,5 µg del plásmido pPoPE001 y 250 microlitros de 60% PEG 4000 (Applichem) (polietilenglicol, peso molecular 4.000), 10 mM $CaCl_2$, y 10 mM Tris-HCl pH 7,5 fueron adicionados y suavemente mezclados. La mezcla fue incubada a 37°C durante 30 minutos y los protoplastos fueron mezclados con 1% agarosa L (Nippon Gene) en la sacarosa de COVE (COVE, 1996, Biochim. Biophys. Acta 133:51-56) suplementada con 10 mM acetamida y 15 mM CsCl y se añadió como una capa superior sobre las placas de sacarosa de COVE suplementadas con 10 mM acetamida y 15 mM CsCl para selección de transformantes (4 ml topagar por placa). Tras la incubación durante 5 días a 37°C esporas de dieciséis transformantes fueron recogidas y plantadas en 750 µl YP-2% medio de maltosa en placas de microtitulación de 96 pocillos profundos. Después de 5 días de cultivo estacionario a 30°C, 10 µl del caldo de cultivo de cada pocillo se analizaron en un gel SDS-PAGE para identificar los mejores transformantes basados en la capacidad para producir gran cantidad de glucoamilasa.

**Ejemplo 11**

Purificación de la variante de Po AMG PE001 dirigida al sitio

[0243] El transformante seleccionado de la variante y la cepa que expresa la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* de tipo salvaje descrita en el ejemplo 8 se cultivaron en 100 ml de YP- 2% medio de maltosa y el cultivo fue filtrado a través de un filtro PES de 0,22 µm, y aplicado en una columna de gel de afinidad de alfa-ciclodextrina previamente equilibrada en 50 mM NaOAc, 150 mM NaCl, tampón de pH 4,5. Materiales no unidos se lavaron fuera de la columna con tampón de equilibrado y la glucoamilasa se eluyó usando el mismo tampón conteniendo 10 mM beta-ciclodextrina sobre 3 volúmenes de columna.

[0244] La actividad de glucoamilasa del eluyente fue controlada para ver si la glucoamilasa se había ligado con el gel de afinidad de alfa-ciclodextrina. Las muestras de glucoamilasa purificada se dializaron luego contra 20 mM NaOAc, pH 5,0.

Ejemplo 12

Caracterización de estabilidad de proteasa PE001

[0245] 40 µl de soluciones enzimáticas (1 mg/ml) en 50 mM de tampón de acetato sódico, pH 4,5, se mezcló con 1/10 volumen de 1 mg/ml de soluciones de proteasa tal como la aspergilopepsina descrita en Biochem J. 1975 Apr; 147(1): 45-53 o el producto comercialmente disponible de Sigma y aorsina descrita en Biochemical journal [0264-6021] Ichishima, 2003, 371(2): 541 y se incubaron a 4 o 32°C durante toda la noche. Como experimento de control, $H_2O$ se añadió a la muestra en vez de proteasas. Las muestras fueron cargadas en SDS-PAGE para ver si las glucoamilasas son divididas por proteasas.

[0246] En SDS-PAGE, PE001 solo mostró una banda que se corresponde con la molécula intacta, mientras que la glucoamilasa de tipo salvaje fue degradada por proteasas y mostró una banda a tamaño molecular inferior a 60 kCa.

Tabla 12 El resultado de SDS-PAGE después de tratamiento de proteasa

| | Glucoamilasa tipo salvaje | | | | PE001 | | | | control |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Proteasa | aspergilopepsina I | | aorsina | | aspergilopepsina I | | aorsina | | |
| Temperatura de incubación (°C) | 4 | 32 | 4 | 32 | 4 | 32 | 4 | 32 | 4 |
| Glucoamilasa intacta (ca. 70 kDa) | 100% | 90% | 40% | 10% | 100% | 100% | 100 % | 100 % | 100% |
| Glucoamilasa dividida (ca. 60 kDa) | N.D. | 10% | 60% | 90% | N.D. | N.D. | N.D | N.D | N.D. |
| N.D.: no detectado. | | | | | | | | | |

**Ejemplo 13**

Menos escisión durante el cultivo

[0247] El transformante de *Aspergillus* de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* variante y de tipo salvaje fueron cultivados en placas MT de 6 pocillos conteniendo 4X YP-2% medio de maltosa diluido suplementado con 10 mM tampón de acetato sódico, pH 4,5, a 32°C durante 1 semana.

[0248] Los sobrenadantes del cultivo fueron cargados en SDS-PAGE.

Tabla 13 el resultado de SDS-PAGE de los sobrenadantes de cultivo

| | Glucoamilasa tipo salvaje | PE001 |
|---|---|---|
| Glucoamilasa intacta (ca. 70 kDa) | 90% | 100% |
| Glucoamilasa dividida (ca. 60 kDa) | 10% | N.D. |
| N.D.: no detectado. | | |

[0249] La glucoamilasa de tipo salvaje fue dividida por proteasas huéspedes durante la fermentación, mientras que la variante produjo sólo la molécula intacta.

**Ejemplo 14**

Actividad de glucoamilasa de la variante PE001 en comparación con la original

[0250] La actividad de glucoamilasa que mide tantas AGU como anteriormente se ha descrito fue controlada para las enzimas purificadas de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* de tipo salvaje y variante.

