(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 684 760**

(51) Int. Cl.:

C12P 7/06	(2006.01)
C12P 19/14	(2006.01)
C12P 19/20	(2006.01)
C12N 9/24	(2006.01)
C12N 9/28	(2006.01)
C12N 9/34	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2011** **E 16163786 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018** **EP 3070171**

(54) Título: **Proceso para el aumento de productos derivados de procesos de fermentación**

(30) Prioridad:

30.03.2010 US 318787 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.10.2018

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

SAUNDERS, JEREMY;
JUMP, JOSEPH;
OLSEN, HANS SEJR;
GUICHARD, AMANDA;
KREEL, NATHANIEL E.;
AKERMAN, MICHAEL y
HJULMAND, ANNE GLUD

(74) Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 684 760 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 el aumento de productos derivados de procesos de fermentación

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a procesos de deshidratación de la vinaza entera.

Antecedentes de la invención

[0002] Debido a las reservas limitadas de combustibles fósiles y la preocupación acerca de la emisión de gases invernadero hay un creciente interés en usar fuentes de energía renovable.

[0003] Los procesos para producir productos de fermentación, tales como etanol, de un almidón o lignocelulosa que contiene material se conocen en la técnica. La preparación del material que contiene almidón tal como maíz para utilización en tales procesos de fermentación empieza típicamente con la trituración del maíz en un proceso de molienda seca o de molienda húmeda. Procesos de molienda húmeda implican la fracción del maíz en componentes diferentes donde solo la fracción de almidón entra en el proceso de fermentación.
Los procesos de molienda seca implican la trituración de los granos de maíz en la comida y la mezcla de la comida con agua y enzimas.
Generalmente se usan dos tipos diferentes de procesos de molienda seca.
El proceso más frecuentemente usado, frecuentemente referido como un "proceso convencional" incluye la molienda del material que contiene almidón y luego la licuefacción de almidón gelatinizado a una temperatura elevada usando típicamente una alfa-amilasa bacteriana, seguido de sacarificación simultánea y fermentación (SSF) realizada en presencia de una glucoamilasa y un organismo de fermentación.
Otro proceso bien conocido, frecuentemente referido como un proceso de "hidrólisis del almidón en bruto" (proceso RSH), incluye la trituración del material que contiene almidón y luego simultáneamente la sacarificación y fermentación del almidón granulado inferior a la temperatura de gelatinización inicial típicamente en presencia de una alfa-amilasa fúngica ácida y una glucoamilasa.

[0004] En un proceso para producir etanol de maíz, siguiendo el proceso SSF o RSH el etanol es destilado del triturado entero después de la fermentación.
El compuesto acuoso sin etanol resultante, normalmente llamado vinaza entera, se separa en fracciones sólidas y líquidas (es decir, sedimento húmedo y vinaza fina que contiene aproximadamente 35 y 7% de sólidos, respectivamente).
La vinaza fina es frecuentemente condensada por evaporación en una vinaza gruesa o jarabe y recombinada con el sedimento húmedo y además secada en granos secos destiladores con grano secado de destilador soluble con solubles (DDGS) para usar en el pienso para animales.
El contenido de aceite de DDGS es a veces superior al deseado y se buscan métodos para recuperar más aceite como un subproducto separado para usarlo en la producción de biodíesel u otros productos biorenovables.

[0005] Mucho del trabajo de la recuperación de aceite de procesos de fermentación se ha centrado en la mejora de la extractibilidad del aceite de la vinaza entera.
La eliminación eficaz de aceite es frecuentemente realizada por extracción de hexano.
Sin embargo, la utilización de extracción de hexano no ha visto aplicación difundida debido a la alta inversión de capital requerida.
Por lo tanto, otros métodos que mejoran la extracción de aceite de procesos de fermentación han sido explorados.

[0006] La patente U.S. nº 6,433,146 divulga aceite de extracción y ceína de maíz o productos derivados de tratamiento de maíz que usa etanol.

[0007] La patente U.S. nº 7,601,858 divulga un método para la recuperación del aceite de un subproducto concentrado, tal como vinaza fina formada durante un proceso de molienda en seco usado para producir etanol.
El método incluye formación de un concentrado del subproducto, por ejemplo, evaporando el subproducto, y recuperación del aceite del concentrado.

[0008] La patente U.S. nº 7,608,729 divulga un método para liberar el aceite ligado presente en vinaza entera y vinaza fina calentando la vinaza a una temperatura suficiente para por lo menos separar parcialmente, o enlazar, el aceite de la vinaza.

[0009] La plicación de publicación U.S.. 2010/0058649 divulga un método de separación de una fracción de aceite de un producto de fermentación, ajustando el pH de la fracción de aceite, y recuperando del aceite de la fracción de aceite.

