

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 940**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/06** (2006.01)

**C12P 19/02** (2006.01)

**C12P 19/14** (2006.01)

**C12P 19/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2011 PCT/US2011/066559**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.06.2012 WO12088303**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011 E 11808099 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 2654567**

54 Título: **Proceso para producir productos de fermentación a partir de materiales que contienen almidón**

30 Prioridad:

**22.12.2010 US 201061426039 P**  
**02.12.2011 US 201161566373 P**

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

**26.06.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DEINHAMMER, RANDY;**  
**CLARK, SUZANNE;**  
**QUIROS, MAURICIO;**  
**MATTHEWS, JOHN;**  
**HJULMAND, ANNE GLUD;**  
**SOONG, CHEE-LEONG;**  
**MATSUI, TOMOKO y**  
**TAKAGI, SHINOBU**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 673 940 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Proceso para producir productos de fermentación a partir de materiales que contienen almidón

## 5 Campo de la invención

[0001] Se describen procesos para producir productos de fermentación a partir de material que contiene almidón y composiciones adecuadas para el uso en un proceso de la invención.

## 10 Referencia a un listado de secuencias

[0002] Esta patente contiene un listado de secuencias.

Antecedentes de la invención

15

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

20

[0004] A pesar de la mejora significativa de los procesos de producción de productos de fermentación en la última 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, tienen la forma de productos de Maillard no fermentables.

25

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

## 35 Resumen de la invención

[0006] Se describen procesos de producción de productos de fermentación, tal como etanol a partir de material que contiene almidón, que utilizan un organismo fermentador y composiciones adecuadas para el uso en un proceso de la invención.

40

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

45 i) licuefacción del material que contiene almidón a un pH en el rango de 4,5-5,0 a una temperatura en el rango de 80-90 °C usando:

– una variante de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEQ ID N.º: 1 con una delección doble en 1181 + G182 y sustitución N193F, y que además comprende mutaciones seleccionadas del grupo de:

50

- V59A+Q89R+G112D+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+D269E+D281N;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+I270L;
- 55 – 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;
- 60 – 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;
- 65 – V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;

- V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+M284T;
- A91L+M96I+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- E129V+K177L+R179E;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- 5     – E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+Y276F+L427M;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+M284T;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+N376\*+I377\*;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;
- 10    – E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+M284T;
- E129V+K177L+R179E+S242Q;
- E129V+K177L+R179V+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- K220P+N224L+S242Q+Q254S; y
- M284V;
  
- 15     variante que tiene al menos el 80 % de identidad, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 1 y tiene un T ½ (min) a pH 4,5, 85 °C, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub> de al menos 10; y
- una variante de una metaloproteasa, variante que tiene al menos el 80 % de identidad, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3 de este documento
- 20     y tiene un valor de termoestabilidad superior al 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C; o
- una *Pyrococcus furiosus*, proteasa que tiene al menos el 80 % de identidad con la SEQ ID N.º: 13 de este documento y tiene un valor de termoestabilidad superior al 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C;
  
- 25     ii) sacarificación utilizando una enzima generadora de fuente de carbohidratos;
- iii) fermentación utilizando un organismo fermentador.
  
- 30     [0008] En una forma de realización, una enzima generadora de fuente de carbohidratos, en particular una glucoamilasa termoestable, y/o una pululanasa está(n) presente(s) y/o se adiciona(n) durante en la etapa de licuefacción i).
  
- 35     [0009] En un segundo aspecto, la invención se refiere a composiciones que incluyen una alfa-amilasa y una proteasa, donde la
- i) alfa-amilasa es una variante de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEQ ID N.º: 1 con una delección doble en 1181 + G182 y sustitución N193F, y que además comprende mutaciones seleccionadas del grupo de:
- 40     – V59A+Q89R+G112D+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+D269E+D281N;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+I270L;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+H274K;
- 45     – 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;
- 50     – 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;
- 55     – V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+M284T;
- A91L+M96I+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- E129V+K177L+R179E;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+Y276F+L427M;
- 60     – E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+M284T;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+N376\*+I377\*;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+M284T;

- E129V+K177L+R179E+S242Q;
- E129V+K177L+R179V+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- K220P+N224L+S242Q+Q254S; y
- M284V;

5

variante que tiene al menos el 80 % de identidad, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 1 y tiene un T  $\frac{1}{2}$  (min) a pH 4,5, 85 °C, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub>) de al menos 10; y

10

ii) una variante de una metaloproteasa, variante que tiene al menos el 80 % de identidad, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3 de este documento y tiene un valor de termoestabilidad superior al 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C; o

15

- una *Pyrococcus furiosus*, proteasa que tiene al menos el 80 % de identidad con la SEQ ID N.º: 13 de este documento y tiene un valor de termoestabilidad superior al 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C.

[0010] En una forma de realización, la composición comprende además una enzima generadora de fuente de carbohidratos, en particular una glucoamilasa termoestable, y/o una pululanasa.

20

[0011] En una forma de realización, una segunda alfa-amilasa está presente y/o se adiciona durante la etapa de licuefacción i).

[0012] En una forma de realización, la composición comprende una segunda alfa-amilasa.

25

Breve descripción de las figuras

[0013]

30

La fig. 1 muestra una comparación de etanol después de 54 horas para licuefacciones (85 °C) preparadas con alfa-amilasa 1407 con y sin proteasa Pfu o glucoamilasa PE001 a pH 4,8.

La fig. 2 muestra la viscosidad máxima y de rotura a 32 % de DS para el experimento en el ejemplo 10 comparando

35

- Alfa-amilasa A (1,4 micro g) (pH 5,8);
- Alfa-amilasa 1407 (1,4 micro g) + glucoamilasa PE001 (10 micro g) + proteasa 196 (1 micro g) (pH 4,8);
- Alfa-amilasa A (0,35 micro g) + alfa-amilasa 1407 (1,4 micro g) + glucoamilasa PE001 (10 micro g) + proteasa 196 (1 micro g) (pH 4,8);
- Alfa-amilasa A (0,7 micro g) + alfa-amilasa 1407 (1,4 micro g) + glucoamilasa PE001 (10 micro g) + proteasa 196 (1 micro g) (pH 4,8);

40

La fig. 3 muestra la viscosidad final a 32 % de DS a 32 °C para el experimento en el ejemplo 10 comparando

45

- Alfa-amilasa A (1,4 micro g) (pH 5,8);
- Alfa-amilasa 1407 (1,4 micro g) + glucoamilasa PE001 (10 micro g) + proteasa 196 (1 micro g) (pH 4,8);
- Alfa-amilasa A (0,35 micro g) + alfa-amilasa 1407 (1,4 micro g) + glucoamilasa PE001 (10 micro g) + proteasa 196 (1 micro g) (pH 4,8);
- Alfa-amilasa A (0,7 micro g) + alfa-amilasa 1407 (1,4 micro g) + glucoamilasa PE001 (10 micro g) + proteasa 196 (1 micro g) (pH 4,8).

50

La fig. 4 muestra el valor máximo y la viscosidad de rotura a 32 % de DS para el experimento en el ejemplo 10 comparando alfa-amilasa A (1,4 micro g) (pH 5,8) y alfa-amilasa A (1,4 micro g) + glucoamilasa PE001 (10 micro g) + proteasa 196 (1 micro g) (pH 4,8).

55

La fig. 5 muestra la viscosidad final a 32 % de DS, a 32 °C para el experimento en el ejemplo 10 comparando alfa-amilasa A (1,4 micro g) (pH 5,8) y alfa-amilasa A (1,4 micro g) + glucoamilasa PE001 (10 micro g) + proteasa 196 (1 micro g) (pH 4,8).

60

Descripción detallada de la invención

[0014] Se describen procesos de producción de productos de fermentación, tal como etanol, a partir de material que contiene almidón que utilizan un organismo fermentador y composiciones adecuadas para el uso en un proceso de la invención.

65

[0015] Los inventores han mostrado que un proceso de la invención tiene una serie de ventajas. Como se muestra en los ejemplos, un proceso de la invención da como resultado una producción de etanol más elevada. Otros beneficios incluyen una necesidad reducida de usar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para el ajuste del pH. Esto da como resultado menos azufre aguas abajo en los DDGS, menos contaminación en la parte delantera, menos beerstone y menos precipitación de fitato.

[0016] Un proceso de la invención también da como resultado la pérdida reducida de azúcares y dextrinas para productos de Maillard. El color de los DDGS se mejora y la vida del intercambiador térmico (menos sólidos) se amplía.

Además, debido a la mayor termoestabilidad de las enzimas usadas, la dosis enzimática se puede reducir. Un proceso de la invención requiere cambios limitados para los procesos y equipos de los procesos existentes y, por lo tanto, inversión de capital limitada.

[0017] Al tener una alfa-amilasa termoestable y una segunda alfa-amilasa tal y como se define en este documento en la licuefacción, el valor máximo de la viscosidad, por ejemplo, en el tanque de la suspensión, se reduce (adicionalmente). Esto da como resultado menos energía consumida en la mezcla. También el tener una viscosidad de promedio inferior mejora la mezcla del triturado/almidón en el tanque de la suspensión y su bombeo a través del proceso de licuefacción.

[0018] En el primer aspecto, la invención se refiere a procesos 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 4,5-5,0 a una temperatura en el rango de 80-90 °C usando:

– una variante de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEQ ID N.º: 1 con una delección doble en 1181 + G182 y sustitución N193F, y que además comprende mutaciones seleccionadas del grupo de:

- V59A+Q89R+G112D+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+D269E+D281N;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+I270L;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+H274K;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+Y276F;
- V59A+E129V+R157Y+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- V59A+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- 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+M96I+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- E129V+K177L+R179E;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+Y276F+L427M;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+M284T;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+N376\*+I377\*;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+M284T;
- E129V+K177L+R179E+S242Q;
- E129V+K177L+R179V+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- K220P+N224L+S242Q+Q254S; y
- M284V;

variante que tiene al menos el 80 % de identidad, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 1 y tiene un T ½ (min) a pH 4,5, 85 °C, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub> de al menos 10; y

– una variante de una metaloproteasa, variante que tiene al menos el 80 % de identidad, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3 de este documento

y tiene un valor de termoestabilidad superior al 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C; o

- una *Pyrococcus furiosus*, proteasa que tiene al menos el 80 % de identidad con la SEQ ID N.º: 13 de este documento y tiene un valor de termoestabilidad superior al 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C;

5

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

10 [0019] En una forma de realización preferida, las etapas ii) y iii) se realizan o bien consecutivamente o bien simultáneamente. La alfa-amilasa termoestable y la proteasa termoestable definidas anteriormente y opcionalmente la enzima generadora de fuente de carbohidratos, preferiblemente la glucoamilasa termoestable, y/u opcionalmente una pululanasa, se pueden adicionar antes y/o durante la etapa de licuefacción i). Ejemplos de alfa-amilasas termoestables se pueden encontrar en el apartado "Alfa-amilasa presente y/o adicionada durante la licuefacción" más adelante. Ejemplos de proteasas termoestables se pueden encontrar en el apartado "Proteasa presente y/o adicionada durante la licuefacción" más adelante. Una composición de la invención se puede usar adecuadamente en un proceso de la invención. Sin embargo, los componentes enzimáticos también se pueden adicionar de forma separada.

15

20 [0020] En una forma de realización preferida, el pH durante la licuefacción es de entre 4,5-4,8.

[0021] En una forma de realización, una enzima generadora de fuente de carbohidratos también está presente durante la licuefacción. En una forma de realización preferida, la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una glucoamilasa termoestable. En una forma de realización, la enzima generadora de fuente de carbohidratos es diferente de la usada durante la sacarificación en la etapa ii) y/o la fermentación en la etapa iii).

25

[0022] Ejemplos de "enzimas generadoras de fuente de carbohidratos", entre las que se incluyen en particular las glucoamilasas, pueden encontrarse en el apartado "Enzima generadora de fuente de carbohidratos presente y/o adicionada durante la licuefacción" más adelante.

30

[0023] En una forma de realización, el proceso de la invención comprende, además, antes de la etapa i), las etapas de:

35

- a) reducir el tamaño de las partículas del material que contiene almidón, preferiblemente por molienda en seco;
- b) formar una suspensión que comprende el material que contiene almidón y agua.

40 [0024] El material de partida que contiene almidón, tal como granos enteros, se puede reducir en tamaño de partículas, por ejemplo, mediante molienda, para abrir la estructura y permitir un mayor procesamiento. Generalmente hay dos tipos de procesos: molienda en seco y húmeda. En la molienda en seco, se muelen y se usan semillas enteras. La molienda en húmedo da una buena separación del germen y la harina (gránulos de almidón y proteína) y se aplica frecuentemente en ubicaciones donde el hidrolizado de almidón se usa en la producción de, por ejemplo, jarabes. Tanto la molienda en seco como la húmeda son muy conocidas en la técnica del procesamiento de almidón. Según la invención, se prefiere la molienda en seco. En una forma de realización, el tamaño de partículas se reduce a entre 0,05 y 3,0 mm, preferiblemente 0,1-0,5 mm, o de modo que al menos el 30 %, preferiblemente al menos el 50 %, más preferiblemente al menos el 70 %, aún más preferiblemente al menos el 90 % del material que contiene almidón pase a través de un tamiz con un filtro de 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente un filtro de 0,1-0,5 mm. En otra forma de realización, al menos el 50 %, preferiblemente al menos el 70 %, más preferiblemente al menos el 80 %, especialmente al menos el 90 % del material que contiene almidón pasa a través de un tamiz con un filtro del # 6.

50

[0025] La suspensión acuosa puede contener 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. La suspensión se calienta por encima de la temperatura de gelatinización, preferiblemente a entre 80-90 °C, pH 4,5-4,8 durante aproximadamente 15-60 minutos.

55

[0026] La alfa-amilasa termoestable, la proteasa termoestable y la enzima generadora de fuente de carbohidratos opcional, en particular glucoamilasa termoestable, y/o la pululanasa opcional se pueden adicionar a la suspensión acuosa para iniciar la licuefacción (dilución). En una forma de realización, solo una parte de la mezcla enzimática (composición de la invención) se adiciona a la suspensión acuosa, mientras que el resto de la enzima se adiciona durante la etapa de licuefacción i). La etapa de licuefacción i) se realiza típicamente a 80-90 °C, pH 4,5-4,8 durante 1-3 horas.

60

[0027] La suspensión acuosa, en una forma de realización, se puede cocer por chorro para gelatinizar adicionalmente la suspensión antes de ser sometida a la licuefacción de la etapa i). La cocción por chorro se puede realizar a una temperatura de entre 110-145 °C, preferiblemente 120-140 °C, tal como 125-135 °C,

65

preferiblemente de aproximadamente 130 °C durante aproximadamente 1-15 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 3-10 minutos, especialmente alrededor de aproximadamente 5 minutos.

#### Sacarificación y fermentación

[0028] Una o más enzimas generadoras de fuente de carbohidratos, en particular glucoamilasas, están presentes y/o se adicionan durante la etapa de sacarificación ii) y/o la etapa de fermentación iii). La enzima generadora de fuente de carbohidratos puede ser preferiblemente una glucoamilasa, pero también puede ser una enzima seleccionada del grupo que consiste en: beta-amilasa, amilasa maltogénica y alfa-glicosidasa.

[0029] Ejemplos de enzima generadora de fuente de carbohidratos, entre los que se incluyen las glucoamilasas, se pueden encontrar en el apartado "Enzima generadora de fuente de carbohidratos presente y/o adicionada durante la sacarificación y/o la fermentación" más adelante.

[0030] Al hacer la sacarificación y la fermentación secuenciales, la etapa de sacarificación ii) se puede realizar utilizando condiciones muy conocidas en la técnica. Por ejemplo, la etapa de sacarificación ii) puede durar hasta de aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas, sin embargo, resulta común hacer solo una presacarificación de típicamente 40-90 minutos a una temperatura de entre 30-65 °C, típicamente de aproximadamente 60 °C, seguido de sacarificación durante la fermentación en la sacarificación y la 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 de entre 4 y 5, normalmente a aproximadamente pH 4,5.

[0031] La sacarificación y la fermentación simultánea ("SSF") se usa ampliamente en procesos de producción de productos de fermentación a escala industrial, especialmente procesos de producción de etanol. A hacer la SSF, la etapa de sacarificación ii) y la etapa de fermentación iii) se realizan simultáneamente. No hay fase de retención para la sacarificación, lo que significa que se puede adicionar un organismo fermentador, tal como levadura, y enzima(s). 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 de forma de realización, la fermentación está en curso durante de 6 a 120 horas, en particular de 24 a 96 horas. En una forma de realización, el pH es de entre 3,5-5, en particular de entre 3,8 y 4,3.

#### Medio de fermentación

[0032] "Medios de fermentación" o "medio de fermentación" se refiere al ambiente donde se realiza la fermentación y que incluye el sustrato de fermentación, es decir, la fuente de carbohidratos que se metaboliza por el organismo fermentador. El medio de fermentación puede comprender nutrientes y estimulador(es) de crecimiento para el organismo (los organismos) de fermentación. El nutriente y los estimuladores de crecimiento se usan ampliamente en la técnica de fermentación e incluyen fuentes de nitrógeno, tales como amoníaco; urea, vitaminas y minerales, o combinaciones de los mismos.

#### Organismos fermentadores

[0033] El término "organismo fermentador" se refiere a cualquier organismo, incluidos organismos bacterianos y fúngicos, adecuado para el uso en un proceso de fermentación y capaz 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, de *Saccharomyces cerevisiae*.

[0034] En una forma de realización, el organismo fermentador se adiciona al medio de fermentación de modo que el organismo fermentador viable, tal como levadura, contado por mL de medio de fermentación esté en el rango de  $10^5$  a  $10^{12}$ , preferiblemente de  $10^7$  a  $10^{10}$ , especialmente de aproximadamente  $5 \times 10^7$ .

[0035] La levadura disponible comercialmente incluye, por ejemplo, levadura RED STAR™ y ETHANOL RED™ (disponibles de Fermentis/Lesaffre, EE.UU.), FALI (disponible de Fleischmann's Yeast, EE.UU.), levadura fresca SUPERSTART y THERMOSACC™ (disponibles de Ethanol Technology, WI, EE.UU.), BIOFERM AFT y XR (disponibles 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

[0036] Cualquier material adecuado que contenga almidón se puede utilizar según la presente invención. El material de partida se selecciona generalmente basándose en el producto de fermentación deseado. Ejemplos de materiales adecuados que contienen almidón para el uso en un proceso de la invención incluyen granos enteros, maíz, trigo, cebada, centeno, mijo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, alubias, o patatas

dulces, o mezclas de los mismos o almidones derivados de ellos, o cereales. Se contemplan también tipos cerosos y no cerosos de maíz y cebada.