[0251] La unidad de glucoamilasa (AGU) fue definida como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto bajo las condiciones estándar (37°C, pH 4,3, sustrato: maltosa 100 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 6 minutos).

Tabla 14

| Actividad específica relativa | AGU/mg |
|---|---|
| *Penicillium oxalicum* wt | 100 % |
| *Penicillium oxalicum* PE001 (SEQ ID NO: 14 + V79K) | 102 % |

**Ejemplo 15**

Purificación de variantes de glicoamilasa que tienen termoestabilidad aumentada

[0252] Las variantes que muestran termoestabilidad aumentada se pueden construir y expresar de forma similar al procedimiento descrito en el ejemplo 10. Todas las variantes fueron derivadas de PE001. Después de la expresión en el medio YPM, las variantes que comprenden la sustitución T65A o Q327F fueron micro-purificadas de la siguiente manera:

El micelio fue retirado por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. 50 µl de material de columna (alfa-ciclodextrina acoplada a medio de agarosa activada por divinilsulfona Mini-Leak según las recomendaciones de fabricantes) se añadió a los pocillos de una placa de filtración (Whatman, Unifilter 800 µl, 25-30 µm MBPP). El material de la columna fue equilibrado con el tampón de unión (200 mM de acetato sódico pH 4,5) por adición de dos veces de 200 µl de tampón, agitación vigorosa durante 10 min (Heidolph, Titramax 101, 1.000 r.p.m.) y eliminación del tampón por vacío (Whatman, UniVac 3). Posteriormente, 400 µl del sobrenadante del cultivo y 100 µl del tampón de unión se añadieron y la placa se incubó 30 min con agitación vigorosa. El material no unido fue retirado por vacío y la etapa de unión fue repetida. Normalmente 4 pocillos fueron usados por variante. Tres pasos de lavado fueron luego realizados con 200 µl de tampón de fuerza iónica decreciente añadido (50/10/5 mM acetato sódico, pH 4,5), agitando durante 15 min y eliminación de tampón por vacío. La elución de la AMG ligada se consiguió añadiendo dos veces 100 µl de tampón de elución (250 mM acetato sódico, 0,1 % alfa-ciclodextrina, pH 6,0), agitación durante 15 min y recolección del material eluido en una placa de microtitulación por vacío. Los eluatos agrupados se concentraron y el tampón se cambió por 50 mM de acetato sódico pH 4,5 usando unidades de filtro centrífugo con corte de 10 kDa (Millipore Microcon Ultracel YM-10). Las muestras micropurificadas fueron almacenadas a -18°C hasta análisis de termoestabilidad.

**Ejemplo 16**

Análisis de despliegue térmico de proteínas (TSA, ensayo de desvío térmico)

[0253] Despliegue térmico de proteína de las variante T65A y Q327F se monitorizó utilizando Sypro Orange (In-vitrogen, S-6650) y se realizó utilizando un instrumento de PCR en tiempo real (Applied Biosystems; Step-One-Plus).

[0254] En una placa de 96 pocillos, 25 microlitros de muestra micropurificada en 50 mM acetato pH4,5 a aprox. 100 microgramo/ml se mezclaron (5:1) con Sypro Orange (concentración resultante = 5X; solución madre del proveedor = 5000X). La placa fue sellada con un sello de PCR óptico. El instrumento de PCR se estableció a un índice de exploración de 76°C por hora, inicio a 25°C y fin a 96°C.

[0255] Despliegue térmico de proteínas de la variante E501V + Y504T, se monitorizó utilizando Sypro Orange (In-vitrogen, S-6650) y se realizó utilizando un instrumento de PCR en tiempo real (Applied Biosystems; Step-One-Plus).

[0256] En una placa de 96 pocillos, 15 microlitros de muestra purificada en 50 mM acetato pH 4,5 a aprox. 50 microgramo/ml se mezcló (1:1) con Sypro Orange (conc. resultante = 5X; solución madre del proveedor = 5000X) con o sin 200 ppm de Acarbose (Sigma A8980). La placa fue sellada con un sello de PCR óptico. El instrumento de PCR se estableció a un índice de exploración de 76°C por hora, inicio a 25°C y fin a 96°C.

[0257] La fluorescencia se monitorizó cada 20 segundos usando LED de luz azul incorporado para la excitación y filtro ROX (610 nm, emisión).

[0258] Los valores de Tm fueron calculados como el valor máximo del primer derivado (dF/dK) (ref.: Gregory et al., 2009, J. Biomol. Screen. 14: 700).

Tabla 15a.

| Muestra | Tm (Grados Celsius) +/- 0,4 |
|---|---|
| PO-AMG (PE001) | 80,3 |
| Variante Q327F | 82,3 |
| Variante T65A | 81,9 |

Tabla 15b.

| Muestra | Tm (Grados Celsius) +/- 0,4 | |
|---|---|---|
| Acarbosa: | - | + |
| PO-AMG (PE001) | 79,5 | 86,9 |
| Variante E501V Y504T | 79,5 | 95,2 |

**Ejemplo 17**

Análisis de termoestabilidad por calorimetría de barrido diferencial (DSC)

[0259] Variantes específicas del sitio adicionales que tienen sustituciones y /o deleciones en posiciones específicas fueron construidas básicamente como se describe en el ejemplo 10 y purificada como se describe en el ejemplo 11.