[0010] Wang (2008, Lipid Technology 20(9): 203-207) y Wang et al. (2009, J. Agric. Food Chem. 57: 2302-2307) han investigado el uso de enzimas y métodos de molienda y extrusión diferentes para mejorar la división de aceite.

[0011] Tanto vinaza entera como vinaza fina consisten en una gran cantidad de agua. Métodos para la deshidratación de vinaza se conocen en la técnica.

[0012] WO 2007/056321 divulga un método de deshidratación de la vinaza entera derivada de un proceso para la producción de etanol de un material que contiene almidón, sometiendo la vinaza entera a una enzima, tal como hemicelulasa y luego separando la vinaza entera en una fracción sólida y una fracción líquida.

[0013] Es un objeto de la presente invención proporcionar métodos mejorados de dehidratación de la vinaza entera.

Resumen de la invención

[0014] La presente invención se refiere a procesos de la deshidratación de la vinaza entera que comprende

(a) conversión de un material que contiene almidón en dextrinas con una alfa-amilasa;
(b) sacarificación de las dextrinas que utilizan una fuente de enzima generadora de carbohidrato para formar un azúcar;
(c) fermentación del azúcar en un medio de fermentación en un producto de fermentación que utiliza un organismo fermentador, donde el medio de fermentación comprende una hemicelulasa(s), una endoglucanasa(s), y un(os) polipéptido(s) GH61;
(d) destilación del producto de fermentación para formar la vinaza entera; y
(e) separación de la vinaza entera en la vinaza fina y sedimento húmedo; donde se transfiere más fase líquida a la vinaza fina.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

[0015] Acetilxilano esterasa: el término "acetilxilano esterasa" significa una esterasa de carboxilo (EC 3.1.1.72) que cataliza la hidrólisis de grupos de acetilo de xilano polimérico, xilosa acetilada, glucosa acetilada, acetato de alfa-naptil, y acetato de *p*-nitrofenilo.
Para fines de la presente invención, la actividad de acetilxilano esterasa es determinada usando el 0,5 mM *p*-nitrofenilacetato como sustrato en 50 mM pH de acetato sódico 5,0 que contiene 0,01% TWEEN™ 20.
Una unidad de acetilxilano esterasa es definida como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 micromol de anión de *p*-nitrofenolato por minuto a pH 5, 25°C.

[0016] Alfa-amilasas: el término "alfa-amilasa" significa una alfa-1.4-glucano-4-glucanohidrolasa (E.C. 3.2.1.1) que cataliza la hidrólisis de almidón y otros oligo y polisacáridos 1.4-glucosídicos lineales y ramificados.

[0017] Alfa-L-arabinofuranosidasa: el término "alfa-L-arabinofuranosidasa" significa una arabinofuranohidrolasa de alfa-L-arabinofuranosida (EC 3.2.1.55) que cataliza la hidrólisis de residuos de alfa-L-arabinofuranosida terminales no reductoros en alfa-L-arabinósidos.
La enzima actúa sobre alfa-L-arabinofuranósidos, alfa-L-arabinanos que contienen enlaces (1,3)- y/o (1,5), arabinoxilanas, y arabinogalactanos.
Alfa-L-arabinofuranosidasa es también conocida como arabinosidasa, alfa-arabinosidasa, alfa-L-arabinosidasa, alfa-arabinofuranosidasa, alfa-L-arabinofuranosidasa polisacárida, hidrolasa de alfa-L-arabinofuranosida, L-arabinosidasa, o alfa-L-arabinanasa.
Para fines de la presente invención, la actividad de alfa-L-arabinofuranosidasa es determinada usando 5 mg de arabinoxilano de trigo de viscosidad media (Megazyme International Ireland, Ltd., Bray, Co. Wicklow, Ireland) por ml de 100 mM acetato sódico de pH 5 en un volumen total de 200 microlitros durante 30 minutos a 40°C seguido de análisis de arabinosa por cromatografía en columna AMINEX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

[0018] Alfa-glucuronidasa: el término "alfa-glucuronidasa" significa una glucuronohidrolasa de alfa-D-glucosiduronato (EC 3.2.1.139) que cataliza la hidrólisis de un alfa-D-glucuronósido para D-glucuronato y un alcohol.
Para fines de la presente invención, la actividad de alfa-glucuronidasa se determina según de Vries, 1998, J. Bacteriol. 180: 243-249.
Una unidad de alfa-glucuronidasa iguala la cantidad de enzima capaz de liberar 1 micromol de ácido glucurónico o 4-O-metilglucurónico por minuto a pH 5, 40°C.