#### Productos de fermentación

5 [0037] El término "producto de fermentación" significa un producto producido por un proceso que incluye una etapa de fermentación que utiliza un organismo fermentador. Los productos de fermentación contemplados según la invención incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido succínico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (por ejemplo, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B<sub>12</sub>, beta-caroteno); y hormonas. En una forma de realización preferida, el producto de fermentación es etanol, por ejemplo, etanol combustible; etanol potable, es decir, bebidas espirituosas neutras potables; o etanol industrial o productos usados en la industria del alcohol 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 ales, stouts, lagers, bitters, licores de malta, happoushu, cerveza de alto contenido de alcohol, cerveza de bajo contenido de alcohol, cerveza de bajo contenido de calorías o cerveza *light*. Los procesos de fermentación preferidos usados incluyen procesos de fermentación alcohólica. El producto de fermentación, tal como etanol, obtenido según la invención, se puede usar preferiblemente como combustible que se mezcla típicamente con gasolina. Sin embargo, en el caso del etanol también se puede usar como etanol potable.

#### Recuperación

25 [0038] Después de la fermentación, el producto de fermentación se puede separar del medio de fermentación. La suspensión se puede destilar para extraer el producto de fermentación deseado. Alternativamente, el producto de fermentación deseado se puede ser extraer del medio de fermentación mediante técnicas de microfiltración o filtración con membrana. El producto de fermentación también se puede recuperar por desorción u otro método conocido en la técnica.

#### Alfa-amilasa presente y/o adicionada durante la licuefacción

30 [0039] Según la invención, la alfa-amilasa es una variante de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEQ ID N.º: 1 con una deleción doble en 1181 + G182 y sustitución N193F, y que además comprende mutaciones seleccionadas del grupo de:

- 35
- V59A+Q89R+G112D+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;
  - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S;
  - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+D269E+D281N;
  - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+I270L;

40

  - 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;

45

  - 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;

50

  - V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;
  - V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+M284T;
  - A91L+M96I+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
  - E129V+K177L+R179E;
  - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;

55

  - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+Y276F+L427M;
  - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+M284T;
  - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+N376\*+I377\*;
  - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;
  - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+M284T;

60

  - E129V+K177L+R179E+S242Q;
  - E129V+K177L+R179V+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
  - K220P+N224L+S242Q+Q254S; y
  - M284V;



variante que tiene al menos el 80 % de identidad, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 1 y tiene un T ½ (min) a pH 4,5, 85 °C, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub>) de al menos 10. Según la invención, la alfa-amilasa tiene alta actividad con respecto a la solubilización de almidón en la licuefacción a pH de 4,5 a 5,0 y alta termoestabilidad a pH de 4,5-5,0 y 80-90 °C, preferiblemente 4,5-4,8, a alrededor de 85 °C.

[0040] Más específicamente la alfa-amilasa usada en un proceso de la invención tiene un T ½ (min) a pH 4,5, 85 °C, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub> de al menos 10 determinado como se describe en el ejemplo 1.

[0041] En una forma de realización preferida, el T ½ (min) a pH 4,5, 85 °C, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub>, es al menos 15, tal como al menos 20, tal como al menos 25, tal como al menos 30, tal como al menos 40, tal como al menos 50, tal como al menos 60, tal como entre 10-70, tal como entre 15-70, tal como entre 20-70, tal como entre 25-70, tal como entre 30-70, tal como entre 40-70, tal como entre 50-70, tal como entre 60-70.

[0042] En una forma de realización, la alfa-amilasa termoestable es una variante de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* que tiene al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, más preferiblemente al menos el 92 %, aún más preferiblemente al menos el 93 %, de la forma más preferible al menos el 94 %, e incluso de la forma más preferible al menos el 95 %, tal como incluso al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 1 de este documento.

[0043] La alfa-amilasa termoestable puede ser una alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* truncada, preferiblemente para tener alrededor de 491 aminoácidos.

#### Segunda alfa-amilasa presente y/o adicionada durante la licuefacción

[0044] Cuando una segunda alfa-amilasa está presente y/o se adiciona durante la etapa de licuefacción i), se obtiene un efecto de reducción de la viscosidad positivo. Como se puede observar en el ejemplo 10, la combinación de una alfa-amilasa termoestable (por ejemplo, alfa-amilasa BE1407) con o sin la presencia de una proteasa termoestable (por ejemplo, proteasa 196) y glucoamilasa termoestable (por ejemplo, glucoamilasa PO) y además una segunda alfa-amilasa (por ejemplo, alfa-amilasa A) da como resultado un valor máximo de viscosidad y una viscosidad final disminuidos.

[0045] Por lo tanto, en este aspecto de la invención, una segunda alfa-amilasa se adiciona durante la etapa de licuefacción i). La segunda alfa-amilasa puede ser menos termoestable y/o menos eficaz a pH 4,5, 85 °C, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub>, o a alrededor de pH 4,8, que una alfa-amilasa termoestable definida en este documento adicionada y/o presente durante la licuefacción según la invención.

[0046] En una forma de realización, la segunda alfa-amilasa es de origen bacteriano.

[0047] En una forma de realización, la segunda alfa-amilasa se deriva de una cepa del género *Bacillus*, tal como una cepa de *Bacillus stearothermophilus*, en particular una variante de una alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, tal como la mostrada en la SEQ ID N.º: 3 en WO 99/019467 o la SEQ ID N.º: 1 de este documento. La segunda alfa-amilasa puede ser una alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* truncada, preferiblemente para tener alrededor de 491 aminoácidos.

[0048] En una forma de realización, la segunda alfa-amilasa tiene al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, más preferiblemente al menos el 92 %, aún más preferiblemente al menos el 93 %, de la forma más preferible al menos el 94 %, e incluso de la forma más preferible al menos el 95 %, tal como incluso al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o al menos el 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3 descrita en WO 99/019467 o la SEQ ID N.º: 1 de este documento.

[0049] En una forma de realización, la segunda alfa-amilasa tiene un T ½ (min) a pH 4,5, 85 °C, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub>) por debajo de 10 determinado como se describe en el ejemplo 1.

[0050] En una forma de realización, la segunda alfa-amilasa tiene un T ½ (min) a pH 4,5, 85 °C, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub>) por debajo de 8, tal como por debajo de 7, tal como por debajo de 6, tal como por debajo de 5.

[0051] En una forma de realización, la segunda alfa-amilasa tiene un T ½ (min) a pH 4,5, 85 °C, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub>) de entre 2 y 10, tal como de entre 3 y 8, tal como de por encima de 4 a 10, tal como de por encima de 4 a 8.

[0052] En una forma de realización, la segunda alfa-amilasa se puede derivar de *Bacillus stearothermophilus* y puede tener las mutaciones siguientes: I181\*+G182\* o I181\*+G182\*+N193F (usando la SEQ ID N.º: 1 para la numeración).

Proteasa presente y/o adicionada durante la licuefacción

- 5 [0053] Según la invención, la proteasa termoestable es una variante de una metaloproteasa, variante que tiene al menos el 80 % de identidad, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3 de este documento y tiene un valor de termoestabilidad superior al 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C; o una proteasa de *Pyrococcus furiosus* que tiene al menos el 80 % de identidad con la SEQ ID N.º: 13 de este documento y tiene un valor de termoestabilidad superior al 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C.
- 10 [0054] En una forma de realización, la proteasa tiene un valor de termoestabilidad:
- de más del 30 %, más del 40 %, más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, más del 90 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C.
- 15 [0055] Las variantes purificadas pueden tener una termoestabilidad de por encima de 90, por encima de 100 a 85 °C determinada utilizando el ensayo de zeína-BCA descrito en el ejemplo 3.
- [0056] La determinación de la "Actividad relativa" y "Actividad restante" se determina como se describe en el ejemplo 2.
- 20 [0057] Las proteasas se clasifican basándose en su mecanismo catalítico en los grupos siguientes: serina proteasas (S), cisteína proteasas (C), proteasas aspárticas (A), metaloproteasas (M), y proteasas desconocidas, o aún sin clasificar (U), véase Handbook of Proteolytic Enzymes, A. J. Barrett, N. D. Rawlings, J. F. Woessner (eds.), Academic Press (1998), en particular la parte de la introducción general.
- 25 [0058] En una forma de realización preferida, la proteasa termoestable usada en un proceso de la invención es una "metaloproteasa" definida como una proteasa que pertenece a EC 3.4.24 (metaloendopeptidasas); preferiblemente EC 3.4.24.39 (metaloproteinasas ácidas).
- 30 [0059] Para determinar si una proteasa determinada es una metaloproteasa o no, se hace referencia al anterior "Handbook of Proteolytic Enzymes" y a los principios indicados en el mismo. Tal determinación puede llevarse a cabo para todos los tipos de proteasas, ya sean proteasas de origen natural o de tipo salvaje; o proteasas modificadas genéticamente o sintéticas.
- 35 [0060] La actividad de las proteasas se puede medir utilizando cualquier ensayo adecuado, en el que se emplee un sustrato, que incluya enlaces de péptido relevantes para la especificidad de la proteasa en cuestión. El pH del ensayo y la temperatura del ensayo se deben adaptar igualmente a la proteasa en cuestión. Ejemplos de valores de pH de ensayo son pH 6, 7, 8, 9, 10 u 11. Ejemplos de temperatura de ensayo son 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 u 80 °C.
- 40 [0061] Ejemplos de sustratos de proteasa son caseína, tal como caseína reticulada con azurina (AZCL-caseína). Dos ensayos de proteasa se describen más adelante en el apartado "Materiales y métodos", de los cuales el denominado "ensayo de AZCL-caseína" es el ensayo preferido.
- 45 [0062] En una forma de realización, la proteasa usada en un proceso de la invención es una metaloproteasa fúngica derivada a partir de una cepa del género *Thermoascus*, preferiblemente una cepa de *Thermoascus aurantiacus*, especialmente *Thermoascus aurantiacus* CGMCC n° 0670 (clasificado como EC 3.4.24.39).
- [0063] En una forma de realización, la variante de proteasa tiene al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, más preferiblemente al menos el 92 %, aún más preferiblemente al menos el 93 %, de la forma más preferible al menos el 94 %, e incluso de la forma más preferible al menos el 95 %, tal como incluso al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3 de este documento.
- 50 [0064] En una forma de realización, la proteasa es una variante de la parte madura de la metaloproteasa mostrada en la SEQ ID N.º: 2 descrita en WO 2003/048353 o la parte madura de la SEQ ID N.º: 1 en WO 2010/008841 y mostrada como la SEQ ID N.º: 3 de este documento con las mutaciones siguientes:
- 55
- 60 – S5\*+N26R+D79L+S87P+A112P+D142L;
  - S5\*+D79L+S87P+A112P+D142L;
  - N26R+T46R+D79L+S87P+A112P+D142L;
  - A27K+D79L+Y82F+S87G+D104P+A112P+A126V+D142L;
  - A27K+D79L+Y82F+D104P+A112P+A126V+D142L;
  - 65 – A27K+D79L+S87P+A112P+T124V+D142L;

- A27K+D79L+S87P+A112P+A126V+D142L;
  - A27K+D79L+S87P+A112P+D142L;
  - A27K+Y82F+S87G+D104P+A112P+A126V+D142L;
  - A27K+Y82F+D104P+A112P+A126V+D142L;
  - 5    – S36P+D79L+S87P+A112P+D142L;
  - A37P+D79L+S87P+A112P+D142L;
  - S38T+D79L+S87P+A112P+A126V+D142L;
  - T46R+D79L+S87P+T116V+D142L;
  - S49P+D79L+S87P+A112P+D142L;
  - 10   – S50P+D79L+S87P+A112P+D142L;
  - S70V+D79L+Y82F+S87G+Y97W+A112P+D142L;
  - S70V+D79L+Y82F+S87G+A112P+D142L;
  - D79L+P81R+S87P+A112P+D142L;
  - D79L+Y82F+S87G+Y97W+D104P+A112P+D142L;
  - 15   – D79L+Y82F+S87G+D104P+A112P+D142L;
  - D79L+Y82F+S87G+A112P+A126V+D142L;
  - D79L+Y82F+S87G+A112P+D142L;
  - D79L+Y82F+S87P+A112P+T124V+D142L;
  - D79L+Y82F+S87P+A112P+A126V+D142L;
  - 20   – D79L+Y82F+S87P+A112P+D142L;
  - D79L+S87P+N98C+A112P+G135C+D142L;
  - D79L+S87P+D104P+A112P+D142L;
  - D79L+S87P+A112P+T124V+A126V+D142L;
  - D79L+S87P+A112P+T124V+D142L;
  - 25   – D79L+S87P+A112P+D142L;
  - D79L+S87P+A112P+D142L+T141C+M161C;
  - Y82F+S87G+S70V+D79L+D104P+A112P+D142L;
  - Y82F+S87G+D79L+D104P+A112P+A126V+D142L.
- 30   [0065] En una forma de realización, la proteasa termoestable presente y/o adicionada durante la etapa de licuefacción i) se deriva de una cepa de *Pyrococcus furiosus* que tiene al menos el 80 % de identidad, tal como al menos el 85 %, tal como al menos el 90 %, tal como al menos el 95 %, tal como al menos el 96 %, tal como al menos el 97 %, tal como al menos el 98 %, tal como al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID N.º: 13 de este documento. La proteasa de *Pyrococcus furiosus* se puede comprar de Takara Shuzo Co. Ltd, Japón.
- 35   [0066] La proteasa de *Pyrococcus furiosus* es una proteasa termoestable. Se descubrió que la proteasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu S) del producto comercial tiene una termoestabilidad del 110 % (80 °C/70 °C) y 103 % (90 °C/70 °C) a pH 4,5 determinada como se describe en el ejemplo 2 de este documento.
- 40   Enzima generadora de fuente de carbohidratos presente y/o adicionada durante la licuefacción.
- [0067] Según la invención, una enzima generadora de fuente de carbohidratos, preferiblemente una glucoamilasa termoestable, puede estar presente y/o se puede adicionar durante la licuefacción junto con la alfa-amilasa termoestable definida en la reivindicación 1 y la proteasa termoestable definida en la reivindicación 1. Como se ha mencionado anteriormente, una pululanasa también puede estar presente y/o adicionarse durante la etapa de licuefacción i).
- 50   [0068] El término "enzima generadora de fuente de carbohidratos" incluye cualquier enzima generadora de azúcares fermentables. Una enzima generadora de fuente de carbohidratos es capaz de producir un carbohidrato que se puede usar como una fuente de energía por el organismo (los organismos) 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, se puede utilizar una mezcla de enzimas generadoras de fuente de carbohidratos. Ejemplos específicos incluyen glucoamilasa (que son generadores de glucosa), beta-amilasa y amilasa maltogénica (que son generadores de maltosa).
- 55   [0069] En una forma de realización preferida, la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una glucoamilasa termoestable. La enzima generadora de fuente de carbohidratos, en particular glucoamilasa termoestable, se puede adicionar junto con o por separado de la alfa-amilasa termoestable y la proteasa termoestable.
- 60   [0070] En una forma de realización, la enzima generadora de fuente de carbohidratos, preferiblemente una glucoamilasa termoestable, tiene una estabilidad térmica de actividad relativa a 85 °C de al menos el 20 %, al menos el 30 %, preferiblemente al menos el 35 %. En una forma de realización, la enzima generadora de

carbohidratos es una glucoamilasa con una actividad relativa a pH 4,5 de al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 85 %, preferiblemente al menos el 90 %, preferiblemente al menos el 95 %.

5 [0071] En una forma de realización específica y preferida, la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una glucoamilasa termoestable, preferiblemente de origen fúngico, preferiblemente unos hongos filamentosos, tal como de una cepa del género *Penicillium*, especialmente una cepa de *Penicillium oxalicum* descrita como la SEQ ID N.º: 2 en PCT/CN10/071753 publicada como WO 2011/127802 y mostrada en las SEQ ID N.º: 9 o 14 de este documento.

10 [0072] En una forma de realización preferida, la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una variante de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* descrita como la SEQ ID N.º: 2 en PCT/CN10/071753 publicada como WO 2011/127802 y mostrada en las SEQ ID N.º: 9 y 14 de este documento, con una sustitución K79V (utilizando la secuencia madura mostrada en la SEQ ID N.º: 14 para la numeración). La variante de glucoamilasa K79V tiene sensibilidad reducida a la degradación de proteasas con respecto a la progenitora como se describe en la  
15 solicitud copendiente de EE.UU. N.º 61/531,189.

[0073] En una forma de realización específica, la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una glucoamilasa, preferiblemente derivada a partir de una cepa del género *Penicillium*, especialmente una cepa de *Penicillium oxalicum* descrita en PCT/CN10/071753 publicada como WO 2011/127802. La glucoamilasa también  
20 puede ser glucoamilasa con al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, más preferiblemente al menos el 92 %, aún más preferiblemente al menos el 93 %, de la forma más preferible al menos el 94 %, e incluso de la forma más preferible al menos el 95 %, tal como incluso al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % de identidad con el polipéptido maduro mostrado en la SEQ ID N.º: 2 en PCT/CN10/071753  
25 publicada como WO 2011/127802 y mostrada como las SEQ ID N.º: 9 y 14 de este documento.

#### Pululanasa presente y/o adicionada durante la licuefacción

30 [0074] Opcionalmente una pululanasa puede estar presente y/o se puede adicionar durante la etapa de licuefacción i) junto con la alfa-amilasa termoestable definida en la reivindicación 1 y la proteasa termoestable definida en la reivindicación 1. Como se ha mencionado anteriormente, una enzima generadora de fuente de carbohidratos, preferiblemente una glucoamilasa termoestable, también puede estar presente y/o adicionarse durante la etapa de licuefacción i).

35 [0075] La pululanasa puede estar presente y/o se puede adicionar durante la etapa de licuefacción i) y/o la etapa de sacarificación ii) o la sacarificación y la fermentación simultánea.

[0076] Las pululanosas (E.C. 3.2.1.41, pululano 6-glucono-hidrolasa), son enzimas desramificantes caracterizadas por su capacidad para hidrolizar los enlaces alfa-1,6-glicosídicos en, por ejemplo, amilopectina y pululano.  
40

[0077] Las pululanosas contempladas según la presente invención incluyen las pululanosas de *Bacillus amyloclaviformis* descritas en la patente de EE.UU. n.º 4,560,651, la pululanasa descrita como la SEQ ID N.º: 2 en WO 01/151620, los desramificantes de *Bacillus* descritos como la SEQ ID N.º: 4 en WO 01/151620, y la pululanasa de *Bacillus acidopullulyticus* descrita como la SEQ ID N.º: 6 en WO 01/151620 y también descrita en FEMS Mic. Let. 115: 97-106 (1994).  
45

[0078] Las pululanosas adicionales contempladas según la presente invención incluían las pululanosas de *Pyrococcus woesei*, específicamente de *Pyrococcus woesei* DSM n.º 3773 descrita en WO 92/02614, y la secuencia de proteína madura descrita como la SEQ ID N.º: 6 de este documento.  
50

[0079] En una forma de realización, la pululanasa es una pululanasa de la familia GH57. En una forma de realización, la pululanasa incluye un dominio X47 como se describe en US 61/289,040 publicada como WO 2011/087836. Más específicamente, la pululanasa se puede derivar a partir de una cepa del género  
55 *Thermococcus*, que incluye *Thermococcus litoralis* y *Thermococcus hydrothermalis*, tal como la pululanasa de *Thermococcus hydrothermalis* mostrada en la SEQ ID N.º: 11 truncada en el sitio X4 justo después del dominio X47 (es decir, aminoácidos 1-782 en las SEQ ID N.º: 11 y 12 de este documento). La pululanasa también puede ser un híbrido de las pululanosas de *Thermococcus litoralis* y de *Thermococcus hydrothermalis* o una enzima híbrida de *T. hydrothermalis*/*T. litoralis* con sitio de truncamiento X4 descrita en US 61/289,040 publicada como  
60 WO 2011/087836 y descrita en la SEQ ID N.º: 12.