[0260] La termoestabilidad de las variantes derivadas Po-AMG PE001 purificadas se determinó a pH 4,0 o 4,8 (50 mM acetato sódico) por calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un calorímetro de barrido diferencial VP-Capillary (MicroCal Inc., Piscataway, NJ, EE.UU.). La temperatura de desnaturalización térmica, Td (°C), se tomó como el máximo del valor superior de desnaturalización (valor máximo endotérmico principal) en los termogramas (Cp vs. T) obtenidos después de calentar las soluciones enzimáticas en tampones seleccionados (50 mM acetato sódico, pH 4,0 o 4,8) a un índice de calentamiento programado constante de 200 K/hora.

[0261] Las soluciones de muestra y de referencia (aproximadamente 0,3 ml) fueron cargadas en el calorímetro (referencia: tampón sin enzima) a partir de las condiciones de almacenamiento a 10°C y térmicamente pre equilibradas durante 10 minutos a 20°C antes del barrido DSC de 20°C a 110°C. Las temperaturas de desnaturalización se determinaron con una exactitud de aproximadamente +/- 1°C.

[0262] Las variantes aisladas y los datos de DSC se describen en la tabla 16 a continuación.

Tabla 16.

| **Nombre Po-AMG** | **Mutaciones** | **DSC Td (°C) @** | **DSC Td (°C) @** |
|---|---|---|---|
| | Mutaciones con respecto a PE001 | **pH 4,0** | **pH 4,8** |
| PE001 (SEQ ID | | 82,1 | 83,4 |
| NO: 3) | | | |
| GA167 | E501V Y504T | 82,1 | |
| GA481 | T65AK161S | 84,1 | 86,0 |
| GA487 | T65A Q405T | 83,2 | |
| GA490 | T65A Q327W | 87,3 | |
| GA491 | T65A Q327F | 87,7 | |
| GA492 | T65A Q327Y | 87,3 | |
| GA493 | P11 F T65A Q327F | 87,8 | 88,5 |
| GA497 | R1K D3W K5Q G7V N8S T10K P11S T65A Q327F | 87,8 | 88,0 |
| GA498 | P2N P4S P11 F T65A Q327F | 88,3 | 88,4 |
| GA003 | P11 F D26C K33C T65A Q327F | 83,3 | 84,0 |
| GA009 | P2N P4S P11F T65A Q327W E501V Y504T | 88,8 | |
| GA002 | R1E D3N P4G G6R G7A N8A T10D P11 D T65A Q327F | 87,5 | 88,2 |

| **Nombre Po-AMG** | **Mutaciones** | **DSC Td (°C) @** | **DSC Td (°C) @** |
|---|---|---|---|
| | Mutaciones con respecto a PE001 | **pH 4,0** | **pH 4,8** |
| GA005 | P11 F T65A Q327W | 87,4 | 88,0 |
| GA008 | P2N P4S P11F T65A Q327F E501V Y504T | 89,4 | 90,2 |
| GA010 | P11F T65A Q327W E501 V Y504T | | 89,7 |
| GA507 | T65A Q327F E501V Y504T | | 89,3 |
| GA513 | T65A S105P Q327W | | 87,0 |
| GA514 | T65A S105P Q327F | | 87,4 |
| GA515 | T65A Q327W S364P | | 87,8 |
| GA516 | T65A Q327F S364P | | 88,0 |
| GA517 | T65A S103N Q327F | | 88,9 |
| GA022 | P2N P4S P11 F K34Y T65A Q327F | | 89,7 |
| GA023 | P2N P4S P11F T65A Q327F D445N V447S | | 89,9 |
| GA032 | P2N P4S P11 F T65A I172V Q327F | | 88,7 |
| GA049 | P2N P4S P11 F T65A Q327F N502* | | 88,4 |
| GA055 | P2N P4S P11F T65A Q327F N502T P563S K571E | | 88,0 |
| GA057 | P2N P4S P11F R31S K33V T65A Q327F N564D K571S | | 89,5 |
| GA058 | P2N P4S P11 F T65A Q327F S377T | | 88,6 |
| GA064 | P2N P4S P11 F T65A V325T Q327W | | 88,0 |
| GA068 | P2N P4S P11F T65A Q327F D445N V447S E501V Y504T | | 90,2 |
| GA069 | P2N P4S P11F T65A I172V Q327F E501V Y504T | | 90,2 |
| GA073 | P2N P4S P11F T65A Q327F S377T E501V Y504T | | 90,1 |
| GA074 | P2N P4S P11F D26N K34Y T65A Q327F | | 89,1 |
| GA076 | P2N P4S P11F T65A Q327F I375A E501V Y504T | | 90,2 |
| GA079 | P2N P4S P11F T65A K218A K221D Q327F E501V Y504T | | 90,9 |
| GA085 | P2N P4S P11F T65A S103N Q327F E501V Y504T | | 91,3 |
| GA086 | P2N P4S T10D T65A Q327F E501V Y504T | | 90,4 |
| GA088 | P2N P4S F12Y T65A Q327F E501V Y504T | | 90,4 |
| GA097 | K5A P11F T65A Q327F E501V Y504T | | 90,0 |
| GA101 | P2N P4S T10E E18N T65A Q327F E501V Y504T | | 89,9 |
| GA102 | P2N T10E E18N T65A Q327F E501V Y504T | | 89,8 |
| GA084 | P2N P4S P11F T65A Q327F E501V Y504T T568N | | 90,5 |
| GA108 | P2N P4S P11F T65A Q327F E501V Y504T K524T G526A | | 88,6 |
| GA126 | P2N P4S P11F K34Y T65A Q327F D445N V447S E501V Y504T | | 91,8 |
| GA129 | P2N P4S P11F R31S K33V T65A Q327F D445N V447S E501V Y504T | | 91,7 |
| GA087 | P2N P4S P11F D26N K34Y T65A Q327F E501V Y504T | | 89,8 |