[0019] Beta-glucosidasa: el término "beta-glucosidasa" significa una glucohidrolasa de beta-d-glucósido (E.C. 3.2.1.21), que cataliza la hidrólisis de residuos de beta-D-glucosa no-reducida terminal al liberar beta-D-glucosa.

Para fines de la presente invención, la actividad de beta-glucosidasa se determina según el procedimiento básico descrito por Venturi et al., 2002, Extracellular beta-D-glucosidase from Chaetomium thermophilum var. coprophilum: production, purification and some biochemical properties, J. Basic Microbiol. 42: 55-66.
Una unidad de beta-glucosidasa es definida como 1,0 micromol de anión de *p*-nitrofenolato producido por minuto a 25°C, pH 4,8 de 1 mM *p*-nitrofenil-beta-D-glucopiranósido como sustrato en 50 mM citrato sódico que contiene 0,01% TWEEN® 20.

[0020] Beta-xilosidasa: el término "beta-xilosidasa" significa una xilohidrolasa de beta-D-xilósido (E.C. 3.2.1.37) que cataliza la exohidrólisis de beta (1→4)-xilooligosacáridos cortos, para eliminar residuos de D-xilosa sucesiva de los terminales no-reducidos.
Para fines de la presente invención, una unidad de beta-xilosidasa es definida como 1,0 micromol de anión de *p*-nitrofenolato producido por minuto a 40°C, pH 5 de 1 mM *p*-nitrofenil-beta-D-xilósido como sustrato en 100 mM citrato sódico que contiene 0,01% TWEEN® 20.

[0021] Celobiohidrolasa: el término "celobiohidrolasa" significa una celobiohidrolasa de 1,4-beta-D-glucano (E.C. 3.2.1.91) que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en la celulosa, celooligosacáridos, o cualquier glucosa beta-1,4-ligada que contiene polímero, liberando celobiosa de las extremidades reductoras o no reductoras de la cadena (Teeri, 1997, Crystalline cellulose degradation: New insight into the function of cellobiohydrolases, Trends in Biotechnology 15: 160-167; Teeri et al., 1998, Trichoderma reesei cellobiohydrolases: why so efficient on crystalline cellulose?, Biochem. Soc. Trans. 26: 173-178).
La actividad de celobiohidrolasa se determina según los procedimientos descritos por Lever et al., 1972, Anal. Biochem. 47: 273-279; van Tilbeurgh et al., 1982, FEBS Letters, 149: 152-156; van Tilbeurgh and Claeyssens, 1985, FEBS Letters, 187: 283-288; and Tomme et al., 1988, Eur. J. Biochem. 170: 575-581.
En la presente invención, el método Tomme et al. puede utilizarse para decidir la actividad de celobiohidrolasa.

[0022] Material celulósico: el término "material celulósico" se refiere a cualquier material que contenga celulosa.
El polisacárido predominante en la pared celular primaria de biomasa es celulosa, el segundo más abundante es hemicelulosa, y el tercero es pectina.
La pared celular secundaria, producida después de que la célula haya parado de crecer, también contiene polisacáridos y se refuerza por lignina polimérica de manera covalente reticulada a hemicelulosa.
La celulosa es un homopolímero de anhidrocelobiosa y así un beta-(1-4)-D-glucano lineal, mientras que las hemicelulosas incluyen una variedad de compuestos, tales como xilanos, xiloglucanos, arabinoxilanas, y mananos en estructuras ramificadas complejas con un espectro de sustituyentes.
Aunque generalmente polimorfa, la celulosa se encuentra en tejido vegetal principalmente como una matriz de cristalino insoluble de cadenas de glucano paralelo.
Las hemicelulosas normalmente se enlazande hidrógeno a la celulosa, al igual que a otras hemicelulosas, lo que ayuda a estabilizar la matriz de pared celular.

[0023] La celulosa se encuentra generalmente, por ejemplo, en los tallos, hojas, cascarillas, cáscaras, y mazorcas de plantas u hojas, ramas, y madera de árboles.
El material celulósico puede ser, de manera no limitativa, material herbáceo (incluyendo cultivos energéticos), residuo agrícola, madera (incluyendo residuo de silvicultura), residuos sólidos municipales, papel de desecho, y pulpa y residuo de fábrica de papel (ver, por ejemplo, Wiselogel et al., 1995, in Handbook on Bioethanol (Charles E. Wyman, editor), pp. 105-118, Taylor & Francis, Washington D.C.; Wyman, 1994, Bioresource Technology 50: 3-16; Lynd, 1990, Applied Biochemistry and Biotechnology 24/25: 695-719; Mosier et al., 1999, Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, T. Scheper, managing editor, Volume 65, pp.23-40, Springer-Verlag, New York).
Se entiende aquí que la celulosa puede estar en forma de lignocelulosa, un material de pared celular vegetal que contiene lignina, celulosa, y hemicelulosa en una matriz mezclada.
En un aspecto preferido, el material celulósico es cualquier material de biomasa.
En otro aspecto preferido, el material celulósico es lignocelulosa, que comprende celulosa, hemicelulosas, y lignina.