[0080] La pululanasa se puede adicionar, según la invención, en una cantidad eficaz que incluye la cantidad preferida de aproximadamente 0,0001-10 mg de proteína enzimática por gramo de DS, preferiblemente 0,0001-0,10 mg de proteína enzimática por gramo de DS, más preferiblemente 0,0001-0,010 mg de proteína enzimática por gramo de DS. La actividad de la pululanasa se puede determinar como NPUN. Un ensayo para la determinación de NPUN se describe en el apartado de "Materiales y métodos" más adelante.  
65

[0081] Productos de pululanasa disponibles comercialmente adecuados incluyen PROMOZYME D, PROMOZYME™ D2 (Novozymes A/S, Dinamarca), OPTIMAX L-300 (Genencor Int., EE.UU.), y AMANO 8, (Amano, Japón).

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

[0082] Según la invención, una enzima generadora de fuente de carbohidratos, preferiblemente una glucoamilasa, está presente y/o se adiciona durante la sacarificación y/o la fermentación.

[0083] En una forma de realización preferida, la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una glucoamilasa, de origen fúngico, preferiblemente a partir 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

[0084] Según la invención, la glucoamilasa presente y/o adicionada durante la sacarificación y/o la fermentación se puede derivar de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, se puede derivar a partir 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 de *Aspergillus niger* G1 o G2 (Boel et al., 1984, EMBO J. 3(5): 1097-1102), o variantes de las mismas, tal como las descritas en WO 92/00381, WO 00/04136 y WO 01/04273 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa de *A. awamori* descrita en WO 84/02921, glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* (Agric. Biol. Chem. 55(4): 941-949 (1991)), o variantes o fragmentos de las mismas. Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes con estabilidad térmica 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).

[0085] Otras glucoamilasas incluyen glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (previamente denominada *Corticium rolfsii*) (véase patente de EE.UU. N.º 4,727,026 y (Nagasaka et al., 1998, "Purification and properties of the raw-starch-degrading glucoamilasas 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 de ref. 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 WO 99/28448.

[0086] Las glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135,138), y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831) y *Trametes cingulata*, *Pachykytospora papyracea*; y *Leucopaxillus giganteus* todas descritas en WO 2006/069289; o *Peniophora rufomarginata* descrita en WO 2007/124285; o una mezcla de las mismas. También se contemplan las glucoamilasas híbridas según la invención. Ejemplos de las glucoamilasas híbridas se describen en WO 2005/045018. Ejemplos específicos incluyen la glucoamilasa híbrida descrita en las tablas 1 y 4 del ejemplo 1.

[0087] En una forma de realización, la glucoamilasa se deriva de una cepa del género *Pycnoporus*, en particular una cepa de *Pycnoporus* como se describe en 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 *Gloeophyllum*, en particular una cepa de *Gloeophyllum* como se describe en 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 US 61/411,044 o PCT/US10/058375 (SEQ ID N.º: 2). Se contemplan también las glucoamilasas que muestran una alta identidad con cualquiera de las glucoamilasas anteriormente mencionadas, es decir, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o incluso el 100 % de identidad con cualquiera de las partes maduras de las secuencias enzimáticas mencionadas anteriormente.

[0088] Se contemplan también las glucoamilasas que muestran una alta identidad con cualquiera de las glucoamilasas anteriormente mencionadas, es decir, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o incluso el 100 % de identidad con las secuencias de enzimas maduras anteriormente mencionadas.

[0089] Las glucoamilasas se pueden adicionar, en una forma de realización, en una cantidad de 0,0001-20 AGU/g de DS, preferiblemente 0,001-10 AGU/g de DS, especialmente entre 0,01-5 AGU/g de DS, tal como 0,1-2 AGU/g de DS.

[0090] Las composiciones disponibles comercialmente que comprenden glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L, SPIRIZYME™ PLUS, FUEL SPIRIZYME™, SPIRIZYME™ B4U, SPIRIZYME™ ULTRA, SPIRIZYME™ ECXEL y AMG™ E (de Novozymes A/S); OPTIDEX™ 300; GC480; GC417 (de Genencor Int.); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME™ G900, G-ZYME™ y G990 ZR (de Genencor Int.).

#### Amilasa maltogénica

[0091] La enzima generadora de fuente de carbohidratos presente y/o adicionada 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 a maltosa en la configuración alfa. Una amilasa maltogénica de cepa de *Bacillus stearothermophilus* NCIB 11837 está comercialmente disponible de Novozymes A/S. Las alfa-amilasas maltogénicas se describen en las patentes de EE.UU. N.º. 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628. La amilasa maltogénica se puede adicionar, 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 de DS.

#### Una composición que comprende alfa-amilasa y proteasa

[0092] En este aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende una alfa-amilasa y una proteasa, donde la

i) alfa-amilasa es una variante de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEQ ID N.º: 1 con una delección doble en 1181 + G182 y sustitución N193F, y que además comprende mutaciones seleccionadas del grupo de:

- V59A+Q89R+G112D+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+D269E+D281N;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+I270L;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+H274K;
- V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+Y276F;
- V59A+E129V+R157Y+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- V59A+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- 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+M96I+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- E129V+K177L+R179E;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+Y276F+L427M;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+M284T;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+N376\*+I377\*;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;
- E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+M284T;
- E129V+K177L+R179E+S242Q;
- E129V+K177L+R179V+K220P+N224L+S242Q+Q254S;
- K220P+N224L+S242Q+Q254S; y
- M284V;

variante que tiene al menos el 80 % de identidad, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 1 y tiene un T ½ (min) a pH 4,5, 85 °C, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub>) de al menos 10; y

ii) una variante de una metaloproteasa, variante que tiene al menos el 80 % de identidad, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3 de este documento y tiene un valor de termoestabilidad superior al 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C; o

- una *Pyrococcus furiosus*, proteasa que tiene al menos el 80 % de identidad con la SEQ ID N.º: 13 de este documento y tiene un valor de termoestabilidad superior al 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C.

5 [0093] La composición comprende además opcionalmente una enzima generadora de fuente de carbohidratos. Dicha enzima generadora de fuente de carbohidratos puede ser una glucoamilasa termoestable con una estabilidad térmica de actividad relativa a 85 °C de al menos el 20 %, al menos el 30 %, preferiblemente al menos el 35 %.

10 [0094] Las variantes de alfa-amilasa se describen adicionalmente en el apartado anterior "Alfa-amilasa presente y/o adicionada durante la licuefacción". La alfa-amilasa puede tener un T<sub>1/2</sub> (min) a pH 4,5, 85 °C, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub>) de 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.

15 [0095] En una forma de realización, la alfa-amilasa se selecciona del grupo de variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearrowthermifilus*, en particular truncada para tener 491 aminoácidos de longitud, con mutaciones seleccionadas del grupo de:

- 20 - I181\*+G182\*+N193F+V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+ Q254S;
- I181\*+G182\*+N193F+E129V+K177L+R179E; y
- I181\*+G182\*+N193F+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S (usando la SEQ ID N.º: 1 de este documento para la numeración).

25 [0096] La proteasa tiene una termoestabilidad de:

- i) más del 30 %, más del 40 %, más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, más del 90 % determinada como actividad relativa a 80 °C/70 °C.

30 [0097] En una forma de realización preferida específica, la proteasa es una variante de la metaloproteasa derivada de *Thermoascus aurantiacus* descrita como la parte madura de la SEQ ID N.º: 3 de este documento con mutaciones seleccionadas del grupo de:

- 35 - A27K+D79L+ Y82F+S87G+D104P+A112P+A126V+D142L;
- D79L+S87P+A112P+D142L; y
- D79L+S87P+D142L.

40 [0098] En otra forma de realización preferida, la proteasa se deriva de una cepa de *Pyrococcus furiosus* mostrada en la SEQ ID N.º: 13 de este documento con un valor de termoestabilidad superior al 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C.

45 [0099] En otra forma de realización, la proteasa es una descrita en la SEQ ID N.º: 13 de este documento o una proteasa con al menos el 80 % de identidad, tal como al menos el 85 %, tal como al menos el 90 %, tal como al menos el 95 %, tal como al menos el 96 %, tal como al menos el 97 %, tal como al menos el 98 %, tal como al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID N.º: 13 de este documento. La proteasa de *Pyrococcus furiosus* se puede comprar de Takara Shuzo Co. Ltd, Japón.

50 [0100] La proteasa de *Pyrococcus furiosus* es una proteasa termoestable. Se descubrió que la proteasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu S) del producto comercial tiene una termoestabilidad del 110 % (80 °C/70 °C) y 103 % (90 °C/70 °C) a pH 4,5 determinada como se describe en el ejemplo 2 de este documento.

55 [0101] Se debe entender que estas proteasas son solo ejemplos. Cualquier proteasa descrita anteriormente en el apartado anterior "Proteasa presente y/o adicionada durante la licuefacción" se puede utilizar como el componente de proteasa en una composición de la invención.

[0102] Una composición de la invención puede comprender adicionalmente de manera opcional 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 el 30 %, preferiblemente al menos el 35 %.

60 [0103] En una forma de realización preferida, la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una glucoamilasa con una actividad relativa de al menos el 80 %, preferiblemente al menos el 85 %, preferiblemente al menos el 90 % a pH 4,5.

[0104] En una forma de realización preferida, la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una glucoamilasa con una estabilidad de pH a pH 4,5 de al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 100 %.

5 [0105] La determinación de la estabilidad térmica y la estabilidad de pH se describe en el ejemplo 4.

[0106] En una forma de realización específica, la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una glucoamilasa, preferiblemente derivada a partir de una cepa del género *Penicillium*, especialmente una cepa de *Penicillium oxalicum* descrita en PCT/CN10/071753 publicada como WO 2011/127802. La glucoamilasa también puede ser glucoamilasa con al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, más preferiblemente al menos el 92 %, aún más preferiblemente al menos el 93 %, de la forma más preferible al menos el 94 %, e incluso de la forma más preferible al menos el 95 %, tal como incluso al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % de identidad con el polipéptido maduro mostrado en la SEQ ID N.º: 2 en PCT/CN10/071753 publicada como WO 2011/127802.

[0107] En una forma de realización preferida, la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una variante 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 las SEQ ID N.º: 9 y 14 de este documento, con una sustitución K79V (utilizando la secuencia madura mostrada en la SEQ ID N.º: 14 para la numeración). La variante de glucoamilasa K79V tiene sensibilidad reducida a la degradación de proteasas con respecto a la progenitora como se describe en la solicitud copendiente de EE.UU. N.º 61/531,189.

[0108] Una composición de la invención puede comprender además una pululanasa. En una forma de realización preferida, la pululanasa incluye un dominio X47 como se describe en US 61/289,040 publicada como WO 2011/087836.

[0109] Específicamente, la pululanasa se puede derivar a partir de una cepa del género *Thermococcus*, que incluye *Thermococcus litoralis* y *Thermococcus hydrothermalis* o un híbrido de los mismos.

[0110] 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 US 61/289,040 publicada como WO 2011/087836 o mostrada en la SEQ ID N.º: 12 de este documento.

[0111] En una forma de realización, la proporción de proteína enzimática (función del peso) entre los componentes en una composición de la invención puede ser:

Alfa-amilasa: glucoamilasa: proteasa: 0,1-10: 0,5-50: 0,1-7, tal como 0,5-3: 1-30: 0,5-2, tal como 1-2: 5-20: 0,5-2.

Materiales y métodos

Materiales:

45 [0112]

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

50 Alfa-amilasa 1093: alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones I181\*+G182\*+N193F+E129V+K177L+R179E truncada a 491 aminoácidos (SEQ ID N.º: 1)

Alfa-amilasa 1407: 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)

55 Alfa-amilasa 1236: alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones I181\*+G182\*+N193F+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S truncada a 491 aminoácidos (SEQ ID N.º: 1)

Proteasa 136: metaloproteasa derivada de *Thermoascus aurantiacus* CGMCC n° 0670 descrita como aminoácidos 1-177 en la SEQ ID N.º: 3 de este documento y aminoácidos 1-177 en la SEQ ID N.º: 2 en WO 2003/048353 con las mutaciones siguientes:

D79L+Y82F+S87P+A112P+A126V+D142L

65 Proteasa 196: metaloproteasa derivada de *Thermoascus aurantiacus* CGMCC n° 0670 descrita como aminoácidos 1-177 en la SEQ ID N.º: 3 de este documento y aminoácidos 1-177 en la SEQ ID N.º: 2 en WO 2003/048353 con las mutaciones siguientes:



A27K+D79L+Y82F+S87G+D104P+A112P+A126V+D142L.

Proteasa 077: metaloproteasa derivada de *Thermoascus aurantiacus* CGMCC nº 0670 descrita como aminoácidos 1-177 en la SEQ ID N.º: 3 de este documento y aminoácidos 1-177 en la SEQ ID N.º: 2 en WO 2003/048353 con las mutaciones siguientes: A27K+D79L+S87P+A112P+D142L.

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

Glucoamilasa PQ: parte madura de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* descrita como la SEQ ID N.º: 2 en PCT/CN10/071753 publicada como WO 2011/127802 y mostrada en las SEQ ID N.º: 9 y 14 de este documento.

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

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

Glucoamilasa BL2: mezcla que comprende glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* descrita en WO 99/28448, glucoamilasa de *Trametes cingulata* descrita en WO 06/69289, y alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD descrito como V039 en la tabla 5 en WO 2006/069290 como actividades secundarias (proporción de aproximadamente 65:15:1)

Sustrato en el ejemplo 9: maíz molido de Corn LP, Iowa, EE.UU. (84,19 % de DS) y agua de proceso (6,27 % de DS).

Pululanasa TH: pululanasa de *Thermococcus hydrothermalis* mostrada en la SEQ ID N.º: 11 de este documento.

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

## Métodos

[0113] **Identidad**: la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad".

[0114] Para los 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 secuencias de polipéptidos, al igual que secuencias de nucleótidos. La matriz de puntuación por defecto BLOSUM50 se usa para alineamientos de polipéptidos, y la matriz de identidad predeterminada se usa para alineamientos de nucleótidos. La penalización para el primer residuo de un espacio es -12 para polipéptidos y -16 para nucleótidos. Las penalizaciones para otros residuos de un espacio son -2 para polipéptidos, y -4 para nucleótidos.

[0115] "Align" forma parte de la versión del paquete FASTA versión v20u6 (véase Pearson y Lipman, 1988, "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448, y Pearson, 1990, "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA", Methods in Enzymology 183:63-98). Los alineamientos de proteínas de FASTA usan el algoritmo de Smith-Waterman sin limitación en cuanto al tamaño de espacio (véase, "Smith-Waterman algorithm" Smith y Waterman, 1981, J. Mol. Biol. 147:195-197).

Ensayos de proteasa

### Ensayo de AZCL-caseína

[0116] Una solución de 0,2 % del sustrato azul de AZCL-caseína se suspende en tampón Borax/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> de pH 9 al tiempo que se agita. La solución se distribuye al tiempo que se agita a placas de microtitulación (100 microL a cada pocillo), se adicionan 30 microL de muestra enzimática y las placas se incuban en un termomezclador de Eppendorf durante 30 minutos a 45 °C y 600 r.p.m. La muestra de enzima desnaturalizada (ebullición a 100 °C durante 20 min) se usa como un blanco. Tras la incubación, la reacción se detiene transfiriendo la placa de microtitulación a hielo y la solución coloreada se separa del sólido mediante centrifugación a 3000 r.p.m. 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

[0117] 50 microL de muestra que contiene proteasa se adicionan a una placa de microtitulación y se comienza el ensayo adicionando 100 microL 1mM de sustrato pNA (5 mg disueltos en 100 microL de DMSO y diluido adicionalmente a 10 mL con tampón Borax/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> de pH 9,0). El aumento en OD<sub>405</sub> a temperatura ambiente se monitorea como una medida de la actividad de proteasa.

Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0118] La actividad de glucoamilasa se puede medir en unidades de glucoamilasa (AGU).

5 [0119] 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 de 37 °C, pH 4,3, sustrato: maltosa 23,2 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

10 [0120] Un sistema autoanalizador se puede utilizar. Se adiciona 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 determina usando un fotómetro a 340 nm como una medida de la concentración de glucosa original.

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

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

15 [0121] Una carpeta (EB-SM-0131.02/01) que describe este método analítico con más detalle está disponible bajo petición a Novozymes A/S, Dinamarca, carpeta que se incluye en el presente documento por referencia.

Actividad de alfa-amilasa (KNU)

20 [0122] La actividad de alfa-amilasa se puede determinar utilizando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición del almidón de patata modificado por la enzima, y a la reacción le sigue la mezcla de muestras de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo. Inicialmente, se forma un color azul negruzco, pero durante la descomposición del almidón el color azul se hace más débil y se vuelve gradualmente un marrón rojizo, que se compara con un estándar de vidrio coloreado.

25 [0123] Una Unidad Kilo Novo (KNU) de alfa-amilasa se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (es decir, a 37 °C +/- 0,05, 0,0003 M de Ca<sup>2+</sup>; y pH 5,6) dextriniza 5260 mg de sustancia seca de almidón Merck Amylum soluble.

30 [0124] Una carpeta EB-SM-0009.02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible bajo petición a Novozymes A/S, Dinamarca, carpeta que se incluye en el presente documento por referencia.

Determinación de actividad de pululanasa (NPUN)

35 [0125] La actividad de endopululanasa 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.