| Nombre Po-AMG | Mutaciones | DSC Td (°C) @ | DSC Td (°C) @ |
|---|---|---|---|
| | Mutaciones con respecto a PE001 | **pH 4,0** | **pH 4,8** |
| GA091 | P2N P4S P11F T65A F80* Q327F E501V Y504T | | 89,9 |
| GA100 | P2N P4S P11F T65A K112S Q327F E501V Y504T | | 89,8 |
| GA107 | P2N P4S P11F T65A Q327F E501V Y504T T516P K524T G526A | | 90,3 |
| GA110 | P2N P4S P11F T65A Q327F E501V N502T Y504* | | 90,6 |

**Ejemplo 18**

Análisis de termoestabilidad por prueba de estrés térmico y ensayo pNPG

[0263] Empezando por una de las variantes de sustitución identificada en el Ejemplo 10, identificada como PE008, variantes adicionales fueron evaluadas por un ensayo de estrés térmico donde el sobrenadante de cultivos de crecimiento se evaluó para actividad de glucoamilasa (AMG) después de un choque térmico a 83°C durante 5 min.

[0264] Después del choque térmico la actividad residual de la variante se midió al igual que en una muestra no estresada.

Descripción del ensayo de actividad de pNPG de Po-AMG:

[0265] El ensayo de actividad de pNPG de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* es un ensayo de criterio de evaluación espectrométrico donde las muestras se dividen en dos y se miden termoestresadas y no termoestresadas. La salida de datos es por lo tanto una medición de la actividad residual en las muestras estresadas.

Crecimiento:

[0266] A una placa de microtitulación estéril (MTP) se añadieron 200 microlitros de medios rico en crecimiento (FT X-14 sin Dowfax) en cada pocillo. Las cepas de interés fueron inoculadas por triplicado directamente a partir de caldos congelados en la MTP. El valor de referencia fue inoculado en 20 pocillos. Los pocillos no inoculados con medios fueron usados como blancos de ensayo. La MTP se colocó en una caja plástica con tejido humedecido para evitar la evaporación de los pocillos durante la incubación. La caja plástica se colocó a 34°C durante 4 días.

Ensayo:

[0267] 50 microlitros de sobrenadante se transfirieron a 50 microlitros 0,5 M NaAc pH 4,8 para obtener el pH de muestra correcto.

[0268] 50 microlitros de dilución se transfirieron a una placa de PCR y se termoestresaron a 83°C durante 5 minutos en una máquina de PCR. La mitad restante de la dilución se mantuvo a RT.

[0269] 20 microlitros de ambas muestras estresadas y no estresadas fue transferidos a una MTP estándar. 20 microlitros de sustrato de pNPG se añadió para iniciar la reacción. La placa fue incubada a RT durante 1h.

[0270] La reacción fue detenida y el color se desarrolló añadiendo 50 microlitros 0,5 M $Na_2CO_3$. El color amarillo se midió en un lector de placa (Molecular Devices) a 405 nm.

Tampones:

0,5 M NaAc pH 4,8
0,25 M NaAc pH 4,8

Sustrato, 6 mM pNPG:

15 Mg 4-nitrofenil D-glucopiranósido en 10 mL 0,25 NaAc pH 4,8

Solución parada/desarrollo:

0.5 M $Na_2CO_3$

Tratamiento de datos:

[0271] En Excel, los datos de Abs405 en bruto tanto de las muestras estresadas como las no estresadas se sustrajeron en blanco con sus respectivos blancos. La actividad residual (% act. res. = ($Abs_{noestresada}$ ($Abs_{noestresada}$ - $Abs_{estresada}$))/ $Abs_{noestresada}$ *100%) se calculó y fijó con respecto al valor de referencia, Po-amg0008.