[0024] En un aspecto, el material celulósico es material herbáceo (incluyendo cultivos energéticos).
En otro aspecto, el material celulósico es residuo agrícola.
En otro aspecto, el material celulósico es madera (incluyendo residuo de silvicultura).
En otro aspecto, el material celulósico es residuos sólidos municipales.
En otro aspecto, el material celulósico es papel de desecho.
En otro aspecto, el material celulósico es pulpa y residuo de fábrica de papel.

[0025] En otro aspecto, el material celulósico es rastrojos de maíz.
En otro aspecto, el material celulósico es paja de trigo.
En otro aspecto, el material celulósico es bagazo.
En otro aspecto, el material celulósico es mazorca de maíz.
En otro aspecto, el material celulósico es pasto varilla.
En otro aspecto, el material celulósico es fibra de maíz.

En otro aspecto, el material celulósico es paja de arroz.
En otro aspecto, el material celulósico es miscanto.
En otro aspecto, el material celulósico es piel de naranja.
En otro aspecto, el material celulósico es álamo.
En otro aspecto, el material celulósico es pino.
En otro aspecto, el material celulósico es sauce.
En otro aspecto, el material celulósico es eucalipto.

[0026] En otro aspecto, el material celulósico es celulosa microcristalina.
En otro aspecto, el material celulósico es celulosa bacteriana.
En otro aspecto, el material celulósico es celulosa algal.
En otro aspecto, el material celulósico es linter de algodón.
En otro aspecto, el material celulósico es celulosa tratada de ácido fosfórico amorfo.
En otro aspecto, el material celulósico es papel de filtro.

[0027] En otro aspecto, el material celulósico es una biomasa acuática.
Como se utiliza en este caso el término "biomasa acuática" significa biomasa producida en un ambiente acuático por un proceso de fotosíntesis.
La biomasa acuática puede ser algas; plantas sumergidas; plantas emergentes; y plantas de hoja flotante.

[0028] El material celulósico se puede utilizar como es o se puede someter a pretratamiento, que usa métodos convencionales conocidos en la técnica, como se describe en este caso.
En un aspecto preferido, el material celulósico es pretratado.

[0029] Enzima celulolítica o celulasa: el término "enzima celulolítica" o "celulasa" significa una o más (por ejemplo; varias) enzimas que hidrolizan un material celulósico.
Tales enzimas incluyen endoglucanasa(s), celobiohidrolasa(s), beta-glucosidasa(s), o combinaciones de las mismas.
Los dos métodos básicos para medir actividad celulolítica incluyen: (1) medición de la actividad celulolítica total, y (2) medición de las actividades celulolíticas individuales (endoglucanasas, celobiohidrolasas, y beta-glucosidasas) como revisadas en el Zhang et al., Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, 2006, Biotechnology Advances 24: 452-481.
La actividad celulolítica total es normalmente medida usando sustratos insolubles, incluyendo papel de filtro Whatman Nº1, celulosa microcristalina, celulosa bacteriana, celulosa algal, algodón, lignocelulosa pretratada, etc.
El ensayo de actividad celulolítica total más común es el ensayo de papel de filtro que usa papel de filtro Whatman Nº1 como el sustrato.
El ensayo fue establecido por la Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (Ghose, 1987, Measurement of cellulase activities, Pure Appl. Chem. 59: 257-68).

[0030] Para fines de la presente invención, la actividad enzimática celulolítica se determina por la medición del aumento en la hidrólisis de un material celulósico por enzima(s) celulolítica bajo las condiciones siguientes: 1-20 mg de enzima celulolítica proteína/g de celulosa en PCS durante 3-7 días a una temperatura adecuada, por ejemplo, 50°C, 55°C, o 60°C, en comparación con una hidrólisis de control sin adición de proteína enzimática celulolítica.
Condiciones típicas son reacciones 1 ml, PCS lavado o sin lavar, 5% sólidos insolubles, 50 mM pH de acetato sódico 5,1 mM $MnSO_4$, 50°C, 55°C, o 60°C, 72 horas, análisis de azúcar por columna AMINEX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

[0031] Secuencia codificante: el término "secuencia codificante" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto de polipéptido.
Los límites de la secuencia codificantes son generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que empieza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG y extremidades con un codón de terminación tal como, TAA TAG, y TGA.
La secuencia codificante puede ser un polinucleótido de ADN, ADNc, sintético, o recombinante.