40 [0126] 1 mL de muestra o estándar diluido se incuba a 40 °C durante 2 minutos. 0,5 ML 2 % de pululano rojo, 0,5 M de KCl, 50 mM de ácido cítrico, pH 5 se adicionan y se mezclan. Los tubos se incuban a 40 °C durante 20 minutos y se detienen adicionando 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 4000 r.p.m. OD de los sobrenadantes se mide entones a 510 nm y la actividad se calcula utilizando una curva estándar.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1**

Estabilidad de variantes de alfa-amilasa

- 5 [0127] La estabilidad de una alfa-amilasa de referencia (alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones I181\*+G182\*+N193F truncada a 491 aminoácidos (SEQ ID N.º: 1)) y variantes de alfa-amilasa de la misma se determinó incubando la alfa-amilasa de referencia y las variantes a pH 4,5 y 5,5 y temperaturas de 75 °C y 85 °C con 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub> seguido de determinación de actividad residual utilizando el sustrato de EnzChek® (equipo de ensayo de amilasa EnzChek® Ultra, E33651, Molecular Probes).
- 10 [0128] Las muestras de enzima purificadas se diluyeron a concentraciones de trabajo de 0,5 y 1 o 5 y 10 ppm (microgramos/ml) en tampón de dilución enzimática (10 mM de acetato, 0,01 % de Triton X100, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 5,0). Veinte microlitros de muestra enzimática se transfirieron a una MTP de PCR de 48 pocillos y 180 microlitros de tampón de estabilidad (150 mM de acetato, 150 mM de MES, 0,01 % de triton X100, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 4,5 o 5,5) se adicionaron a cada pocillo y se mezclaron. El ensayo se realizó utilizando dos concentraciones enzimáticas en duplicados. Antes de la incubación a 75 °C u 85 °C, 20 microlitros se retiraron y se almacenaron en hielo como muestras de control. La incubación se realizó en una máquina PCR a 75 °C y 85 °C. Después de la incubación, las muestras se diluyeron a 15 ng/mL en el tampón de actividad residual (100 mM de acetato, 0,01 % de Triton X100, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub>, pH 5,5) y 25 microlitros de enzima diluida se transfirieron a negro 384-MTP. La actividad residual se determinó utilizando el sustrato EnzChek adicionando 25 microlitros de 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 (el lector de fluorescencia es Polarstar, BMG). La actividad residual se normalizó a las muestras de control para cada configuración.
- 20 [0129] Asumiendo una desintegración logarítmica, el tiempo de vida media ( $T_{1/2}$  (min)) se calculó utilizando la ecuación:  $T_{1/2}$  (min) =  $T(\text{min}) \cdot \text{LN}(0,5) / \text{LN}(\%RA/100)$ , donde T es tiempo de incubación de ensayo en minutos, y %RA es % de actividad residual determinado en el ensayo.
- 25 [0130] Usando esta configuración de ensayo, el tiempo de vida media se determinó para la alfa-amilasa de referencia y la variante de la misma como se muestra en la tabla 1.
- 30

Tabla 1

Mutaciones	T $\frac{1}{2}$ (min) (pH 4,5, 75 °C, 0,12 mM de CaCl <sub>2</sub> )	T $\frac{1}{2}$ (min) (pH 4,5, 85 °C, 0,12 mM de CaCl <sub>2</sub> )	T $\frac{1}{2}$ (min) (pH 5,5, 85 °C, 0,12 mM de CaCl <sub>2</sub> )
Alfa-amilasa A de referencia	21	4	111
Alfa-amilasa A de referencia con la sustitución V59A	32	6	301
Alfa-amilasa A de referencia con la sustitución V59E	28	5	230
Alfa-amilasa A de referencia con la sustitución V59I	28	5	210
Alfa-amilasa A de referencia con la sustitución V59Q	30	6	250
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A+Q89R+G112D+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S	149	22	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S	>180	28	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+D269E+D281N	112	16	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+I270L	168	21	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+H274K	>180	24	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+Y276F	91	15	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A+E129V+R157Y+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S	141	41	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+	>180	62	ND

N224L+S242Q+Q254S			
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S	>180	49	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+H274K	>180	53	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+Y276F	>180	57	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+D281N	>180	37	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+M284T	>180	51	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+G416V	>180	45	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S	143	21	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+M284T	>180	22	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones A91L+M96I+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S	>180	38	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V+K177L+R179E	57	11	402
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S	174	44	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+Y276F+L427M	>180	49	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+M284T	>180	49	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+N376*+I377*	177	36	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S	94	13	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+M284T	129	24	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V+K177L+R179E+S242Q	148	30	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V+K177L+R179V	78	9	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V+K177L+R179V+K220P+N224L+S242Q+Q254S	178	31	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones K220P+N224L+S242Q+Q254S	66	17	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones K220P+N224L+Q254S	30	6	159
Alfa-amilasa A de referencia con la sustitución M284T	35	7	278
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones M284V	59	13	ND
ND no determinado			

[0131] Los resultados demuestran que las variantes de alfa-amilasa tienen una vida media y una estabilidad significativamente superiores que la alfa-amilasa de referencia.

## 5 Ejemplo 2

Preparación de variantes de proteasa y prueba de termoestabilidad

[0132] Los productos químicos usados eran productos comerciales de al menos calidad reactiva.

10

Cepas y plásmidos:

[0133] *E. coli* DH12S (disponible de Gibco BRL) se usó para el rescate de plásmidos 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 WO 01/92502, donde se ha insertado el gen de proteasa de *Thermoascus aurantiacus* M35 (WO 03/048353).

[0134] Células competentes de *Saccharomyces cerevisiae* YNG318: 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): 9720-9727 (1997).

## 10 Medios y sustratos

[0135]

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 % de glucosa de (es decir, una concentración final de 2 % = 2 g/100 mL)) 100 mL/L, 5 % de treonina 4 mL/L, 1 % de triptófano 10 ml/l, 20 % de ácidos de casamino 25 ml/l, 10 X solución basal 100 ml/l. La solución se esteriliza utilizando un filtro de un tamaño de poros de 0,20 micrómetros. Agar (2 %) y H<sub>2</sub>O (aprox. 761 ML) se someten juntos a autoclave, y la solución de SC-glucosa esterilizada separadamente se adiciona a la solución de agar.

YPD: bacto-peptona 20 g/l, extracto de levadura 10 g/L, 20 % de glucosa 100 mL/L.

YPD+Zn: YPD+0,25 mM ZnSO<sub>4</sub>.

Solución PEG/LiAc: 40 % PEG4000 50 ml, 5 M acetato de litio 1 mL.

## 25 Placa de microtitulación de zeína de 96 pocillos:

[0136] Cada pocillo contiene 200 microL de 0,05-0,1 % de zeína (Sigma), 0,25 mM de ZnSO<sub>4</sub> y 1 % de agar en 20 mM de tampón de acetato sódico, pH 4,5.

## 30 Manipulaciones de ADN

[0137] A menos que se indique 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 e hijos, 1995; Harwood, C. R. y Cutting, S. M. (Eds.).

### Transformación de levadura

[0138] 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 PCR se mezclan. La mezcla de ADN, 100 microL de células competentes YNG318 y 10 microL de ADN portador YEAST MAKER (Clontech) se adicionan a un tubo de polipropileno de 12 mL (Falcon 2059). Adicionar 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 de Eppendorf y centrifugar durante 5 s. Eliminar el sobrenadante y resolver en 3 mL de YPD. Incubar la suspensión celular durante 45 min a 200 r.p.m. a 30 °C. Verter la suspensión a las placas de SC-glucosa e incubar 30 °C durante 3 días para cultivar colonias. ADN total de levadura se extraen mediante el equipo Zymoprep Yeast Plasmid Miniprep (ZYMO research).

### Secuenciación del ADN

[0139] La transformación de *E. coli* para secuenciación del ADN se efectuó por electroporación (BIO-RAD Gene Pulser).

Plásmidos de ADN se prepararon por el método alcalino (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor) o con el equipo Qiagen® Plasmid. Los fragmentos de ADN se recuperaron a partir del gel de agarosa mediante el equipo de extracción de gel de Qiagen. Se realizó PCR utilizando un motor de ADN PTC-200. El analizador genético ABI PRISM™ 310 se usó para la determinación de todas las secuencias de ADN.

### Construcción de vector de expresión de proteasa

[0140] El gen de proteasa M35 de *Thermoascus* se amplificó con el par de cebadores Prot F (SEQ ID N.º: 4) y Prot R (SEQ ID N.º: 5). Los fragmentos de PCR resultantes se introdujeron en *S. cerevisiae* YNG318 junto con el vector pJC039 (descrito en WO 2001/92502) digeridos con enzimas de restricción para eliminar el gen de cutinasa de *Humicola insolens*.

[0141] El plásmido en los clones de levadura en las placas de SC-glucosa se recuperó para confirmar la secuencia interna y se denominó como pJTP001.

## Construcción de biblioteca de levadura y variantes dirigidas al sitio

- 5 [0142] La biblioteca de levadura y las variantes dirigidas al sitio se construyeron con el método de PCR de SOE (empalme por superposición de extensión, 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

- 10 [0143] Los cebadores AM34 (SEQ ID N.º: 6) y AM35 (SEQ ID N.º:7) se usaron para hacer fragmentos de ADN que contienen cualquier fragmento mutado por el método SOE junto con cebadores degenerados (AM34 + cebador inverso y AM35 + cebador directo) o solo para amplificar un gen de proteasa entero (AM34 + AM35).

Sistema de reacción por PCR:	Condiciones:
48,5 microL de H <sub>2</sub> O	1 94 °C 2 min
2 esferas de PCR listas para el uso de puRe Taq (Amersham Biosciences)	2 94 °C 30 s
0,5 microL X 2 100 pmol/microL de cebadores	3 55 °C 30 s
0,5 microL de modelo de ADN	4 72 °C 90 s
	2-4 25 ciclos
	5 72 °C 10 min

- 15 [0144] Se recuperaron fragmentos de ADN de gel de agarosa mediante el equipo de extracción de gel de Qiagen. Los fragmentos purificados resultantes se mezclaron con la digestión del vector. La solución mezclada se introdujo en *Saccharomyces cerevisiae* para construir bibliotecas o variantes dirigidas al sitio por recombinación *in vivo*.

## 20 Ensayo de actividad relativa

- 25 [0145] Se inocularon clones de levadura en SC-glucosa en un pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos con medio YPD+Zn y se cultivaron a 28 °C durante 3 días. Los sobrenadantes del cultivo se aplicaron a una placa de microtitulación de 96 pocillos de zeína y se incubaron a al menos 2 temperaturas (ex., 70 °C y 80 °C) durante más de 4 horas o durante toda la noche. La turbidez de la zeína en la placa se midió como A630 y la actividad relativa (temperaturas superiores/inferiores) se determinó como un indicador de mejora de la termoactividad. Los clones con actividad relativa más alta que la variante progenitora se seleccionaron y la secuencia se determinó.

## 30 Ensayo de actividad restante

- 35 [0146] Los clones de levadura en SC-glucosa se inocularon a una placa de microtitulación de 96 pocillos y se cultivaron a 28 °C durante 3 días. La actividad de proteasa se midió 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 u 84 °C con 4 °C como una referencia) para determinar la actividad restante. Los clones con actividad restante más alta que la variante progenitora se seleccionaron y la secuencia se determinó.

## 40 Ensayo de azocaseína

- [0147] 20 microL de muestras se mezclaron 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, que contiene 0,01 % de triton-100 y 0,25 mM de ZnSO<sub>4</sub>) y se incubaron durante 4 horas o más.

- 45 [0148] Después de adicionar 20 microL/pocillo de solución de ácido tricloroacético (ATC) 100 %, la placa se centrifugó y 100 microL de sobrenadantes se sacaron con pipeta para medir A440.

Expresión de variantes de proteasa en *Aspergillus oryzae*

- 50 [0149] 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 a 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 las variantes de proteasa se transformaron en *Aspergillus* tal y como se describe en Lassen et al., 2001, Appl. Environ. Microbiol. 67: 4701-4707.
- 55 Para cada uno de los constructos, 10-20 cepas se aislaron, purificaron y cultivaron en matraces de agitación.

Purificación de variantes expresadas

[0150]

- 5 1. Ajustar el pH de los 0,22 µm de muestra de fermentación filtrada a 4,0.
2. Poner la muestra en un baño de hielo con agitación magnética. Adicionar (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en pequeñas partes alícuotas (correspondientes a aprox. 2,0-2,2 M de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sin tomar en cuenta el aumento de volumen al adicionar el compuesto).
- 10 3. Después de la adición final de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, incubar la muestra en el baño de hielo con agitación magnética suave durante 45 min.
4. Centrifugación: centrifugador refrigerado de alta velocidad Hitachi himac CR20G equipado con cabeza de rotor R20A2, 5 °C, 20.000 r.p.m., 30 min.
5. Disolver el precipitado formado en 200 mL de 50 mM Na-acetato pH 4,0.
- 15 6. Filtrar la muestra por succión de vacío utilizando una membrana de 0,22 micro m PES PLUS (IWAKI).
7. Desalar/cambiar el tampón de la muestra a 50 mM de Na-acetato pH 4,0 usando ultrafiltración (Vivacell 250v de Vivascience equipada 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 menos de 5 mS/cm.
- 20 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 de tampón de unión (50 mM de Na-acetato pH 4,0), y eluir la muestra utilizando un gradiente lineal, 0-100 % de tampón de elución (50 mM de 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 (*cf.* más adelante) seguido de SDS-PAGE estándar (condiciones de reducción) en fracciones seleccionadas. Las fracciones se agrupan basándose en el ensayo de endoproteasa y SDS-PAGE.

Ensayo de endoproteasa

[0151]

- 30 1. Pastilla de Protazyme OL/5 ml de 250 mM de Na-acetato pH 5,0 se disuelve por agitación magnética (sustrato: pastilla de Protazyme Ak de endoproteasa de Megazyme - cat. # PRAK 11/08).
2. Con agitación, 250 microL de solución de sustrato se transfieren a un tubo de Eppendorf de 1,5 mL.
- 35 3. 25 microL de muestra se adicionan a cada tubo (el blanco es tampón de muestra).
4. Los tubos se incuban en un termomezclador con agitación (1000 r.p.m.) a 50 °C durante 15 minutos.
5. 250 microL de 1 M de NaOH se adicionan 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 transfieren a una MTP, y la absorbancia a 590 nm se registra.

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

Variante	Sustitución (sustituciones) y/o deleción (delecciones)	Actividad restante	
		80 °C	84 °C
JTP082	ΔS5/D79L/S87P/A112P/D142L		53 %
JTP091	D79L/S87P/A112P/T124V/D142L	43 %	
JTP092	ΔS5/N26R/D79L/S87P/A112P/D142L		60 %
JTP095	N26R/T46R/D79L/S87P/A112P/D142L		62 %
JTP096	T46R/D79L/S87P/T116V/D142L		67 %
JTP099	D79L/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 %	

40

Tabla 3 Actividad relativa de variantes de proteasa. La numeración de la sustitución (las sustituciones) comienza a partir del N-terminal del péptido maduro en los aminoácidos 1 a 177 de la SEQ ID N.º: 3.

Variante	Sustituciones	Actividad relativa	
		80 °C/70 °C	85 °C/70 °C
JTP050	D79L S87P A112P D142L	23 %	9 %
JTP134	D79LY82F S87P A112P D142L	40 %	
JTP135	S38T D79LS87P A112P A126V D142L	62 %	
JTP136	D79LY82F S87P A112P A126V D142L	59 %	
JTP137	A27K D79L S87P A112P A126V D142L	54 %	
JTP145	S49P D79L S87P A112P D142L	59 %	
JTP146	S50P D79L S87P A112P D142L	63 %	

JTP148	D79L S87P D104P A112P D142L	64 %	
JTP161	D79L Y82F S87G A112P D142L	30 %	12 %
JTP180	S70V D79L Y82F S87G Y97W A112P D142L	52 %	
JTP181	D79L Y82F S87G Y97W D104P A112P D142L	45 %	
JTP187	S70V D79L Y82F S87G A112P D142L	45 %	
JTP188	D79L Y82F S87G D104P A112P D142L	43 %	
JTP189	D79L Y82F S87G A112P A126V D142L	46 %	
JTP193	Y82F S87G S70V D79L D104P A112P D142L		15 %
JTP194	Y82F S87G D79L D104P A112P A126V D142L		22 %
JTP196	A27K D79L Y82F S87G D104P A112P A126V D142L		18 %

Tabla 4 Actividad relativa de variantes de proteasa. La numeración de la sustitución (las sustituciones) comienza a partir del N-terminal del péptido maduro en los aminoácidos 1 a 177 de la SEQ ID N.º: 3.

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

### Ejemplo 3

#### 5 Perfil de temperatura de variantes de proteasa seleccionadas utilizando enzimas purificadas

[0152] Las variantes de proteasa seleccionadas con una buena termoestabilidad se purificaron y las enzimas purificadas se usaron en un ensayo de zeína-BCA como se describe a continuación. La actividad de proteasa restante se determinó a 60 °C tras la incubación de la enzima a temperaturas elevadas como se indica durante 60 min.

#### Ensayo de zeína-BCA:

[0153] El ensayo de zeína-BCA se realizó para detectar cuantificación de proteínas solubles liberadas de zeína por proteasas variantes a varias temperaturas.

Protocolo:

[0154]

- 1) Mezclar 10 microL de 10 micro g/mL de soluciones enzimáticas y 100 microL de 0,025 % de solución de zeína en una placa de microtitulación (MTP).
- 2) Incubar a varias temperaturas durante 60 min.
- 3) Adicionar 10 microL de solución de ácido tricloroacético (ATC) 100 %.
- 4) Centrifugar la MTP a 3500 r.p.m. durante 5 min.
- 5) Eliminar 15 microL a una nueva MTP que contiene 100 microL de solución de ensayo BCA (Cat. #23225 de Pierce, equipo de ensayo de proteína BCA).
- 6) Incubar durante 30 min. a 60 °C.
- 7) Medir A562.

[0155] Los resultados se muestran en la tabla 5. Todas las variantes de proteasa evaluadas mostraron una termoestabilidad mejorada en comparación con la proteasa de tipo salvaje (WT).

Tabla 5 Ensayo de zeína-BCA

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



JTP196 (A27K+D79L+Y82F+S87G+D104P+ A112P+A126V+D142L)	87	99	103	106	117	90	38
---	----	----	-----	-----	-----	----	----

**Ejemplo 4**

Caracterización de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*

5 [0156] La glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se describe en WO 2011/127802 y en la SEQ ID N.º: 9 de este documento.

10 [0157] **Sustrato.** Sustrato: 1 % de almidón soluble (Sigma S-9765) en el tampón de reacción de agua desionizada: 0,1 M de tampón acetato a pH 5,3

[0158] Equipo de determinación de concentración de glucosa: equipo de ensayo de glucosa Wako (LabAssay Glucose, WAKO, Cat. # 298-65701).

15 [0159] **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 adicionaron a un volumen final de 100 microL seguido de incubación a 37 °C durante 15 min.

20 [0160] La concentración de glucosa se determinó mediante equipos Wako.

[0161] Todo el trabajo se realizó en paralelo.

25 [0162] Temperatura óptima. Para valorar la temperatura óptima de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*, el ensayo de "condición de reacción" anteriormente descrito se realizó a 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90 y 95 °C. Los resultados se muestran en la tabla 6.

Tabla 6. Temperatura óptima

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

30 [0163] A partir de los resultados, se puede observar que la temperatura óptima para la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en las condiciones dadas es de entre 50 °C y 70 °C y la glucoamilasa mantiene más del 80 % de la actividad a 95 °C.