Tabla 17

| **Nombre Po-AMG** | **Mutaciones** | **% actividad residual** |
|---|---|---|
| GA008 | P2N P4S P11 F T65A Q327F E501V Y504T | 100 |
| GA085 | P2N P4S P11F T65A S103N Q327F E501V Y504T | 127 |
| GA097 | K5A P11F T65A Q327F E501V Y504T | 106 |
| GA107 | P2N P4S P11F T65A Q327F E501V Y504T T516P K524T G526A | 109 |
| GA130 | P2N P4S P11F T65A V79A Q327F E501V Y504T | 111 |
| GA131 | P2N P4S P11F T65A V79G Q327F E501V Y504T | 112 |
| GA132 | P2N P4S P11 F T65A V79I Q327F E501V Y504T | 101 |
| GA133 | P2N P4S P11 F T65A V79L Q327F E501V Y504T | 102 |
| GA134 | P2N P4S P11F T65A V79S Q327F E501V Y504T | 104 |
| GA150 | P2N P4S P11 F T65A L72V Q327F E501V Y504T | 101 |
| GA155 | S255N Q327F E501V Y504T | 105 |

Tabla 18

| **Nombre Po-AMG** | **Mutaciones** | **% actividad residual** |
|---|---|---|
| GA008 | P2N P4S P11 F T65A Q327F E501V Y504T | 100 |
| GA179 | P2N P4S P11 F T65A E74N V79K Q327F E501V Y504T | 108 |
| GA180 | P2N P4S P11F T65A G220N Q327F E501V Y504T | 108 |
| GA181 | P2N P4S P11F T65A Y245N Q327F E501V Y504T | 102 |
| GA184 | P2N P4S P11F T65A Q253N Q327F E501V Y504T | 110 |
| GA185 | P2N P4S P11F T65A D279N Q327F E501V Y504T | 108 |
| GA186 | P2N P4S P11F T65A Q327F S359N E501V Y504T | 108 |
| GA187 | P2N P4S P11F T65A Q327F D370N E501V Y504T | 102 |
| GA192 | P2N P4S P11F T65A Q327F V460S E501V Y504T | 102 |
| GA193 | P2N P4S P11F T65A Q327F V460T P468T E501V Y504T | 102 |
| GA195 | P2N P4S P11F T65A Q327F T463N E501V Y504T | 103 |
| GA196 | P2N P4S P11F T65A Q327F S465N E501V Y504T | 106 |
| GA198 | P2N P4S P11F T65A Q327F T477N E501V Y504T | 106 |

Ejemplo 19

Prueba para actividad de glucoamilasa de variantes termoestables según la invención

[0272] Todas las variantes descritas anteriormente descritas en las tablas 16, 17 y 18 han sido verificadas para actividad de glucoamilasa en los sobrenadantes de cultivo utilizando el ensayo de pNPG descrito en el ejemplo 18.

**Ejemplo 20 (forma de realización de la invención)**

Producción de etanol usando (alfa-amilasa 1407 o 369) y proteasa Pfu para licuefacción

[0273] El fin de este experimento fue evaluar el rendimiento de aplicación de alfa-amilasa 1407 y alfa-amilasa 369 en combinación con proteasa Pfu derivada de *Pyrococcus furiosus* y adicionada durante la licuefacción a pH 4,8, 5,3 y 5,8, a 85°C durante 2 horas.

Licuefacción (Labomat)

[0274] Cada licuefacción recibió maíz molido (85,6% DS), retroceso (4,9% DS), y agua del grifo buscando un peso total de 140 g a 32,50% de sólidos secos (DS). El retroceso fue mezclado a 30% p/p del peso de lodo total. El pH del lodo inicial fue aproximadamente 5,2 y fue ajustado a pH 4,8, 5,3 o 5,8 con 50% p/p hidróxido sódico o 40% v/v ácido sulfúrico antes de la licuefacción. Todas las enzimas fueron adicionadas según el diseño experimental de la tabla 19 mencionada más adelante. La licuefacción se produjo en un Labomat utilizando las condiciones siguientes: 5°C/min. Rampa, 17 minutos de rampa, 103 minutos tiempo de espera, 40 r.p.m. durante todo el proceso, recipientes de acero inoxidable de 200 mL. Después de la licuefacción, todos los recipientes se enfriaron en un baño de hielo y se prepararon para fermentación basada en el protocolo mencionado más adelante bajo SSF.

Sacarificación y fermentación simultánea (SSF)

[0275] Cada pasta se ajustó a pH 5,0 con 50% p/p hidróxido sódico o 40% v/v ácido sulfúrico. Se aplicó penicilina a cada pasta a una concentración total de 3 ppm. Los tubos fueron preparados con pasta introduciendo la parte alícuota aproximadamente 4,5 g de pasta por 15 mL tubos de ensayo pre-perforados para permitir liberación de $CO_2$.

[0276] Glucoamilasa BL2 fue dosificada a cada tubo de pasta a 0,54 AGU/g DS, se añadió el mínimo de agua a cada de tubo para normalizar sólidos, y cada muestra de pasta recibió 100 µL de levadura rehidratada. La levadura rehidratada fue preparada mediante la mezcla de 5,5 g de Fermentis RED STAR en 100 mL de agua del grifo a 32°C al menos 15 minutos.