[0032] Secuencia de control: el término "secuencia de control" se refiere a todos los componentes necesarios para la expresión de un polinucleótido que codifica una alfa-amilasa de la presente invención.
Cada secuencia de control puede ser nativa o extranjera al polinucleótido que codifica la alfa-amilasa o nativa o extranjero entre sí.
Tales secuencias de control incluyen, pero de forma no limitativa, un líder, secuencia de poliadenilación, secuencia de propéptido, promotor, secuencia de péptido señal, y terminador de transcripción.
Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor, y señales de parada transcripcional y traslacional.
Las secuencias de control se pueden proporcionar con enlaces con motivo de introducir sitios de restricción específicos que facilitan el ligamiento de las secuencias de control con la región de codificación del polinucleótido que codifica una alfa-amilasa.

[0033] Endoglucanasa: el término "endoglucanasa" significa una endo-1,4-(1,3;1,4)-beta-D-glucano 4-glucanohidrolasa (E.C. 3.2.1.4), que cataliza endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en la celulosa, derivados químicos de la celulosa (tales como carboximetilcelulosa y celulosa de hidroxietilo), liquenina, beta-1,4 enlaces en beta-1,3 glucanos mezclados tales como beta-D-glucanos de cereal o xiloglucanos, y otro material vegetal que contenga componentes celulósicos.
La actividad de endoglucanasa se puede determinar por la reducción de medición en la viscosidad de sustrato o aumento en la reducción de extremidades determinado por un ensayo de azúcar reductor (Zhang et al., 2006, Biotechnology Advances 24: 452-481).
Para fines de la presente invención, la actividad de endoglucanasa es determinada usando carboximetilo celulosa (CMC) como sustrato según el procedimiento Ghose, 1987, Pure and Appl. Chem. 59: 257-268, a pH 5, 40°C.

[0034] Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero no limitado, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional, y secreción.

[0035] Vector de expresión: el término "expression vector" significa una molécula de ADN lineal o circular que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido y está operativamente enlazado a nucleótidos adicionales que proveen a su expresión.

[0036] Glicósido hidrolasa de familia 61: el término "glicósido hidrolasa de familia 61" o "familia GH61" o "GH61" significa un polipéptido decreciente en la familia glicósido hidrolasa 61 según Henrissat, 1991, A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities, Biochem. J. 280: 309-316, and Henrissat and Bairoch, 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, Biochem. J. 316: 695-696.
Las enzimas en esta familia fueron originalmente clasificadas como una familia glicósido hidrolasa en base a la medición de actividad de endo-1,4-beta-D-glucanasa muy débil en un miembro de la familia.
La estructura y modo de acción de estas enzimas son ciertamente no canónicas y no se pueden considerar como glicosidasas bona fide.
Sin embargo, se mantienen en la clasificación CAZy basándose en su capacidad para mejorar la descomposición de lignocelulosa cuando se usa conjuntamente con una celulasa o una mezcla de celulasas.

[0037] Esterasa de ácido ferúlico o feruloil esterasa: el término "esterasa de ácido ferúlico" o "feruloil esterasa" significa una hidrolasa de azúcar 4-hidroxi-3-metoxi-cinamoilo (EC 3.1.1.73) que cataliza la hidrólisis del grupo 4-hidroxi-3-metoxicinamoil (feruloilo) de un azúcar esterificado, que es normalmente arabinosa en sustratos "naturales", para producir ferulato (4-hidroxi-3-metoxicinamato).
Feruloil esterasa es también conocido como esterasa de ácido ferúlico, esterasa de hidroxicinamoilo, FAE-III, hidrolasa de éster de cinamoilo, FAEA, cinnAE, FAE-I, o FAE-II.
Para fines de la presente invención, la actividad feruloil esterasa es determinada usando el 0.5 mM *p*-nitrofenilferulato como sustrato en 50 mM pH de acetato sódico 5,0.
Una unidad de feruloil esterasa iguala la cantidad de enzima capaz de liberar 1 micromol de anión de *p*-nitrofenolato por minuto a pH 5,25°C.