35 [0164] Estabilidad térmica. Para valorar 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 adicionaron a la solución y el ensayo se realizó como se ha descrito anteriormente.

[0165] Los resultados se muestran en la tabla 7.

40 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

[0166] A partir de los resultados se puede observar que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* es estable hasta 70 °C después de la preincubación durante 15 min en que mantiene más del 80 % de actividad.

45 [0167] **pH óptimo.** Para valorar 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 acetato descrito en el ensayo de condición de reacción del tampón, se usó el siguiente tampón 100 mM de ácido succínico, HEPES, CHES, CAPSO, 1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 150 mM de KCl, 0,01 % de Triton 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 u 11,0 con HCl o NaOH.

50 [0168] 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

[0169] A partir de los resultados se puede observar que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en las condiciones dadas tiene la mayor actividad a pH 5,0. La glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* es activa en un amplio rango de pH en el que mantiene más del 50 % de actividad de pH 2 a 7.

5 [0170] Estabilidad de pH. Para valorar la estabilidad térmica de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*, el ensayo de condición de reacción se modificó en que la solución enzimática (50 micro g/mL) se preincubó durante 20 horas en tampones con pH 2,0, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 y 11,0 utilizando los tampones descritos en pH óptimo. Después de la preincubación, 20 microL de almidón soluble a un volumen final de 100 microL se adicionaron a la solución y el ensayo se realizó como se ha descrito anteriormente.

10

[0171] 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

15 [0172] A partir de los resultados se puede observar que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*, es estable de pH 3 a pH 7 después de la preincubación durante 20 horas y reduce su actividad a pH 8.

### Ejemplo 5

#### 20 Proceso de producción de etanol mejorado

[0173] Preparación de triturado: triturados de maíz se prepararon mediante licuefacción en un baño de agua a 85 °C durante 2 horas. El contenido de sólidos secos (DS) fue de alrededor del 30-33 % y la proporción de agua de proceso alrededor del 30 %. Preparación de triturado: suspensiones de maíz se prepararon para licuefacción pesando las cantidades específicas de maíz molido, agua de proceso, y agua del grifo en botellas de Nalgene. Las suspensiones se ajustaron a o bien pH 5,80 (Control) utilizando 50 % p/p de NaOH o bien 4,50 (estudio A, B) o bien 4,80 (Estudio C, D, E, F) utilizando 40 % v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Los triturados de control usando alfa-amilasa A se hicieron a pH 5,8. Se adicionaron partes alícuotas de soluciones madre enzimáticas. Las botellas se taparon apretadamente y se colocaron en el baño de agua. Las suspensiones se agitaron enérgicamente una vez cada 5 minutos durante los primeros 30 minutos y luego una vez cada 30 minutos a partir de entonces durante un total de 2 horas. Los triturados se enfriaron inmediatamente en un baño de hielo. Urea y penicilina se adicionaron entonces a cada triturado para alcanzar concentraciones de 500 y 3 ppm, respectivamente.

35 [0174] Configuración de fermentación: los triturados se ajustaron a pH 5,0 utilizando 40 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o 50 % de NaOH. Aproximadamente 5 g de cada triturado se transfirieron a tubos centrifugadores Falcon de plástico de 15 mL prepesados para la fermentación. Típicamente, se prepararon cinco fermentaciones repetidas para cada tratamiento. Un pequeño agujero se perforó en la tapa de cada tubo para permitir la liberación de CO<sub>2</sub> durante la fermentación. Después de la transferencia del triturado, todos los tubos se volvieron a pesar para obtener sus pesos de muestra inicial. En cada tubo se adicionaron entonces 100 microL de levadura RED STAR ETHANOL RED rehidratada (rehidratada pesando 5,5 g de levadura seca en un matraz de Erlenmeyer de 150 mL, adicionando 100 mL de agua del grifo y agitando en un baño de agua a 32 °C durante 30 minutos), una parte alícuota de glucoamilasa BL diluida (diluida en agua desionizada) se necesita para alcanzar concentraciones de inicio de 0,50 AGU/g de DS. Agua desionizada se adicionó a cada tubo de manera que el volumen total de líquido añadido a cada tubo con respecto al peso de la muestra fuera el mismo. Todos los tubos se volvieron a pesar entonces y luego se colocaron en un conjunto de baño de agua a 32 °C. Se permitió típicamente que la fermentación progresara durante 54 horas (si no se declara otra cosa). Los tubos se agitaron enérgicamente en vórtex después de aproximadamente 7 horas y luego se agitaron en vórtex y se volvieron a pesar dos veces al día durante el tiempo de fermentación restante. Los gramos de etanol producidos por gramo de sólidos secos en cada tubo se calcularon a partir de los datos de pérdida de peso según la ecuación siguiente:

$$g \text{ etanol } / g \text{ DS} = \frac{g \text{ CO}_2 \text{ pérdida de peso} \times \frac{1 \text{ mol CO}_2}{44,0098 \text{ g CO}_2} \times \frac{1 \text{ mol etanol}}{1 \text{ mol CO}_2} \times \frac{46,094 \text{ g etanol}}{1 \text{ mol etanol}}}{g \text{ maíz en tubo} \times \% \text{ DS de maíz}}$$

50 [0175] Típicamente, 4 tubos repetidos para cada tratamiento se sacaron después de 54 horas de fermentación para análisis de HPLC. Las muestras sacadas se trataron con 50 microL de 40 % de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para parar la fermentación y se agitaron en vórtex minuciosamente. Las muestras se centrifugaron luego a 1460xg durante 10 minutos y luego se filtraron en los viales de HPLC a través de filtros de jeringa de 0,45 micro m. El análisis de HPLC se condujo finalmente en las muestras para cuantificar las cantidades de etanol.

55

#### Resultados

[0176] Una visión de conjunto de los resultados se proporciona en la tabla 10.

60

Tabla 10: Las dosis enzimáticas se enumeran en paréntesis para cada una y se expresan como micro g EP/g de DS.

Estudio	pH	Enzimas en la etapa de licuefacción i).	Glucoamilasa en SSF	HPLC EtOH vs alfa-amilasa A de referencia (Control)
A	4,5	Alfa-amilasa 1093 (1,4) Proteasa 077 (2) Pululanasa TH (2)	Glucoamilasa BL	3,0 %
B	4,5	Alfa-amilasa 1093 (2,75) Proteasa 077 (5) Pululanasa TH (2)	Glucoamilasa BL	1,6 %
C	4,8	Alfa-amilasa 1236 (2) Proteasa 136 (2) Glucoamilasa PO (15)	Glucoamilasa BL	4,7 %
D	4,8	Alfa-amilasa 1093 (2) Proteasa 180 (2,1) Glucoamilasa PO (10)	Glucoamilasa BL	4,2 % (48 h)
E	4,8	Alfa-amilasa 1236 (2) Proteasa 188 (2) Glucoamilasa PO (15)	Glucoamilasa BL	7,1 %
F	4,8	Alfa-amilasa 1407 (1) Proteasa 196 (2) Glucoamilasa PO (2)	Glucoamilasa BL	4,8 % (a 72 h)

\*medido a 54 horas a menos que se indique de otro modo.

**Ejemplo 6**

5

Licuefacción de maíz entero y proceso de SSF que utiliza la variante de AMG de *P. oxalicum* (PE001)

10

[0177] La variante de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* (Glucoamilasa PO), Glucoamilasa PE001, que muestra sensibilidad reducida a la degradación de proteasa, se evaluó tanto en la licuefacción de maíz entero como en la sacarificación de almidón (mostrada en el apartado siguiente). Para las licuefacciones de maíz entero, la enzima de glucoamilasa PE001 se adicionó en dosis diferentes con una variante de amilasa de pH bajo, alfa-amilasa 1407. En algunas licuefacciones, la variante de glucoamilasa PE001 se evaluó tanto con la amilasa alfa-amilasa 1407 de pH bajo como con la proteasa termoestable proteasa 196. En todos los experimentos, las licuefacciones se hicieron utilizando el sistema automatizado llamado "Lab-O-Mat". Este instrumento controla la temperatura y proporciona mezcla constante. Las otras condiciones experimentales fueron: el pH era 4,8 (para las licuefacciones que contienen la amilasa de bajo pH alfa-amilasa 1407) o 5,8 (para el control de alfa-amilasa A), 32 % de sólidos secos, 85 °C, 2 horas de tiempo total. Los esquemas de dosificación enzimática se muestran en la tabla 11. Los triturados licuados se sacarificaron y se fermentaron usando glucoamilasa BL2 (a una dosis de 0,5 AGU/gramo de sólidos secos durante 54 horas a 32 °C).

20

Tabla 11. Esquema de dosificación enzimática para los tres experimentos de licuefacción de maíz entero hechos usando variante estable de corte de proteasa de glucoamilasa PO, es decir, glucoamilasa PE001.

<b>Alfa-amilasa (dosis)</b>	<b>Proteasa (dosis)</b>	<b>Glucoamilasa (dosis)</b>
Alfa-amilasa A (0,02 % p/p de maíz)	Ninguna	Ninguna
Alfa-amilasa 1407 (1,4 µg EP/g de DS)	Ninguna	Ninguna
Alfa-amilasa 1407 (1,4 µg EP/g de DS)	Ninguna	Glucoamilasa PO (P3HK) (10 µg EP/g de DS)
Alfa-amilasa 1407 (1,4 µg EP/g de DS)	Ninguna	Glucoamilasa PE001 (10 µg EP/g de DS)
Alfa-amilasa 1407 (1,4 µg EP/g de DS)	Proteasa 196 (1 µg EP/g de DS)	Glucoamilasa PO (P3HK) (10 µg EP/g de DS)
Alfa-amilasa 1407 (1,4 µg EP/g de DS)	Proteasa 196 (1 µg EP/g de DS)	Glucoamilasa PE001 (10 µg EP/g de DS)

25

[0178] Los títulos de etanol cuantificados por HPLC (en gramos por litro) se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Media de títulos de etanol y desviaciones estándar asociadas, en gramos por litro. La proteasa 196 es una proteasa de temperatura estable descrita en WO 2011/072191 y la alfa-amilasa 1407 es una amilasa de pH bajo descrita en WO 2011/082425.

Tratamiento	Etanol (media ± desviación estándar; gramos/litro)
Control de alfa-amilasa A	126,4 ± 0,3
Control de alfa-amilasa 1407 (variante de alfa-amilasa de pH bajo)	126,7 ± 0,3
Glucoamilasa PO (tipo salvaje) P3HK (10 µg EP/g de DS)	127,2 ± 0,4
Variante de glucoamilasa PE001 (10 µg EP/g de DS)	127,1 ± 0,5
Glucoamilasa PO (tipo salvaje) P3HK (10 µg EP/g de DS) + proteasa 196 (1 µg EP/g de DS)	127,6 ± 0,4
Variante de glucoamilasa PE001 (10 µg EP/g de DS) + proteasa 196 (1 µg EP/g de DS)	127,7 ± 0,2

5 **Ejemplo 7**

Termoestabilidad de proteasa Pfu

10 [0179] La termoestabilidad de la proteasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu S) adquirida de Takara Bio, (Japón) se evaluó usando los mismos métodos que en el ejemplo 2. Se observó que la termoestabilidad (actividad relativa) fue del 110 % a (80 °C/70 °C) y 103 % (90 °C/70 °C) a pH 4,5.

**Ejemplo 8**

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

[0180] El fin de este experimento era evaluar el rendimiento de aplicación de la proteasa Pfu derivada de *Pyrococcus furiosus* a pH 4,8 durante la licuefacción a 85 °C durante 2 horas.

20 Licuefacción (Labomat)

[0181] Cada licuefacción recibió maíz molido (84,19 % de DS), agua de proceso (6,27 % de DS), y agua del grifo con el objetivo de un peso total de 100 g a 32,50 % de sólidos secos (DS). El agua de proceso se mezcló a 30 % p/p del peso de la suspensión total. El pH de la suspensión inicial era aproximadamente de 5,2 y se ajustó a pH 4,8 con 40 % v/v de ácido sulfúrico antes de la licuefacción. Todas las enzimas se adicionaron según el diseño experimental enumerado en la tabla 13 a continuación. La licuefacción se produjo en un Labomat utilizando las condiciones siguientes: 5 °C/min. rampa, rampa de 17 minutos, tiempo de retención de 103 minutos, 40 r.p.m. durante toda la ejecución, 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 basándose en el protocolo enumerado en SSF.

Sacarificación y fermentación simultánea (SSF)

35 [0182] Cada triturado se ajustó a pH 5,0 con 50 % p/p de hidróxido sódico o 40 % v/v de ácido sulfúrico. Se aplicó penicilina a cada triturado a una concentración total de 3 ppm. Los tubos se prepararon con triturado con partes alícuotas de aproximadamente 4,5 g de triturado por 15 mL de tubos de ensayo preperforados para permitir la liberación de CO<sub>2</sub>. Los tubos de ensayo permanecieron, durante toda la noche, a 4 °C hasta la mañana siguiente.

40 [0183] Todos los tubos de ensayo de triturado se extrajeron del almacenamiento en frío y se calentaron a 32 °C en la cámara de incubación de entrada. Una vez calentada, la glucoamilasa BL2 se dosificó a cada tubo de triturado a 0,50 AGU/g de DS, se adicionó agua de modo que todos los tubos recibieran 120 µL de líquido y cada muestra de triturado recibió 100 µL de levadura rehidratada. La levadura rehidratada se preparó mezclando 5,5 g de RED STAR de Fermentis en 100 mL de agua del grifo a 32 °C durante al menos 15 minutos.

45 [0184] En la supervisión de la pérdida de peso de CO<sub>2</sub> a lo largo del tiempo, cada unidad de CO<sub>2</sub> generada y perdida se convierte en gramo de etanol producido por gramo de sólidos secos (g EtOH/g de DS) mediante la siguiente:

$$g \text{ etanol} / g \text{ DS} = \frac{g \text{ CO}_2 \text{ pérdida de peso} \times \frac{1 \text{ mol CO}_2}{44,0098 \text{ g CO}_2} \frac{1 \text{ mol etanol}}{1 \text{ mol CO}_2} \frac{46,094 \text{ g etanol}}{1 \text{ mol etanol}}}{g \text{ triturado en tubo \% DS de triturado}}$$

50

Análisis de HPLC

5 [0185] El muestreo de fermentación se produjo después de 54 horas de fermentación tomando 3 tubos por tratamiento. Cada muestra se desactivó con 50 µL de 40 % v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, agitando en vórtex, centrifugando a 1460×g durante 10 minutos, y filtrando a través de un filtro de Whatman PP de 0,45 µm. Muestras después de 54 horas se analizaron bajo HPLC sin dilución adicional. Las muestras se almacenaron a 4°C antes de y durante el análisis de HPLC.

Sistema de HPLC	Desgasificador serie 1100/1200 de Agilent con software Chem Station, bomba cuaternaria, automuestreador, compartimento de columna con calentador, detector de índice de refracción (RI)
Columna	Columna de exclusión de iones Bio-Rad HPX-87H 300 mm x 7,8 mm pieza# 125-0140 Cación H de cartucho de seguridad Bio-Rad pieza# 125-0129, soporte pieza# 125-0131
Método	0,005 M de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fase móvil Caudal: 0,6 ml/min Temperatura de columna: 65 °C Temperatura del detector RI: 55 °C

10 [0186] El método cuantificó analito(s) usando un estándar de calibración para etanol (% p/v). Una calibración de cuatro puntos que incluye el origen se usa para la cuantificación.

15 [0187] Donde fue aplicable, los datos se analizaron utilizando software JMP (Cary, NC) con Oneway de ANOVA de pares usando Tukey-Kramer HSD o Dunnett's. Las barras de error que indican el nivel de confianza del 95 % se establecieron multiplicando el error estándar del análisis Oneway de Anova por 1,96.

Tabla 13. Plano experimental.

Licuefacción a 85 °C (pH 4,8)					
Alfa-amilasa	Dosis µg/g de DS	Proteasa	Dosis µg/g de DS	Glucoamilasa	Dosis µg/g de DS
1407	1,4	-	-	-	-
1407	1,4	Pfu	2	-	-
1407	1,4	Pfu	2	PE001	10

La tabla 14 y la fig. 1 más adelante muestran los resultados:

Tratamiento	pH	EtOH (% p/v)	EtOH (% Δ)	Error Std JMP	95 % CI
Control	4,8	9,2	100 %	0,022	0,042
Pfu	4,8	11,0	120 %	0,022	0,042
Pfu+PE001	4,8	11,0	120 %	0,022	0,042

20 **Ejemplo 9**

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

25 [0188] El fin de este experimento era evaluar el rendimiento de aplicación de proteasa Pfu derivada de *Pyrococcus furiosus* a pH 4,8 durante la licuefacción a 85 °C durante 2 horas.

Licuefacción (Labomat)

30 [0189] Cada licuefacción recibió maíz molido (84,19 % de DS), agua de proceso (6,27 % de DS), y agua del grifo con el objetivo de un peso total de 100 g a 32,50 % de sólidos secos (DS). El agua de proceso se mezcló a 30 % p/p de peso de la suspensión de total. El pH de la suspensión inicial era aproximadamente de 5,2 y se ajustó a pH 4,8 con 40 % v/v de ácido sulfúrico antes de la licuefacción. Todas las enzimas se adicionaron según el diseño de experimentos enumerado en la tabla 13 más adelante. La licuefacción se produjo en un Labomat  
35 utilizando las condiciones siguientes: 5 °C/min., rampa, rampa de 17 minutos, tiempo de retención de 103 minutos, 40 r.p.m. durante toda la ejecución, 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 la fermentación basándose en el protocolo enumerado en SSF.

40 Sacarificación y fermentación simultánea (SSF)

45 [0190] Cada triturado se ajustó a pH 5,0 con 50 % p/p de hidróxido sódico o 40 % v/v de ácido sulfúrico. Se aplicó penicilina a cada triturado a una concentración total de 3 ppm. Los tubos se prepararon con triturado con partes alícuotas de aproximadamente 4,5 g de triturado por 15 mL de tubos de ensayo preperforados para permitir la liberación de CO<sub>2</sub>. Los tubos de ensayo permanecieron, durante toda la noche, a 4 °C hasta la mañana siguiente.

[0191] Todos los tubos de ensayo de triturado se extrajeron del almacenamiento en frío y se calentaron a 32 °C en la cámara de incubación de entrada. Una vez calentada, la glucoamilasa BL2 se dosificó a cada tubo de triturado a 0,50 AGU/g de DS, se adicionó agua de modo que todos los tubos recibieron 120 µL de líquido y cada muestra de triturado recibió 100 µL de levadura rehidratada. La levadura rehidratada se preparó mezclando 5,5 g de RED STAR de Fermentis en 100 mL de agua del grifo a 32 °C durante al menos 15 minutos.