Análisis de HPLC

[0277] El muestreo de fermentación se produjo después de aproximadamente 54 horas de fermentación. Cada muestra fue desactivada con 50 µL de 40% v/v H2SO4, precipitación en vórtex, centrifugado a 1460xg durante 10 minutos, y filtración a través de un filtro de 0,45 µm Whatman PP. Las muestras de 54 horas fueron analizadas bajo hPLC sin más dilución. Las muestras fueron almacenadas a 4°C antes y durante análisis de HPLC.

| | |
|---|---|
| Sistema HPLC | Serie Agilent 1100/1200 con software Chem Station<br>Degasser, bomba cuaternaria, automuestreador, compartimento de columna /con calentador<br>Detector de índice de refracción (RI) |
| Columna | Columna de exclusión iónica HPX- Bio-Rad 87H 300mm x 7,8mm part# 125-0140<br>Catión de cartucho de seguridad Bio-Rad H part# 125-0129, soporte part# 125-0131 |
| Método | 0,005M $H_2SO_4$ fase móvil<br>Caudal: 0,6 ml/min<br>Temperatura de columna: 65°C<br>Temperatura detectora RI: 55°C |

[0278] El método cuantificó los analito(s) utilizando estándares de calibración para etanol (% p/v). Una calibración de cuatro puntos incluyendo el origen se usa para cuantificación.

[0279] Cuando fue aplicable, los datos se analizaron utilizando el software JMP (Cary, NC) con Oneway ANOVA de pares usando Tukey-Kramer HSD o Dunnett's. Barras de error que indican el 95% de nivel de confianza se establecieron multiplicando el error típico del análisis Oneway Anova por 1,96.

Tabla 19. Diseño de experimento de licuefacción

| | pH | Amilasa | Dosis | | PoAMG | Dosis | Proteasa | Dosis |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 4,8 | A | 0,02% | %p/p maíz | ninguno | | ninguno | |
| **2** | 5,3 | | | | | | | |
| **3** | 5,8 | | | | | | | |
| **4** | 4,8 | AA1407 | 0,07718 | KNU-S/g maíz | GA493 | 5 µg/gDS | Pfu | 1 µg/gDS |
| **5** | 5,3 | | | | | | | |
| **6** | 4,8 | AA369 | 1,65 | KNU-S/g maíz | GA493 | 5 µg/gDS | Pfu | 1 µg/gDS |
| **7** | 5,3 | | | | | | | |
| **8** | 4,8 | A | 0,02% | %p/p maíz | ninguno | | ninguno | |
| **9** | 5,3 | | | | | | | |
| **10** | 5,8 | | | | | | | |
| **11** | 4,8 | AA1407 | 0,07718 | KNU-S/g maíz | GA493 | 5 µg/gDS | Pfu | 1 µg/gDS |
| **12** | 5,3 | | | | | | | |
| **13** | 4,8 | AA369 | 1,65 | KNU-S/g maíz | GA493 | 5 µg/gDS | Pfu | 1 µg/gDS |
| **14** | 5,3 | | | | | | | |

Resultados:

[0280]

| **Enzimas** | **pH** | EtOH g/L | Nivel |
|---|---|---|---|
| AAA | 4,8 | 131,35 | B |
| AAA | 5,3 | 131,89 | B |
| AAA | 5,8 | 131,26 | B |
| AA1407 + GA493 + Pfu | 4,8 | 133,44 | A |
| AA1407 + GA493 + Pfu | 5,3 | 133,09 | A |
| AA369 + GA493 + Pfu | 4,8 | 131,64 | B |
| AA369 + GA493 + Pfu | 5,3 | 133,34 | A |

[0281] Estos resultados demuestran que la alfa-amilasa termoestable, la glucoamilasa y la proteasa termoestable se pueden usar juntas en la licuefacción para aumentar el rendimiento del etanol en comparación con la alfa-amilasa A (AAA) sola.

Listado de secuencias

[0282]

<110> Novozymes A/S
Deinhammer, Randall
Craig, Joyce
Matsui, Tomoko
Takagi, Shinobu
Clark, Suzanne
Matthews, John
Hjulmand, Anne Glud
Soong, Chee-Leong

<120> Procesos para producir productos de fermentación
<130> 12075-WO-PCT
<160> 21
<170> Versión de PatentIn 3.5
<210> 1
<211> 515
<212> PRT
<213> *Bacillus stearothermophilus*

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(515)

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Trp Pro
        515
```

<210> 2

<211> 1068
<212> ADN
<213> *Thermoascus aurantiacus*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1065)

<220>
<221> misc_signal
<222> (1)..(57)

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)..(534)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (535)..(1068)

<400> 2

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

```
            -175                 -170                 -165

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

ctg gag atc act  ctg agc cag gtc agc  aac act ctg atc aag  gcc         135
Leu Glu Ile Thr  Leu Ser Gln Val Ser  Asn Thr Leu Ile Lys  Ala
            -145                 -140                 -135

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

acc acg tac tac tgc gac gat ccc tac ggc tac tgt tcc tcc aac gtc      801
```

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

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

ttc tat act tac ctg ccg gct ctg acc agt acc tgt cac gct cag gat        897
Phe Tyr Thr Tyr Leu Pro Ala Leu Thr Ser Thr Cys His Ala Gln Asp
                110                 115                 120

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

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

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

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

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

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Asn Ala Ile Tyr Leu Gly Cys
170                 175
```