[0038] Enzima hemicelulolítica o hemicelulasa: el término "enzima hemicelulolítica" o "hemicelulasa" significa una o más (por ejemplo; varias) enzimas que hidrolizan un material hemicelulósico.
Ver, por ejemplo, Shallom and Shoham, 2003, Microbial hemicellulases, Current Opinion In Microbiology 6(3): 219-228.
Hemicelulasas son componentes clave en la degradación de biomasa vegetal.
Ejemplos de hemicelulasas incluyen, pero de forma no limitativa, una esterasa de acetilmanano, una esterasa de acetixileno, una arabinanasa, una arabinofuranosidasa, una esterasa de ácido cumárico, una feruloil esterasa, una galactosidasa, una glucuronidasa, una esterasa de glucuronoil, una mananasa, una manosidasa, una xilanasa, y una xilosidasa.
Los sustratos de estas enzimas, las hemicelulosas, son un grupo heterogéneo de polisacáridos ramificados y lineales que están ligados vía enlaces de hidrógeno a las microfibrillas de celulosa en la pared celular vegetal, con lo que los reticulam en una red robusta.
Las hemicelulosas están también fijadas de manera covalente a lignina, con lo que forman junto con celulosa una estructura altamente compleja.
La estructura y organización variable de hemicelulosas requieren la acción convenida de muchas enzimas para su degradación completa.
Los módulos catalíticos de hemicelulasas son bien glicósido hidrolasas (GH) que hidrolizan enlaces glicosídicos, o esterasas de carbohidrato (CE), que hidrolizan enlaces de éster de acetato o grupos laterales de ácido ferúlico.
Estos módulos catalíticos, basados en homología de su secuencia primaria, se pueden asignar en las familias GH y CE marcados por números.
Algunas familias, con pliegue similar total, pueden ser además reagrupadas en clanes, marcados alfabéticamente (por ejemplo, GH-A).
Una clasificación más informativa y actualizada de estas y otras enzimas activas de carbohidrato está disponible en la base de datos de enzimas activas de carbohidrato (CAZy).

Actividades enzimáticas hemicelulolíticas se pueden medir según Ghose and Bisaria, 1987, Pure & Appl. Chem. 59: 1739-1752, a una temperatura adecuada, por ejemplo, 50°C, 55°C, o 60°C.

[0039] Célula huésped: el término "célula huésped" significa cualquier tipo celular que es susceptible a transformación, transfección, transducción, y similar con un constructo de ácidos nucleicos o vector de expresión que comprende un polinucleótido.
El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

[0040] Constructo de ácidos nucleicos: el término "constructo de ácidos nucleicos" significa una molécula de ácido nucleico, bien uni- o bicatenaria, que es aislada de un gen de origen natural o se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de una manera que de otro modo no existirían en la naturaleza o que son sintéticos.
El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimos con el término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante.

[0041] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" significa una configuración en la que una secuencia de control se coloca en una posición apropiada relativa a la secuencia de codificación de la secuencia de polinucleótido tal que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

[0042] Fragmento de polipéptido: el término "fragmento de polipéptido" significa un polipéptido con uno o más (varios) aminoácidos eliminados del amino y/o carboxilo terminal de un polipéptido maduro; donde el fragmento tiene actividad enzimática.

[0043] Polipéptido que tiene actividad de mejora celulolítica: el término "polipéptido que tiene actividad de mejora celulolítica" significa un polipéptido GH61 que cataliza la mejora de la hidrólisis de un material celulósico por enzima con actividad celulolítica.
Para fines de la presente invención, actividad de mejora celulolítica se determina por la medición del aumento en azúcares reductores o el aumento del total de celobiosa y glucosa de la hidrólisis de un material celulósico por enzima celulolítica bajo las condiciones siguientes: 1-50 mg de total proteína/g de celulosa en PCS, donde la proteína total está compuesta de 50-99,5% p/p proteína enzimática celulolítica y 0,5-50% p/p proteína de un polipéptido GH61 que tiene actividad de mejora celulolítica durante 1-7 días a una temperatura adecuada, por ejemplo, 50°C, 55°C, o 60°C, en comparación con una hidrólisis de control con carga de proteína total igual sin actividad de mejora celulolítica (1-50 mg de proteína celulolítica/g de celulosa en PCS).
En un aspecto preferido, una mezcla de CELLUCLAST® 1.5L (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) en presencia de 2-3% de peso de proteína total de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (recombinantemente producida en *Aspergillus oryzae* según WO 02/095014) o 2-3% de peso de proteína total de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (recombinantemente producida en *Aspergillus oryzae* como se describe en WO 2002/095014) de carga de proteína de celulasa se usa como la fuente de la actividad celulolítica.

[0044] Los polipéptidos GH61 que tienen actividad de mejora celulolítica mejoran la hidrólisis de un material celulósico catalizado por enzima con actividad celulolítica reduciendo la cantidad de enzima celulolítica requerida para alcanzar el mismo grado de hidrólisis preferiblemente al menos 1,01 veces, más preferiblemente al menos 1,05 veces, más preferiblemente al menos 1,10 veces, más preferiblemente al menos 1,25 veces, más preferiblemente al menos 1,5 veces, más preferiblemente al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 3 veces, más preferiblemente al menos 4-veces, más preferiblemente al menos 5 veces, aún más preferiblemente al menos 10-veces, y de la forma más preferible al menos 20-veces.