[0192] En la supervisión de la pérdida de peso de CO<sub>2</sub> a lo largo del tiempo, cada unidad de CO<sub>2</sub> generada y perdida se convierte en gramo de etanol producido por gramo de sólidos secos (g EtOH/g de DS) por la siguiente:

$$g \text{ etanol } / g \text{ DS} = \frac{g \text{ CO}_2 \text{ pérdida de peso} \times \frac{1 \text{ mol CO}_2}{44,0098 \text{ g CO}_2} \frac{1 \text{ mol etanol}}{1 \text{ mol CO}_2} \frac{46,094 \text{ g etanol}}{1 \text{ mol etanol}}}{g \text{ triturado en tubo } \% \text{ DS de triturado}}$$

Análisis de HPLC

[0193] El muestreo de fermentación se produjo después de 54 horas de fermentación tomando 3 tubos por tratamiento.

Cada muestra se desactivó con 50 µL de 40 % v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, agitando en vórtex, centrifugando a 1460×g durante 10 minutos, y filtrando a través de un filtro Whatman PP de 0,45 µm. Muestras después de 54 horas se analizaron bajo HPLC sin dilución adicional. Las muestras se almacenaron a 4 °C antes de y durante el análisis de HPLC.

Sistema de HPLC	Desgasificador de Agilent serie 1100/1200 con software Chem station, bomba cuaternaria, automuestreador, compartimento de columna con calentador Detector de índice de refracción (RI)
Columna	Columna de exclusión de iones Bio-Rad HPX-87H 300 mm x 7,8 mm pieza# 125-0140 Cación H de cartucho de seguridad de Bio-Rad pieza# 125-0129, soporte pieza# 125-0131
Método	0,005 M de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> fase móvil Caudal: 0,6 ml/min Temperatura de columna: 65 °C Temperatura del detector RI: 55 °C

[0194] El método cuantificó analito(s) usando el estándar de calibración para etanol (% p/v). Una calibración de cuatro puntos que incluye el origen se usa para la cuantificación.

[0195] Donde fue aplicable, se analizaron los datos utilizando software JMP (Cary, NC) con Oneway de ANOVA de pares usando Tukey-Kramer HSD o Dunnett's. Las barras de error que indican el nivel de confianza del 95 % se establecieron multiplicando el error estándar del análisis Oneway de Anova por 1,96.

Tabla 15. Plano experimental.

Licuefacción a 85 °C (pH 4,8)					
Alfa-amilasa	Dosis µg/g de DS	Proteasa	Dosis µg/g de DS	Glucoamilasa	Dosis µg/g de DS
1407	1,4	-	-	-	-
1407	1,4	Pfu	2	-	-
1407	1,4	Pfu	2	PE001	10

La tabla 16 a continuación muestra los resultados:

Tratamiento	pH	EtOH (% p/v)	EtOH (% Δ)	Error Std JMP	95 % CI+I
Control	4,8	9,2	100 %	0,022	0,042
Pfu	4,8	11,0	120 %	0,022	0,042
Pfu + PE001	4,8	11,0	120 %	0,022	0,042

**Ejemplo 10**

Viscosidad inferior mejorada en el proceso de producción de etanol

[0196] Preparación de harina de maíz: harina de maíz de Corn LP, Iowa, EE.UU., se tamizó y se definió su distribución de tamaño de partículas (PSD). Se usaron tamices de prueba de estándar de EE.UU. con especificaciones ASTM E-11 para los tamices del número 12, 16, 20, 30, 40 y 60. El contenido de sólidos secos (DS) de la harina recibida fue de alrededor del 87,4 %. Cada ejecución experimental se preparó para tener la misma PSD.

[0197] Configuración del perfil de viscosidad y determinación con Rapid Visco Analyzer: se usó una unidad RVA-4 de Perten para medir el perfil de viscosidad durante la licuefacción. Las suspensiones de maíz se prepararon

5 para la licuefacción pesando cantidades específicas de harina de maíz tamizada en un recipiente de metal de Perten que repetía la PSD de la harina recibida. Una suspensión de 40 gramos se hizo a 32 % de DS  
 10 adicionando agua del grifo y el pH se ajustó a o bien 5,80 (Control) utilizando 50 % p/p de NaOH o bien 4,80 utilizando 40 % v/v de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se adicionaron partes alícuotas de soluciones madre enzimáticas antes de cada ejecución en el RVA-4 de Perten y las cantidades también se consideraron para obtener los sólidos deseados. La suspensión de control usó alfa-amilasa A a pH 5,8. El RVA-4 de Perten se programó para mezclar la suspensión durante 1 minuto a 25 °C, aumentar la temperatura de suspensión de 25 °C a 85 °C en 6 minutos, mantener la temperatura a 85 °C constante durante 2 horas, refrescar la temperatura del triturado licuado de 85 °C hasta 32 °C en 7 minutos, y mantener la temperatura del triturado licuado a 32 °C durante 5 minutos. Durante cada ejecución, la mezcla se mantuvo constante a 210 r.p.m.

#### Resultados

15 [0198] Una visión de conjunto de los resultados se proporciona en la tabla 17 y se muestra en las figuras 2-5.

Tabla 17: Las dosis enzimáticas se enumeran en paréntesis para cada una y se expresan como micro g EP/g de DS.

N.º de experimento	Descripción de la enzima	Viscosidad máxima	Viscosidad media máxima a final	Viscosidad final	% de reducción de viscosidad máxima vs. experimento 2	% de reducción de viscosidad media y máxima a final vs. experimento 2	% de reducción de viscosidad final vs. experimento 2
1	Alfa-amilasa A (1,4) a pH=5,8	12769	535	1078			
2	Alfa-amilasa 1407 (1,4) + Glucoamilasa PE001 (10) + Proteasa 196 (1) a pH=4,8	15050	659	816			
3	Alfa-amilasa A (1,4) + Glucoamilasa PE001 (10) + Proteasa 196 (1) a pH=4,8	11848	728	1831			
4	Alfa-amilasa A (0,35) + Alfa-amilasa 1407 (1,4) + Glucoamilasa PE001 (10) + Proteasa 196 (1) a pH=4,8	12927	527	689	14 %	20 %	16 %
5	Alfa-amilasa A (0,7) + Alfa-amilasa 1407 (1,4) + Glucoamilasa PE001 (10) + Proteasa 196 (1) a pH=4,8	11454	423	682	24 %	36 %	16 %

Listado de secuencias

[0199]

5 <110> Novozymes A/S  
 Deinhammer, Randy  
 Clark, Suzanne  
 Quiros, Mauricio

10 Matthews, John  
 Hjulmand, Anne Glud  
 Soong, Chee-Leong  
 Matsui, Tomoko  
 Takagi, Shinobu

15 <120> Proceso para producir productos de fermentación

<130> 12098-WO-PCT

20 <160> 14

<170> Versión de PatentIn 3.5

<210> 1

25 <211> 515  
 <212> PRT  
 <213> Bacillus stearothermophilus

30 <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (1)..(515)

<400> 1

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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



ES 2 673 940 T3

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

ES 2 673 940 T3

Thr Leu Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Glu Pro Gly Gln  
 325 330 335  
 5  
 Ala Leu Gln Ser Trp Val Asp Pro Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala  
 340 345 350  
 10 Phe Ile Leu Thr Arg Gln Glu Gly Tyr Pro Cys Val Phe Tyr Gly Asp  
 355 360 365  
 15 Tyr Tyr Gly Ile Pro Gln Tyr Asn Ile Pro Ser Leu Lys Ser Lys Ile  
 370 375 380  
 20 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  
 25  
 Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro  
 420 425 430  
 30 Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val  
 435 440 445  
 35 Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser  
 450 455 460  
 40 Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp  
 465 470 475 480  
 45 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  
 50 Ala Trp Pro  
 515  
 55 <210> 2  
 <211> 1068  
 <212> ADN

ES 2 673 940 T3

```

<213> Thermoascus aurantiacus

<220>
5 <221> CDS
  <222> (1)..(1065)

<220>
10 <221> misc_signal
   <222> (1)..(57)

<220>
15 <221> misc_feature
   <222> (58)..(534)

<220>
20 <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

25
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

30
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

35
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

40
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

45
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

50
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

55
tcc gtc gag gac gtt ttt gat att gct tcg act tac gat ctg acc agc
369

```

ES 2 673 940 T3

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

5 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

10 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

15 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

20 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

25 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

30 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

35 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

40 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

45 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

50 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

55 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

ES 2 673 940 T3

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  
 5                   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  
 10                   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  
 15           155                   160                   165  
  
 gcg aat gcc ata tac ctt ggt tgc taa  
 1068  
 Ala Asn Ala Ile Tyr Leu Gly Cys  
 20   170                   175  
  
  
 <210> 3  
 <211> 355  
 25 <212> PRT  
     <213> Thermoascus aurantiacus  
  
 <400> 3  
  
 30 Met Arg Leu Val Ala Ser Leu Thr Ala Leu Val Ala Leu Ser Val  
                  -175                   -170                   -165  
  
 35 Pro Val Phe Pro Ala Ala Val Asn Val Lys Arg Ala Ser Ser Tyr  
                  -160                   -155                   -150  
  
 40 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  
 45  
 Asn Phe Phe Lys Asp Pro Ala Pro Val Lys Lys Val Ser Val Tyr  
                  -115                   -110                   -105  
  
 50 Arg Asp Gly Ser Glu Val Gln Phe Glu Gly Ile Leu Ser Arg Tyr Lys  
                  -100                   -95                   -90  
  
 55 Ser Thr Gly Leu Ser Arg Asp Ala Phe Thr Tyr Leu Ala Pro Gly Glu  
                  -85                   -80                   -75

ES 2 673 940 T3

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

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

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

15 Leu Thr Ile Asp Val Asp Gly 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

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

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

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

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

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

45 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

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

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

ES 2 673 940 T3

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

5 Ala Asn Ala Ile Tyr Leu Gly Cys  
170 175

10 <210> 4  
<211> 49  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Constructo sintético

<400> 4  
aacgacggta cccgggggatc ggatccatgc ggctcgttgc ttcctaac  
49

20

<210> 5  
<211> 48  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Constructo artificial

30 <400> 5  
ctaattacat gatgcggccc ttaattaatt agcaaccaag gtatatgg  
48

35 <210> 6  
<211> 20  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Constructo artificial

<400> 6  
taggagttta gtgaacttgc  
45 20

<210> 7  
<211> 18  
50 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Constructo artificial

55 <400> 7

ES 2 673 940 T3

ttcgagcgtc ccaaaacc  
18

5 <210> 8  
<211> 1851  
<212> ADN  
<213> Penicillium oxalicum

10 <220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(1851)

15 <400> 8

atg cgt ctc act cta tta tca ggt gta gcc ggc gtt ctc tgc gca gga  
48  
Met Arg Leu Thr Leu Leu Ser Gly Val Ala Gly Val Leu Cys Ala Gly  
20 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  
25 20 25 30  
ttc atc cac aaa gag ggc gag cgg tgc ctc caa ggc atc ttg gac aat  
144  
Phe Ile His Lys Glu Gly Glu Arg Ser Leu Gln Gly Ile Leu Asp Asn  
30 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  
35 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  
40 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  
45 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  
50 100 105 110  
cgg gac tac gtg tgc 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  
55 115 120 125



ES 2 673 940 T3

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

5  
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

10  
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

15  
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

20  
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

25  
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

30  
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

35  
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

40  
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

45  
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

50  
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

55  
cct tgt tct gcc cgc gct ctg gcg aac cac aag gtc tat gtg gat tcc  
960

ES 2 673 940 T3

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

5 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

10 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

15 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

20 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

25 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

30 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

35 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

40 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

45 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

50 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

55 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

ES 2 673 940 T3

ccc acg gca act ttc tca tcc aag act aag tgc gtc ccc gct aaa gat  
 1536  
 5 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  
 10 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  
 15 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  
 20 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  
 25 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  
 30 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  
 35 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  
 40 His Ser Asn Asp Val Trp Gln Phe  
 610 615

<210> 9  
 <211> 616  
 45 <212> PRT  
 <213> Penicillium oxalicum

<400> 9

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

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

ES 2 673 940 T3

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

ES 2 673 940 T3

			260					265						270			
5	Thr	Gln	Ala	Ser	Arg	Ser	Gly	Ile	Asp	Leu	Asp	Ser	Val	Leu	Gly	Ser	
			275					280					285				
10	Ile	His	Thr	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Ala	Cys	Asp	Asp	Ala	Thr	Phe	Gln	
		290					295					300					
15	Pro	Cys	Ser	Ala	Arg	Ala	Leu	Ala	Asn	His	Lys	Val	Tyr	Val	Asp	Ser	
	305					310					315					320	
20	Phe	Arg	Ser	Ile	Tyr	Lys	Ile	Asn	Ala	Gly	Leu	Ala	Glu	Gly	Ser	Ala	
					325					330					335		
25	Ala	Asn	Val	Gly	Arg	Tyr	Pro	Glu	Asp	Val	Tyr	Gln	Gly	Gly	Asn	Pro	
				340					345					350			
30	Trp	Tyr	Leu	Ala	Thr	Leu	Gly	Ala	Ser	Glu	Leu	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu	
			355					360					365				
35	Tyr	Gln	Trp	Asp	Arg	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Leu	
		370					375					380					
40	Ser	Phe	Phe	Lys	Asp	Phe	Asp	Ala	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Ser	Tyr	Ser	
	385					390					395					400	
45	Arg	Asn	Ser	Lys	Thr	Tyr	Lys	Lys	Leu	Thr	Gln	Ser	Ile	Lys	Ser	Tyr	
					405					410					415		
50	Ala	Asp	Gly	Phe	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Gln	Tyr	Thr	Pro	Ser	Asn	Gly	
				420					425					430			
55	Ser	Leu	Ala	Glu	Gln	Tyr	Asp	Arg	Asn	Thr	Ala	Ala	Pro	Leu	Ser	Ala	
			435					440					445				
60	Asn	Asp	Leu	Thr	Trp	Ser	Phe	Ala	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Thr	Gln	Arg	
		450					455					460					
65	Arg	Asp	Ala	Val	Val	Pro	Pro	Ser	Trp	Gly	Ala	Lys	Ser	Ala	Asn	Lys	
	465					470					475					480	
70	Val	Pro	Thr	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Pro	Val	Val	Gly	Thr	Tyr	Lys	Ala	
					485					490					495		

ES 2 673 940 T3

5 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  
 10 Asn Val Phe Met Ser Gly Asn Ile Thr Ala Leu Gly Asn Trp Asp Ala  
 530 535 540  
 15 Lys Lys Gly Phe Pro Leu Thr Ala Asn Leu Tyr Thr Gln Asp Gln Asn  
 545 550 555 560  
 20 Leu Trp Phe Ala Ser Val Glu Phe Ile Pro Ala Gly Thr Pro Phe Glu  
 565 570 575  
 25 Tyr Lys Tyr Tyr Lys Val Glu Pro Asn Gly Asp Ile Thr Trp Glu Lys  
 580 585 590  
 30 Gly Pro Asn Arg Val Phe Val Ala Pro Thr Gly Cys Pro Val Gln Pro  
 595 600 605  
 35 His Ser Asn Asp Val Trp Gln Phe  
 610 615  
 40 <210> 10  
 <211> 4014  
 <212> ADN  
 <213> Thermococcus hydrothermalis  
 45 <220>  
 <221> misc\_signal  
 <222> (1)..(81)  
 50 <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (82)..(4014)  
 <400> 10  
 55 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

ES 2 673 940 T3

		-25				-20										-15	
		atc	ggt	gga	gcg	aac	ggt	aag	agc	ggt	ggc	gcg	gcg	gag	ccg	aag	ccg
		96															
5	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															
10	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															
15	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	ggt
		240															
20	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															
25	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															
30	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															
35	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															
40	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															
45	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															
50	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															
55	Phe	Val	Thr	Glu	Ser	Gln	Lys	Val	Ala	Val	Thr	Asn	Glu	Phe	Thr	Glu	
						155					160					165	

ES 2 673 940 T3

5 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  
 5 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  
 10 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  
 15 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  
 20 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  
 25 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  
 30 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  
 35 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  
 40 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  
 45 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  
 50 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  
 55 ata tac ctc ttc cca aga aat cac gat cta agt gac aga gtt ggc ttt  
 1152



ES 2 673 940 T3

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

5 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

10 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

15 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

20 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

25 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

30 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

35 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

40 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

45 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

50 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

55 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

ES 2 673 940 T3

gag tac ctg ctc cgc gcc gag gca agc gac tgg ttc tgg tgg tac gga  
1728  
5 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  
10 Ser Asp Gln Asp Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Asp Arg Tyr Leu Lys  
550 555 560

acc tac ctc tac gag atg tac aag ctg gca gga gtc gag ccg ccg agc  
1824  
15 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  
20 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  
25 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  
30 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  
35 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  
40 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  
45 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  
50 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  
55 Ile Tyr Gly Ala Thr Asp Tyr Glu Lys Ser Glu Lys Leu Gly Glu Ala  
695 700 705

ES 2 673 940 T3

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

5  
 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

10  
 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

15  
 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

20  
 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

25  
 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

30  
 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

35  
 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

40  
 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

45  
 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

50  
 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

55  
 aac gga acg gcc atc cag ggc gag atg cag att tcc gca gat ccg gtt  
 2784

ES 2 673 940 T3

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

5 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

10 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

15 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

20 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

25 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

30 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

35 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

40 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

45 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

50 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

55 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

ES 2 673 940 T3

ata atc gag gta tac ttc gac ttc aag gag ggc ggg aac gtc tcg  
 3342  
 5 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  
 10 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  
 15 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  
 20 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  
 25 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  
 30 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  
 35 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  
 40 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  
 45 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  
 50 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  
 55 Gln Leu Ser Ser Tyr Asp Leu Glu Lys Lys Thr Leu Ala Thr Val  
 1225 1230 1235

ES 2 673 940 T3

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

5  
 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

10  
 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

15  
 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

20  
 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

25  
 <210> 11  
 <211> 1337  
 <212> PRT  
 30 <213> Thermococcus hydrothermalis  
 <400> 11