<210> 4
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo sintético

<400> 4
aacgacggta cccggggatc ggatccatgc ggctcgttgc ttccctaac 49

<210> 5
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo artificial

<400> 5
ctaattacat gatgcggccc ttaattaatt agcaaccaag gtatatgg 48

<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo artificial

<400> 6
taggagttta gtgaacttgc 20

<210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Constructo artificial

<400> 7
ttcgagcgtc ccaaaacc 18

<210> 8
<211> 1851
<212> ADN
<213> *Penicillium oxalicum*

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1851)

<400> 8

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

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

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

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

att gcc agt cca aac aca gag aat cca aac tat tat tat aca tgg act         240
Ile Ala Ser Pro Asn Thr Glu Asn Pro Asn Tyr Tyr Tyr Thr Trp Thr
65                  70                  75                  80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```
            260                 265                 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

att gtg cct atc acg ttc tac ctg att gag aac act tac tat gga gag       1584
```

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Ala Asn Asp Leu Ala Tyr Val Gly Gln Tyr Trp Asn Asn Thr Gly
        195                 200                 205

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Ser Asn Asp Val Trp Gln Phe
    610                 615
```

<210> 10
<211> 4014
<212> ADN
<213> *Thermococcus hydrothermalis*

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

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

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

<400> 10

```
atg agg cgg gtg gtt gcc ctc ttc att gca att ttg atg ctt gga agc          48
Met Arg Arg Val Val Ala Leu Phe Ile Ala Ile Leu Met Leu Gly Ser
        -25                 -20                 -15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```
    135                 140                 145

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

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

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

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

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

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

gcc cac ccg ata ggc ccg ata ctc aac gac ttc ggc tgg gac agc gac        864
Ala His Pro Ile Gly Pro Ile Leu Asn Asp Phe Gly Trp Asp Ser Asp
                250                 255                 260

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

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

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

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

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

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

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

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

gtg gtc acg ctc gac ggc gag aac ccc gtg gag aac tac ccc tac gac       1296
```

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

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

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

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

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

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

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

cag gag aac tac ggc tgg tac tgg ctc tac atg gcc agg aag gcc ctt      1632
Gln Glu Asn Tyr Gly Trp Tyr Trp Leu Tyr Met Ala Arg Lys Ala Leu
            505                 510                 515

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```
        1135                1140                1145

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

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

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

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

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

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

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

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

aca acc acc  aca act tca acg acc  acc ggc cca agc tca  acg acc        3927
Thr Thr Thr  Thr Thr Ser Thr Thr  Thr Gly Pro Ser Ser  Thr Thr
        1270                1275                1280

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

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

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

<400> 11

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

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

Leu Asn Val Ile Ile Val Trp His Gln His Gln Pro Tyr Tyr Tyr Asp
```

```
                10                  15                  20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Gly Pro Asp Lys Trp Arg Thr Ala Ala Val Asp Ala Glu Gln Trp
    935                 940                 945

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

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

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

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

Glu Gly Asp  Asp His Gly Pro Gly  Thr Tyr Thr Tyr Pro  Thr Asp
```

```
        1015                1020                1025

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 12
<211> 809
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Pululanasa híbrida de *Thermococcus hydrothermalis* y *Thermococcus litoralis*

<220>
<221> SEÑAL
<222> (1)..(27)

<220>
<221> mat_peptide
<222> (28)..(809)

<400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Leu Phe Gly Asn Tyr Phe Pro Asp Gly Glu Pro Tyr Thr Thr Arg
```

585 590 595

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Asp His Gly Pro Gly Asn Tyr Thr
775 780

<210> 13
<211> 412
<212> PRT
<213> *Pyrococcus furiosus*

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(412)
<223> Proteasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu)

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 14
<211> 595
<212> PRT
<213> *Penicillium oxalicum*

<220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(595)
<223> Secuencia de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* madura

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Gln Phe
        595
```

<210> 15
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de sentido

<400> 15
atgcgtctca ctctattatc aggtg 25

<210> 16
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador F

<400> 16
acacaactgg ggatccacca tgcgtctcac tctattatc 39

<210> 17
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador R

<400> 17
agatctcgag aagcttaaaa ctgccacacg tcgttgg 37

<210> 18
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador K79V F 18 meros

<400> 18
gcagtctttc caattgac 18

<210> 19
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador K79V R 18 meros

<400> 19
aattggaaag actgcccg 18

<210> 20
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador F-NP003940

<400> 20
acacaactgg ggatccacca tgcgtctcac tctattatc 39

<210> 21
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador F-NP003940

<400> 21
agatctcgag aagcttaaaa ctgccacacg tcgttgg 37

**REIVINDICACIONES**

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

i) licuefacción del material que contiene almidón a un pH en el rango de 5,0 a 7,0 a una temperatura por encima de la temperatura de gelatinización inicial usando:

- una alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1;
- una proteasa que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID N.º: 13 y que tiene un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C; y

ii) sacarificación utilizando una enzima generadora de fuente de carbohidratos;
iii) fermentación utilizando un organismo fermentador.

2. Proceso según la reivindicación 1, donde la alfa-amilasa es la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en SEQ ID N.º: 1 aquí.

3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, donde la alfa-amilasa tiene un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ de al menos 10.