[0045] Rastrojos de maíz pretratados: el término "PCS" o "rastrojos de maíz pretratados" significa un material celulósico derivado del forraje de maíz por tratamiento con calor y ácido sulfúrico diluido.

[0046] Identidad de secuencia: la relación entre dos secuencias de aminoácido o entre dos secuencias de nucleótidos es descrita por el parámetro "identidad de secuencia".

[0047] Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos es determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman and Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) as implemented in the Needle program of the EMBOSS package (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferiblemente versión 3.0.0 o más avanzada.
Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5, y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62).
El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y es calculado de la siguiente manera:

(Residuos idénticos x 100)/(Longitud de alineamiento – Número total de espacios en alineamiento)

[0048] Para fines de la presente invención, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias desoxirribonucleótidas es determinado utilizando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, supra) como implementado en el programa de Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, supra), preferiblemente versión 3.0.0 o más avanzada.
Los parámetros opcionales usados son penalización por apertura de espacio de 10, penalización por extensión de espacio de 0,5, y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4).
El resultado de Needle etiquetado "identidad más larga" (obtenido utilizando la opción -nobrief) se usa como la identidad en porcentaje y es calculado de la siguiente manera:

(Desoxirribonucleótidos idénticos x 100)/(Longitud de alineamiento – Número total de espacios en alineamiento)

[0049] Material que contiene xilano: el término "material que contiene xilano" significa cualquier material que comprende un polisacárido de pared de célula de planta con un esqueleto de residuos de xilosa beta-(1-4)-enlazada.
Xilanos de plantas terrestres son heteropolímeros que poseen un esqueleto de beta-(1-4)-D-xilopiranosa, que se ramifica por cadenas de carbohidrato cortas.
Comprenden ácido D-glucurónico o su éter de 4-O-metilo, L-arabinosa, y/o varios oligosacáridos, compuestos por D-xilosa, L-arabinosa, D- o L-galactosa, y D-glucosa.
Polisacáridos tipo xilano se pueden dividir en homoxilanos y heteroxilanos, que incluyen glucuronoxilanos, (arabino)glucuronoxilanos, (glucurono)arabinoxilanos, arabinoxilanas, y heteroxilanos complejos.
Ver, por ejemplo, Ebringerova et al., 2005, Adv. Polym. Sci. 186: 1-67.

[0050] En los métodos de la presente invención, cualquier material que contiene xilano puede ser utilizado.
En un aspecto preferido, el material que contiene xilano es lignocelulosa.

[0051] Actividad de degradación de xilano o actividad xilanolítica: el término "actividad de degradación de xilano" o "actividad xilanolítica" significa una actividad biológica que hidroliza material que contiene xilano.
Los dos métodos básicos para medir actividad xilanolítica incluyen: (1) medición de la actividad xilanolítica total, y (2) medición de las actividades xilanolíticas individuales (por ejemplo, acetilxilano esterasas, esterasas de alfa-glucuronil, alfa-glucuronidasas, arabinofuranosidasas, beta-xilosidasas, endoxilanasas, y feruloilo esterasas).
Progreso reciente en ensayos de enzimas xilanolíticas fue resumido en diferentes publicaciones incluyendo Biely and Puchard, Recent progress in the assays of xylanolytic enzymes, 2006, Journal of the Science of Food and Agriculture 86(11): 1636-1647; Spanikova and Biely, 2006, Glucuronoyl esterase - Novel carbohydrate esterase produced by Schizophyllum commune, FEBS Letters 580(19): 4597-4601; Herrmann et al., 1997, The beta-D-xylosidase of Trichoderma reesei is a multifunctional beta-D-xylan xylohydrolase, Biochemical Journal 321: 375-381.

[0052] Actividad de degradación de xilano total se puede medir por la determinación de los azúcares reductores formados de varios tipos de xilano, incluyendo, por ejemplo, espelta de avena, madera de haya, y xilanos de madera de alerce, o por determinación fotométrica de fragmentos de xilano teñido liberado de varios xilanos teñidos de manera covalente.
El ensayo de actividad xilanolítica total más común se basa en producción de azúcares reductores de glucuronoxilano de 4-O-metilo polimérico como se describe en Bailey, Biely, Poutanen, 1992, Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity, Journal of Biotechnology 23(3): 257-270.
Actividad de xilanasa puede también ser determinada con 0,2% AZCL-arabinoxilano como sustrato en 0,01% TRITON® X-100 y 200 mM pH de tampón de fosfato sódico 6 a 37°C.
Una unidad de actividad de xilanasa es definida como 1,0 micromol de azurina producida por minuto a 37°C, pH 6 de 0,2% AZCL-arabinoxilano como sustrato en 200 mM tampón de pH 6 de fosfato sódico.