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

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

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

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

55 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

ES 2 673 940 T3

Tyr Met Asn Gly Lys Lys Asp Thr Tyr Gln Ile Ile Thr Glu Lys Ile  
 70 75 80 85  
 5 Ala Asn Gly Glu Pro Leu Thr Val Asp Glu Lys Trp Phe Met Leu Gln  
 90 95 100  
 10 Ala Pro Gly Gly Phe Phe Asp Asn Thr Ile Pro Trp Asn Gly Glu Pro  
 105 110 115  
 15 Ile Thr Asp Pro Asn Gly Asn Pro Ile Arg Asp Phe Trp Asp Arg Tyr  
 120 125 130  
 20 Thr Glu Leu Lys Asn Lys Met Leu Ser Ala Lys Ala Lys Tyr Ala Asn  
 135 140 145  
 25 Phe Val Thr Glu Ser Gln Lys Val Ala Val Thr Asn Glu Phe Thr Glu  
 150 155 160 165  
 30 Gln Asp Tyr Ile Asp Leu Ala Val Leu Phe Asn Leu Ala Trp Ile Asp  
 170 175 180  
 35 Tyr Asn Tyr Ile Thr Ser Thr Pro Glu Phe Lys Ala Leu Tyr Asp Lys  
 185 190 195  
 40 Val Asp Glu Gly Gly Tyr Thr Arg Ala Asp Val Lys Thr Val Leu Asp  
 200 205 210  
 45 Ala Gln Ile Trp Leu Leu Asn His Thr Phe Glu Glu His Glu Lys Ile  
 215 220 225  
 50 Asn Leu Leu Leu Gly Asn Gly Asn Val Glu Val Thr Val Val Pro Tyr  
 230 235 240 245  
 55 Ala His Pro Ile Gly Pro Ile Leu Asn Asp Phe Gly Trp Asp Ser Asp  
 250 255 260  
 60 Phe Asn Asp Gln Val Lys Lys Ala Asp Glu Leu Tyr Lys Pro Tyr Leu  
 265 270 275  
 65 Gly Gly Gly Thr Ala Val Pro Lys Gly Gly Trp Ala Ala Glu Ser Ala  
 280 285 290  
 70 Leu Asn Asp Lys Thr Leu Glu Ile Leu Ala Glu Asn Gly Trp Glu Trp

ES 2 673 940 T3

	295		300		305												
5	Val 310	Met	Thr	Asp	Gln	Met 315	Val	Leu	Gly	Lys	Leu 320	Gly	Ile	Glu	Gly	Thr 325	
10	Val	Glu	Asn	Tyr	His 330	Lys	Pro	Trp	Val	Ala 335	Glu	Phe	Asn	Gly	Lys 340	Lys	
15	Ile	Tyr	Leu	Phe 345	Pro	Arg	Asn	His	Asp 350	Leu	Ser	Asp	Arg	Val 355	Gly	Phe	
20	Thr	Tyr	Ser 360	Gly	Met	Asn	Gln	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Asp 370	Phe	Val	Asn	
25	Glu	Leu 375	Leu	Lys	Leu	Gln	Lys 380	Gln	Asn	Tyr	Asp	Gly 385	Ser	Leu	Val	Tyr	
30	Val 390	Val	Thr	Leu	Asp	Gly 395	Glu	Asn	Pro	Val	Glu 400	Asn	Tyr	Pro	Tyr	Asp 405	
35	Gly	Glu	Leu	Phe	Leu 410	Thr	Glu	Leu	Tyr	Lys 415	Lys	Leu	Thr	Glu	Leu	Gln 420	
40	Glu	Gln	Gly	Leu 425	Ile	Arg	Thr	Leu	Thr 430	Pro	Ser	Glu	Tyr	Ile 435	Gln	Leu	
45	Tyr	Gly	Asp 440	Lys	Ala	Asn	Lys	Leu 445	Thr	Pro	Arg	Met	Met 450	Glu	Arg	Leu	
50	Asp	Leu 455	Thr	Gly	Asp	Asn	Val 460	Asn	Ala	Leu	Leu	Lys 465	Ala	Gln	Ser	Leu	
55	Gly 470	Glu	Leu	Tyr	Asp	Met 475	Thr	Gly	Val	Lys	Glu 480	Glu	Met	Gln	Trp	Pro 485	
60	Glu	Ser	Ser	Trp	Ile 490	Asp	Gly	Thr	Leu	Ser 495	Thr	Trp	Ile	Gly	Glu	Pro 500	
65	Gln	Glu	Asn	Tyr 505	Gly	Trp	Tyr	Trp	Leu 510	Tyr	Met	Ala	Arg	Lys 515	Ala	Leu	
70	Met	Glu	Asn 520	Lys	Asp	Lys	Met	Ser 525	Gln	Ala	Asp	Trp	Glu 530	Lys	Ala	Tyr	





ES 2 673 940 T3

Thr Glu Val Lys Gly Val Val Ile Ala Asp Ile Thr Asp Pro Glu Gly  
 760 765 770  
 5  
 Asp Asp His Gly Pro Gly Asn Tyr Thr Tyr Pro Thr Asp Lys Val Phe  
 775 780 785  
 10  
 Lys Pro Gly Val Phe Asp Leu Leu Arg Phe Arg Met Leu Glu Gln Thr  
 790 795 800 805  
 15  
 Glu Ser Tyr Val Met Glu Phe Tyr Phe Lys Asp Leu Gly Gly Asn Pro  
 810 815 820  
 20  
 Trp Asn Gly Pro Asn Gly Phe Ser Leu Gln Ile Ile Glu Val Tyr Leu  
 825 830 835  
 25  
 Asp Phe Lys Asp Gly Gly Asn Ser Ser Ala Ile Lys Met Phe Pro Asp  
 840 845 850  
 30  
 Gly Pro Gly Ala Asn Val Asn Leu Asp Pro Glu His Pro Trp Asp Val  
 855 860 865  
 35  
 Ala Phe Arg Ile Ala Gly Trp Asp Tyr Gly Asn Leu Ile Ile Leu Pro  
 870 875 880 885  
 40  
 Asn Gly Thr Ala Ile Gln Gly Glu Met Gln Ile Ser Ala Asp Pro Val  
 890 895 900  
 45  
 Lys Asn Ala Ile Ile Val Lys Val Pro Lys Lys Tyr Ile Ala Ile Asn  
 905 910 915  
 50  
 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  
 55  
 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



ES 2 673 940 T3

5 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  
 10 Gln Leu Ser Ser Tyr Asp Leu Glu Lys Lys Thr Leu Ala Thr Val  
 1225 1230 1235  
 15 Leu Met Val Pro Leu Val Asn Gly Thr Gly Gly Glu Glu Pro Thr  
 1240 1245 1250  
 20 Pro Thr Glu Ser Pro Thr Glu Thr Thr Thr Thr Thr Pro Ser Glu  
 1255 1260 1265  
 25 Thr Thr Thr Thr Thr Ser Thr Thr Thr Gly Pro Ser Ser Thr Thr  
 1270 1275 1280  
 30 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  
 35 <210> 12  
 <211> 809  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Pululanasa híbrida de Thermoccus hydrothermalis y Thermococcus  
 litoralis  
 45 <220>  
 <221> SEÑAL  
 <222> (1)..(27)  
 50 <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (28)..(809)  
 <400> 12  
 55 Met Lys Lys Pro Leu Gly Lys Ile Val Ala Ser Thr Ala Leu Leu Ile  
 -25 -20 -15

ES 2 673 940 T3

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

5  
 Leu Asn Val Ile Ile Val Trp His Gln His Gln Pro Tyr Tyr Tyr Asp  
 10 10 15 20

10  
 Pro Ile Gln Asp Ile Tyr Thr Arg Pro Trp Val Arg Leu His Ala Ala  
 25 30 35

15  
 Asn Asn Tyr Trp Lys Met Ala Asn Tyr Leu Ser Lys Tyr Pro Asp Val  
 40 45 50

20  
 His Val Ala Ile Asp Leu Ser Gly Ser Leu Ile Ala Gln Leu Ala Asp  
 55 60 65

25  
 Tyr Met Asn Gly Lys Lys Asp Thr Tyr Gln Ile Val Thr Glu Lys Ile  
 70 75 80 85

30  
 Ala Asn Gly Glu Pro Leu Thr Leu Glu Asp Lys Trp Phe Met Leu Gln  
 90 95 100

35  
 Val Ala Asp Glu Asn Gly Asn Pro Tyr Arg Glu Gln Trp Asp Arg Tyr  
 120 125 130

40  
 Ala Glu Leu Lys Asp Lys Arg Asn Asn Ala Phe Lys Lys Tyr Ala Asn  
 135 140 145

45  
 Leu Pro Leu Asn Glu Gln Lys Val Lys Ile Thr Ala Glu Phe Thr Glu  
 150 155 160 165

50  
 Gln Asp Tyr Ile Asp Leu Ala Val Leu Phe Asn Leu Ala Trp Ile Asp  
 170 175 180

55  
 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

ES 2 673 940 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

55 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

ES 2 673 940 T3

	440		445		450												
5	Asp 455	Leu	Thr	Gly	Asp	Asn	Val 460	Asn	Ala	Leu	Leu	Lys 465	Ala	Gln	Ser	Leu	
10	Gly 470	Glu	Leu	Tyr	Asp	Met 475	Thr	Gly	Val	Lys	Glu 480	Glu	Met	Gln	Trp	Pro 485	
15	Glu	Ser	Ser	Trp	Ile 490	Asp	Gly	Thr	Leu	Ser 495	Thr	Trp	Ile	Gly	Glu 500	Pro	
20	Gln	Glu	Asn	Tyr 505	Gly	Trp	Tyr	Trp	Leu 510	Tyr	Met	Ala	Arg	Lys 515	Ala	Leu	
25	Met	Glu	Asn 520	Lys	Asp	Lys	Met	Ser 525	Gln	Ala	Asp	Trp	Glu 530	Lys	Ala	Tyr	
30	Glu	Tyr 535	Leu	Leu	Arg	Ala	Glu 540	Ala	Ser	Asp	Trp	Phe 545	Trp	Trp	Tyr	Gly	
35	Ser 550	Asp	Gln	Asp	Ser	Gly 555	Gln	Asp	Tyr	Thr	Phe 560	Asp	Arg	Tyr	Leu	Lys 565	
40	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Glu 570	Met	Tyr	Lys	Leu	Ala 575	Gly	Val	Glu	Pro	Pro	Ser 580	
45	Tyr	Leu	Phe	Gly 585	Asn	Tyr	Phe	Pro	Asp 590	Gly	Glu	Pro	Tyr	Thr 595	Thr	Arg	
50	Gly	Leu	Val 600	Gly	Leu	Lys	Asp	Gly 605	Glu	Met	Lys	Asn	Phe 610	Ser	Ser	Met	
55	Ser	Pro 615	Leu	Ala	Lys	Gly 620	Val	Ser	Val	Tyr	Phe 625	Asp	Gly	Glu	Gly	Ile	
60	His 630	Phe	Ile	Val	Lys	Gly 635	Asn	Leu	Asp	Arg	Phe 640	Glu	Val	Ser	Ile	Trp 645	
65	Glu	Lys	Asp	Glu	Arg 650	Val	Gly	Asn	Thr	Phe 655	Thr	Arg	Leu	Gln	Glu 660	Lys	
70	Pro	Asp	Glu	Leu 665	Ser	Tyr	Phe	Met	Phe 670	Pro	Phe	Ser	Arg	Asp 675	Ser	Val	

ES 2 673 940 T3

Gly Leu Leu Ile Thr Lys His Val Val Tyr Glu Asn Gly Lys Ala Glu  
 680 685 690  
 5  
 Ile Tyr Gly Ala Thr Asp Tyr Glu Lys Ser Glu Lys Leu Gly Glu Ala  
 695 700 705  
 10  
 Thr Val Lys Asn Thr Ser Glu Gly Ile Glu Val Val Leu Pro Phe Asp  
 710 715 720 725  
 15  
 Tyr Ile Glu Asn Pro Ser Asp Phe Tyr Phe Ala Val Ser Thr Val Lys  
 730 735 740  
 20  
 Asp Gly Asp Leu Glu Val Ile Ser Thr Pro Val Glu Leu Lys Leu Pro  
 745 750 755  
 25  
 Thr Glu Val Lys Gly Val Val Ile Ala Asp Ile Thr Asp Pro Glu Gly  
 760 765 770  
 30  
 Asp Asp His Gly Pro Gly Asn Tyr Thr  
 775 780  
 <210> 13  
 <211> 412  
 <212> PRT  
 <213> Pyrococcus furiosus  
 35  
 <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (1)..(412)  
 <223> Proteasa de Pyrococcus furiosus (Pfu)  
 40  
 <400> 13  
 Ala Glu Leu Glu Gly Leu Asp Glu Ser Ala Ala Gln Val Met Ala Thr  
 45 1 5 10 15  
 Tyr Val Trp Asn Leu Gly Tyr Asp Gly Ser Gly Ile Thr Ile Gly Ile  
 50 20 25 30  
 Ile Asp Thr Gly Ile Asp Ala Ser His Pro Asp Leu Gln Gly Lys Val  
 35 40 45  
 55  
 Ile Gly Trp Val Asp Phe Val Asn Gly Arg Ser Tyr Pro Tyr Asp Asp  
 50 55 60



ES 2 673 940 T3

5 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  
10 85 90 95

Gly Ile Lys Val Leu Gly Ala Asp Gly Ser Gly Ser Ile Ser Thr Ile  
15 100 105 110

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

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

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

30 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

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

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

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

50 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  
55 260 265 270

Thr Ala Leu Ile Glu Thr Ala Asp Ile Val Lys Pro Asp Glu Ile Ala

ES 2 673 940 T3

275 280 285

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

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

15 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

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

25 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

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

35 <210> 14  
<211> 595  
<212> PRT  
<213> Penicillium oxalicum

40 <220>  
<221> mat\_peptide  
<222> (1)..(595)  
<223> Secuencia de glucoamilasa de Penicillium oxalicum madura

45 <400> 14

50 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

55 Lys Lys Thr Pro Gly Thr Ala Ala Gly Leu Phe Ile Ala Ser Pro Asn

ES 2 673 940 T3

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

ES 2 673 940 T3

			260					265						270			
5	Pro	Glu	Ala	Ala	Cys	Asp	Asp	Ala	Thr	Phe	Gln	Pro	Cys	Ser	Ala	Arg	
			275					280					285				
10	Ala	Leu	Ala	Asn	His	Lys	Val	Tyr	Val	Asp	Ser	Phe	Arg	Ser	Ile	Tyr	
		290					295					300					
15	Lys	Ile	Asn	Ala	Gly	Leu	Ala	Glu	Gly	Ser	Ala	Ala	Asn	Val	Gly	Arg	
	305					310					315				320		
20	Tyr	Pro	Glu	Asp	Val	Tyr	Gln	Gly	Gly	Asn	Pro	Trp	Tyr	Leu	Ala	Thr	
				325						330					335		
25	Leu	Gly	Ala	Ser	Glu	Leu	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu	Tyr	Gln	Trp	Asp	Arg	
				340					345					350			
30	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Leu	Ser	Phe	Phe	Lys	Asp	
			355					360					365				
35	Phe	Asp	Ala	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Ser	Tyr	Ser	Arg	Asn	Ser	Lys	Thr	
		370					375					380					
40	Tyr	Lys	Lys	Leu	Thr	Gln	Ser	Ile	Lys	Ser	Tyr	Ala	Asp	Gly	Phe	Ile	
	385					390					395				400		
45	Gln	Leu	Val	Gln	Gln	Tyr	Thr	Pro	Ser	Asn	Gly	Ser	Leu	Ala	Glu	Gln	
				405						410					415		
50	Tyr	Asp	Arg	Asn	Thr	Ala	Ala	Pro	Leu	Ser	Ala	Asn	Asp	Leu	Thr	Trp	
				420					425					430			
55	Ser	Phe	Ala	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Thr	Gln	Arg	Arg	Asp	Ala	Val	Val	
			435					440					445				
60	Pro	Pro	Ser	Trp	Gly	Ala	Lys	Ser	Ala	Asn	Lys	Val	Pro	Thr	Thr	Cys	
		450					455					460					
65	Ser	Ala	Ser	Pro	Val	Val	Gly	Thr	Tyr	Lys	Ala	Pro	Thr	Ala	Thr	Phe	
	465				470						475					480	
70	Ser	Ser	Lys	Thr	Lys	Cys	Val	Pro	Ala	Lys	Asp	Ile	Val	Pro	Ile	Thr	

ES 2 673 940 T3

				485					490					495			
5	Phe	Tyr	Leu	Ile	Glu	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Asn	Val	Phe	Met	Ser	
				500					505					510			
10	Gly	Asn	Ile	Thr	Ala	Leu	Gly	Asn	Trp	Asp	Ala	Lys	Lys	Gly	Phe	Pro	
			515					520					525				
15	Leu	Thr	Ala	Asn	Leu	Tyr	Thr	Gln	Asp	Gln	Asn	Leu	Trp	Phe	Ala	Ser	
		530					535					540					
20	Val	Glu	Phe	Ile	Pro	Ala	Gly	Thr	Pro	Phe	Glu	Tyr	Lys	Tyr	Tyr	Lys	
						550					555					560	
25	Val	Glu	Pro	Asn	Gly	Asp	Ile	Thr	Trp	Glu	Lys	Gly	Pro	Asn	Arg	Val	
					565					570					575		
30	Phe	Val	Ala	Pro	Thr	Gly	Cys	Pro	Val	Gln	Pro	His	Ser	Asn	Asp	Val	
				580					585					590			
	Trp	Gln	Phe														
			595														

## 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 4,5-5,0 a una temperatura en el rango de 80-90 °C usando:

- una variante de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEQ ID N.º: 1 con una delección doble en I181 + G182 y sustitución N193F, y que además comprende mutaciones seleccionadas del grupo de:

- V59A+Q89R+G112D+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;  
 - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S;  
 - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+D269E+D281N;  
 - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+I270L;  
 - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+H274K;  
 - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+Y276F;  
 - V59A+E129V+R157Y+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;  
 - V59A+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+S242Q+Q254S;  
 - 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+M96I+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;  
 - E129V+K177L+R179E;  
 - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;  
 - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+Y276F+L427M;  
 - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+M284T;  
 - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+N376\*+I377\*;  
 - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;  
 - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+M284T;  
 - E129V+K177L+R179E+S242Q;  
 - E129V+K177L+R179V+K220P+N224L+S242Q+Q254S;  
 - K220P+N224L+S242Q+Q254S; y  
 - M284V;

variante que tiene al menos el 80 % de identidad, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 1 y tiene un T ½ (min) a pH 4,5, 85 °C, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub>) de al menos 10; y

- una variante de una metaloproteasa, variante que tiene al menos el 80 % de identidad, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3 de este documento y tiene un valor de termoestabilidad superior al 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C; o

- una *Pyrococcus furiosus*, proteasa que tiene al menos el 80 % de identidad con la SEQ ID N.º: 13 de este documento y que tiene un valor de termoestabilidad superior al 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C;

ii) sacarificación utilizando una enzima generadora de fuente de carbohidratos;

iii) fermentación utilizando un organismo fermentador.

2. Proceso según la reivindicación 1, donde la variante de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEQ ID N.º: 1 de este documento está truncada, preferiblemente para tener alrededor de 491 aminoácidos.

3. Proceso según la reivindicación 2, donde la variante de alfa-amilasa tiene al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, más preferiblemente al menos el 92 %, aún más preferiblemente al menos el 93 %, de la forma más preferible al menos el 94 %, e incluso de la forma más preferible al menos el 95 %, tal como incluso al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 1 de este documento.

4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la alfa-amilasa se deriva de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* truncada para tener alrededor de 491 aminoácidos con las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en:

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

10                   5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde una segunda alfa-amilasa se adiciona durante la etapa de licuefacción i).