4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la proteasa tiene una termoestabilidad superior al 25% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C.

5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la proteasa se deriva de una cepa de *Pyrococcus furiosus*.

6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde además una glucoamilasa está presente y/o se añade durante la etapa de licuefacción i) y tiene una estabilidad térmica a 85°C, pH 5,3, de al menos 20%.

7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde además una pululanasa está presente durante licuefacción y/o la sacarificación.

8. Composición enzimática que comprende:

i) una alfa-amilasa que tiene al menos 80% de identidad de secuencia con SEQ ID N.º: 1;
ii) una proteasa que tiene al menos 80% de identidad con SEQ ID N.º: 13 y que tiene un valor de termoestabilidad superior al 20% determinado como actividad relativa a 80°C/70°C.

9. Composición según la reivindicación 8, donde la alfa-amilasa es la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en SEQ ID N.º: 1 aquí.

10. Composición según la reivindicación 8 o 9, donde la alfa-amilasa tiene un T ½ (min) a pH 4,5, 85°C, 0,12 mM $CaCl_2$ de al menos 10.

11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, donde la proteasa tiene una termoestabilidad superior al 25% determinada como actividad relativa a 80°C/70°C.

12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8-11, donde la proteasa se deriva de una cepa de *Pyrococcus furiosus*.

13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8-12, que comprende además una glucoamilasa.

14. Composición según la reivindicación 13, donde la glucoamilasa tiene una estabilidad térmica a 85°C, pH 5,3, de al menos 20%.

15. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8-14, que comprende además una pululanasa.

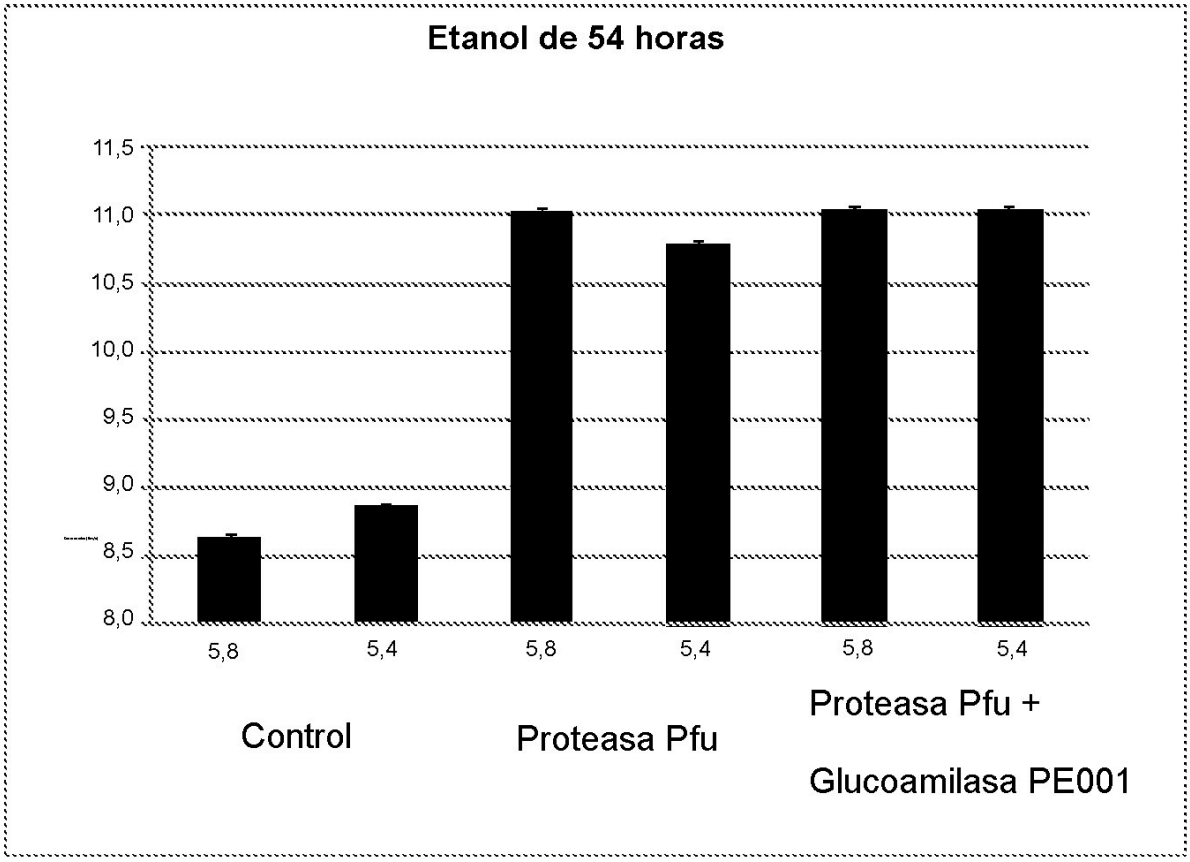
Etanol de 54 horas
11,5
11,0
10,5
10,0
9,5
9,0
8,5
8,0
5,8
5,4
5,8
5,4
5,8
5,4
Control
Proteasa Pfu
Proteasa Pfu +
Glucoamilasa PE001

**Fig. 1**