15                   6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la proteasa es una variante de la metaloproteasa descrita como la parte madura de la SEQ ID N.º: 3 de este documento, donde la variante de proteasa tiene al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, más preferiblemente al menos el 92 %, aún más preferiblemente al menos el 93 %, de la forma más preferible al menos el 94 %, e incluso de la forma más preferible al menos el 95 %, tal como incluso al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3 de este documento.

20                   7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde la proteasa es una variante de la proteasa de *Thermoascus aurantiacus* mostrada en la SEQ ID N.º: 3 con las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en:

- 25                   - A27K+D79L+Y82F+S87G+D104P+A112P+A126V+D142L;  
                       - D79L+Y82F+S87G+A112P+D142L;  
                       - Y82F+S87G+S70V+D79L+D104P+A112P+D142L; y  
                       - Y82F+S87G+D79L+D104P+A112P+A126V+D142L.

30                   8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la proteasa se deriva de una cepa de *Pyrococcus furiosus* que tiene al menos el 85 %, tal como al menos el 90 %, tal como al menos el 95 %, tal como al menos el 96 %, tal como al menos el 97 %, tal como al menos el 98 %, tal como al menos el 99 % de identidad con SEQ ID N.º: 13 de este documento.

35                   9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde además una enzima generadora de fuente de carbohidratos está presente y/o se adiciona durante la etapa de licuefacción i), preferiblemente una glucoamilasa, en particular donde la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una glucoamilasa con una estabilidad térmica a 85 °C, pH 5,3, de al menos el 30 %, preferiblemente al menos el 35 %.

40                   10. Proceso según la reivindicación 9, donde la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una glucoamilasa, preferiblemente derivada a partir de una cepa del género *Penicillium*, especialmente una cepa de *Penicillium oxalicum* descrita como las SEQ ID N.º: 9 o 14 de este documento, en particular donde la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una variante de la glucoamilasa derivada a partir de una cepa de *Penicillium oxalicum* con una sustitución K79V en las SEQ ID N.º: 9 o 14 (utilizando la secuencia madura mostrada en la SEQ ID N.º: 14 para la numeración), tal como donde la glucoamilasa tiene al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, más preferiblemente al menos el 92 %, aún más preferiblemente al menos el 93 %, de la forma más preferible al menos el 94 %, e incluso de la forma más preferible al menos el 95 %, tal como incluso al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % de identidad con el polipéptido maduro mostrado en las SEQ ID N.º: 9 o 14 de este documento.

50                   11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, donde además una glucoamilasa está presente y/o se adiciona durante la sacarificación y/o la fermentación, preferiblemente donde la glucoamilasa es de origen fúngico, preferiblemente derivada a partir 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*, o una cepa de *Pycnoporus*, o una cepa de *Gloephyllum*.

55                   12. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde además una pululanasa está presente durante la licuefacción y/o la sacarificación.

60                   13. Composición que incluye una alfa-amilasa y una proteasa, donde la

i) alfa-amilasa es una variante de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEQ ID N.º: 1 con una delección doble en I181 + G182 y sustitución N193F, y que además comprende mutaciones seleccionadas del grupo de:

- 65                   - V59A+Q89R+G112D+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;

- 5 - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+Q254S;  
 - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+D269E+D281N;  
 - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+I270L;  
 - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+H274K;  
 - V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+Y276F;  
 - V59A+E129V+R157Y+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;  
 - V59A+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+S242Q+Q254S;  
 - V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;  
 - V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+H274K;  
 10 - 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;  
 15 - V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;  
 - V59A+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+M284T;  
 - A91L+M96I+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;  
 - E129V+K177L+R179E;  
 - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S;  
 20 - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+Y276F+L427M;  
 - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+M284T;  
 - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S+N376\*+I377\*;  
 - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S;  
 - E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+Q254S+M284T;  
 - E129V+K177L+R179E+S242Q;  
 25 - E129V+K177L+R179V+K220P+N224L+S242Q+Q254S;  
 - K220P+N224L+S242Q+Q254S; y  
 - M284V;
- 30 variante que tiene al menos el 80 % de identidad, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 1 y tiene un T ½ (min) a pH 4,5, 85 °C, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub>) de al menos 10; y
- ii) una variante de una metaloproteasa, variante que tiene al menos el 80 % de identidad, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3 de este documento y tiene un valor de termoestabilidad superior al 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C; o
- 35 - una *Pyrococcus furiosus*, proteasa que tiene al menos el 80 % de identidad con la SEQ ID N.º: 13 de este documento y tiene un valor de termoestabilidad superior al 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C.
- 40 14. Composición según la reivindicación 13, donde la variante de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEQ ID N.º: 1 de este documento está truncada, preferiblemente para tener alrededor de 491 aminoácidos, en particular donde la variante de alfa-amilasa tiene al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, más preferiblemente al menos el 92 %, aún más preferiblemente al menos el 93 %, de la forma más preferible al menos el 94 %, e incluso de la forma más preferible al menos el 95 %, tal como incluso al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 1 de este documento.
- 45 15. Composición según la reivindicación 13 o 14, donde la alfa-amilasa se deriva de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* truncada para tener alrededor de 491 aminoácidos con las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en:
- 50 - I181\*+G182\*+N193F+V59A+Q89R+E129V+K177L+R179E+H208Y+K220P+N224L+ Q254S;  
 - I181\*+G182\*+N193F+E129V+K177L+R179E; y  
 55 - I181\*+G182\*+N193F+E129V+K177L+R179E+K220P+N224L+S242Q+Q254S.
16. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-15, donde además la composición comprende una segunda alfa-amilasa derivada de *Bacillus stearothermophilus*.
- 60 17. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-16, donde la proteasa tiene una termoestabilidad de más del 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.



18. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-17, donde la proteasa es una variante de la proteasa de *Thermoascus aurantiacus* mostrada en la SEQ ID N.º: 3 de este documento con las mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en:

- 5
- A27K+D79L+Y82F+S87G+D104P+A112P+A126V+D142L;
  - D79L+Y82F+S87G+A112P+D142L;
  - Y82F+S87G+S70V+D79L+D104P+A112P+D142L;
  - Y82F+S87G+D79L+D104P+A112P+A126V+D142L.

10 19. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-18, donde la proteasa de *Pyrococcus furiosus* es una que tiene al menos el 85 %, tal como al menos el 90 %, tal como al menos el 95 %, tal como al menos el 96 %, tal como al menos el 97 %, tal como al menos el 98 %, tal como al menos el 99 % de identidad con la SEQ ID N.º: 13 de este documento.

15 20. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-19, que además comprende una enzima generadora de fuente de carbohidratos, en particular donde la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una glucoamilasa, preferiblemente con una estabilidad térmica de actividad relativa a 85 °C, pH 5,3, de al menos el 20 %, al menos el 30 %, preferiblemente al menos el 35 %, en particular donde la glucoamilasa se deriva de una cepa del género *Penicillium*, especialmente una cepa de *Penicillium oxalicum* descrita como las SEQ ID N.º: 9 o 14 de este documento, en particular donde la enzima generadora de fuente de carbohidratos es una variante de la glucoamilasa derivada a partir de una cepa de *Penicillium oxalicum* con una sustitución K79V en las SEQ ID N.º: 9 o 14 (utilizando la secuencia madura mostrada en la SEQ ID N.º: 14 para la numeración), en particular donde la glucoamilasa tiene al menos el 80 %, más preferiblemente al menos el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 91 %, más preferiblemente al menos el 92 %, aún más preferiblemente al menos el 93 %, de la forma más preferible al menos el 94 %, e incluso de la forma más preferible al menos el 95 %, tal como incluso al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % de identidad con el polipéptido maduro mostrado en las SEQ ID N.º: 9 o 14 de este documento.

25 21. Composición según las reivindicaciones 13-20, que comprende además una pululanasa.

30 22. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 13-21 que comprende:

35 i) una variante de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEQ ID N.º: 1 con una delección doble en I181 + G182 y sustitución N193F, variante que tiene al menos el 80 % de identidad, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 1 y tiene un T<sub>1/2</sub> (min) a pH 4,5, 85 °C, 0,12 mM de CaCl<sub>2</sub>) de al menos 10;

40 ii) una variante de una metaloproteasa, variante que tiene al menos el 80 % de identidad, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEQ ID N.º: 3 de este documento y que tiene un valor de termoestabilidad superior al 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C; o

- una *Pyrococcus furiosus*, proteasa que tiene al menos el 80 % de identidad con la SEQ ID N.º: 13 de este documento y tiene un valor de termoestabilidad superior al 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C; y

45 iii) una glucoamilasa derivada de *Penicillium oxalicum* mostrada en las SEQ ID N.º: 9 o 14 de este documento o una glucoamilasa con al menos el 80 % de identidad con el polipéptido maduro mostrado en las SEQ ID N.º: 9 o 14 de este documento.

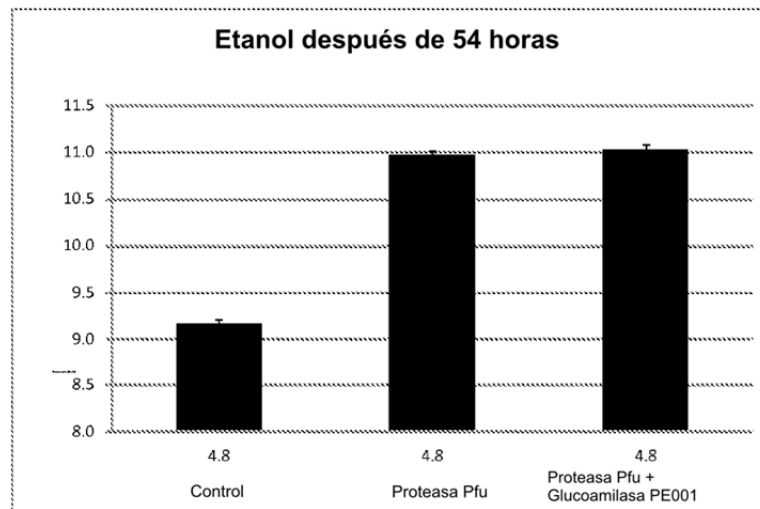


Fig. 1

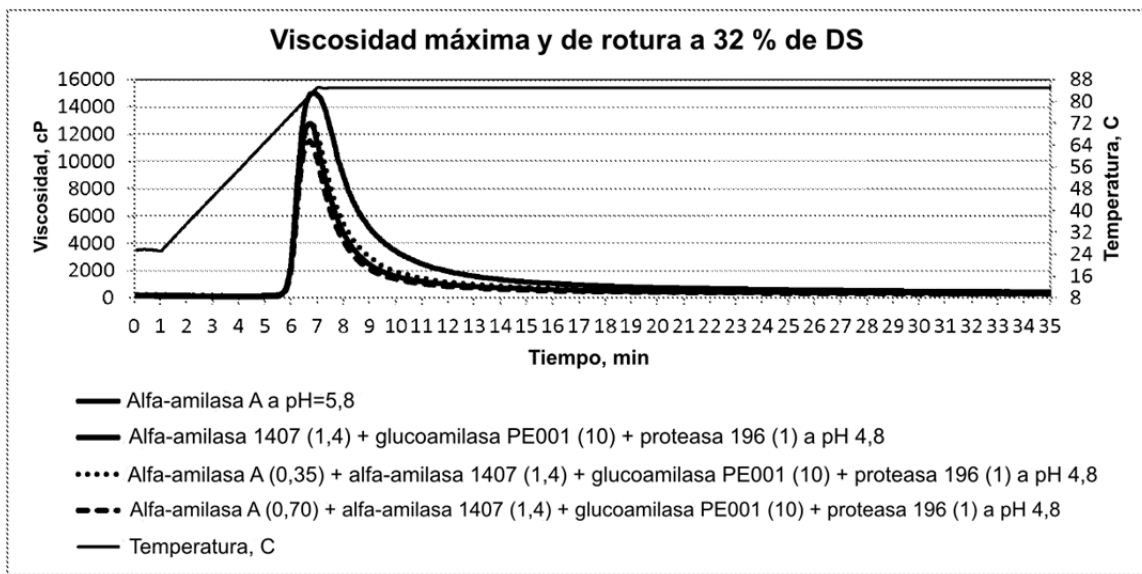


Fig. 2

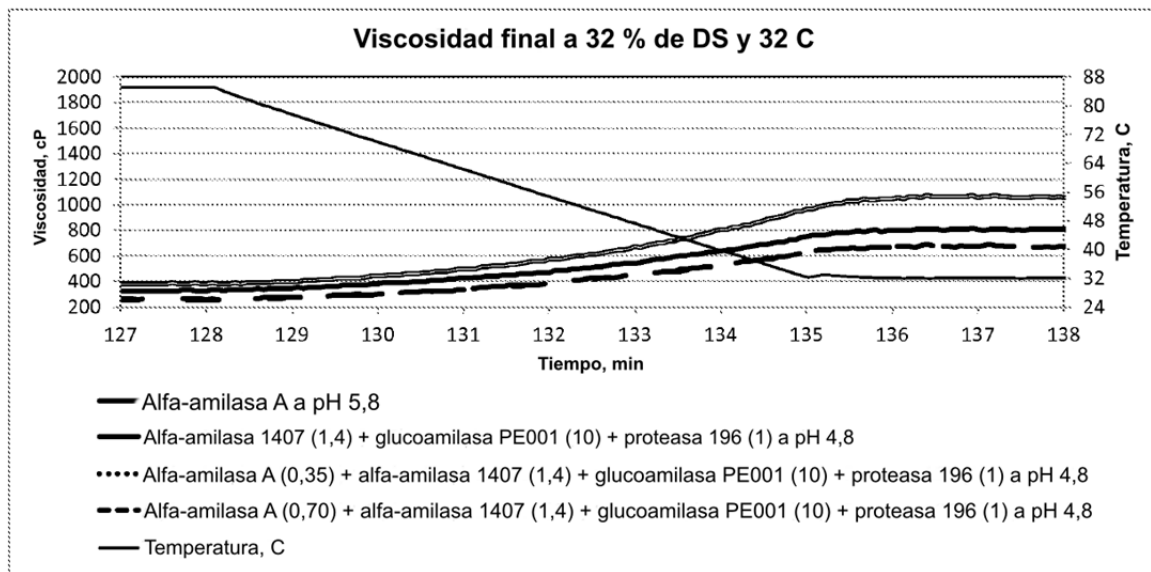
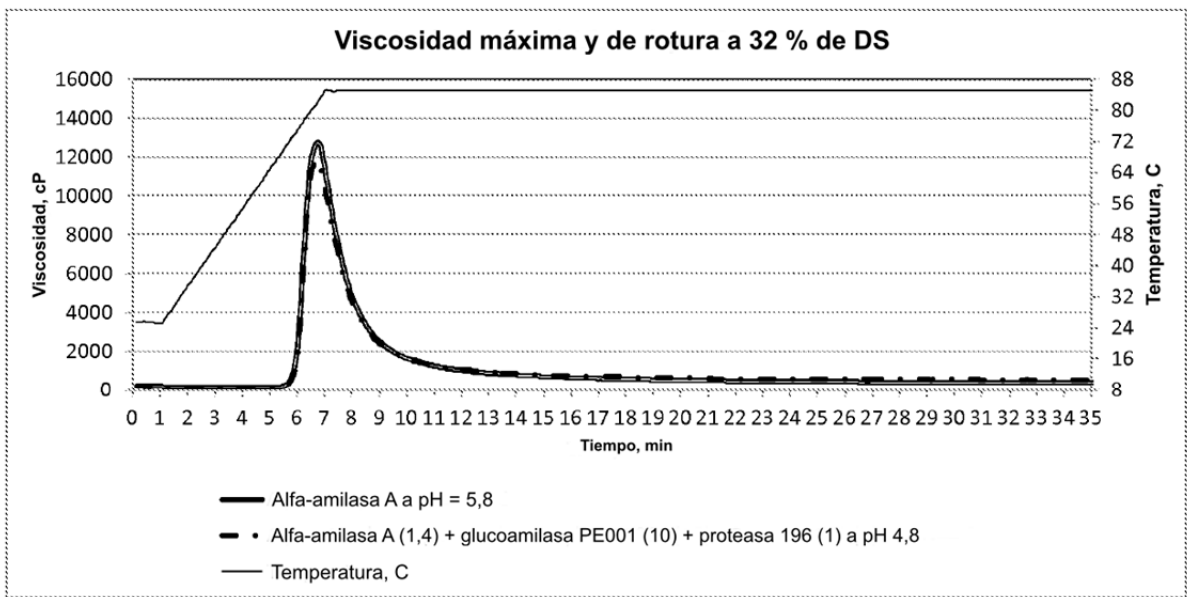


Fig. 3



**Fig. 4**

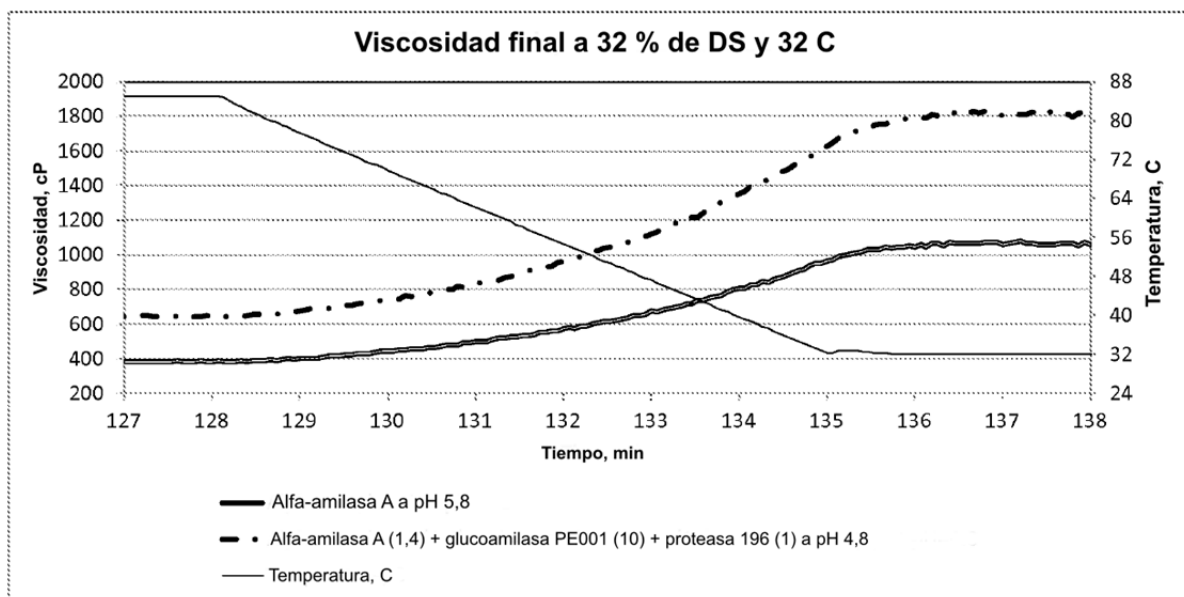


Fig. 5