[0053] Para fines de la presente invención, la actividad de degradación de xilano se determina por la medición del aumento en la hidrólisis de xilano de madera de abedul (Sigma Chemical Co., Inc., St. Louis, MO, USA) por enzima(s) que degradan xilano bajo las siguientes condiciones típicas: 1 ml reacciones, 5 mg/ml sustrato (sólidos totales), 5 mg de xilanolítica proteína/g de sustrato, 50 mM pH de acetato sódico 5, 50°C, 24 horas, análisis de azúcar que usa ensayo hidrácida de ácido *p*-hidroxibenzoico (PHBAH) como se describe por Lever, 1972, A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates, Anal. Biochem 47: 273-279.

[0054] Xilanasa: el término "xilanasa" significa una 1,4-beta-D-xilan-xilohidrolasa (E.C. 3.2.1.8) que cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en xilanos.
Para fines de la presente invención, la actividad de xilanasa se determina con 0,2% AZCL-arabinoxilano como sustrato en 0,01% TRITON® X-100 y 200 mM pH de tampón de fosfato sódico 6 a 37°C.
Una unidad de actividad de xilanasa es definida como 1,0 micromol de azurina producida por minuto a 37°C, pH 6 de 0,2% AZCL-arabinoxilano como sustrato en 200 mM tampón de fosfato sódico de pH 6.

Procesos de la presente invención

[0055] La presente invención se refiere a un procedimiento de deshidratación de la vinaza entera, que comprende

(a) conversión de un material que contiene almidón en dextrinas con una alfa-amilasa;
(b) sacarificación de las dextrinas que utilizan una fuente de enzima generadora de carbohidrato para formar un azúcar;
(c) fermentación del azúcar en un medio de fermentación en un producto de fermentación que utiliza un organismo fermentador, donde el medio de fermentación comprende una hemicelulasa(s), una endoglucanasa(s), y un(os) polipéptido(s) GH61;
(d) destilación del producto de fermentación para formar la vinaza entera; y
(e) separación de la vinaza entera en la vinaza fina y sedimento húmedo; donde se transfiere más fase líquida a la vinaza fina.

[0056] En una forma de realización la endoglucanasa(s) se añade en una cantidad de 0,01-1,0 EGU/g, por ejemplo 0,02-0,08, 0,025-0,06, 0,025-0,05, o 0,03-0,04 EGU/g sólidos secos.

[0057] En una forma de realización la endoglucanasa(s) se añade en una cantidad de 1-30, por ejemplo, 5-30, 7-25, 10-20, 10-17, o 12-15 microgramos/g sólidos secos.

[0058] En una forma de realización la hemicelulasa(s) se añade en una cantidad de 0,01-1,0, por ejemplo, 0,015-0,08, 0,015-0,06, 0,015-0,04, o 0,02-0,03 FXU/g sólidos secos.

[0059] En una forma de realización la hemicelulasa(s) se añade en una cantidad de 1-30, por ejemplo, 5-30, 7-25, 10-20, 10-17, o 12-15 microgramos/g sólidos secos.

Procesos para producir productos de fermentación de un material que contiene almidón gelatinizado

[0060] Se describe un proceso para producir un producto de fermentación que comprende:

(a) licuefacción de un material que contiene almidón en presencia de una alfa-amilasa;
(b) sacarificación del material licuado obtenida en el paso (a) utilizando una enzima generadora de fuente de carbohidratos; y
(c) fermentación utilizando un organismo fermentador en presencia de una hemicelulasa(s).

[0061] El proceso para producir un producto de fermentación incluye los pasos de:

(a) licuefacción del material que contiene almidón en presencia de una alfa-amilasa;
(b) sacarificación del material licuado obtenida en el paso (a) utilizando una enzima generadora de fuente de carbohidratos; y
(c) fermentación utilizando un organismo fermentador en presencia de una(s) endoglucanasa(s) y una(s) hemicelulasa(s), donde la(s) endoglucanasa(s) está presente en una cantidad de 0.01-1.0 EGU/g sólidos secos y en una cantidad de 1-30 microgramos/g sólidos secos y la hemicelulasa(s) está presente en una cantidad de 0.01-1.0 sólidos secos FXU/g y en una cantidad de 1-30 microgramos/g sólidos secos.

[0062] Los pasos de sacarificación y fermentación se pueden realizar bien consecutivamente o simultáneamente. La hemicelulasa(s) y/o endoglucanasa(s) se puede adicionar durante la sacarificación y/o fermentación cuando el proceso se realiza como un proceso de sacarificación y fermentación secuencial y antes o durante la fermentación cuando los pasos (b) y (c) se realizan simultáneamente (proceso SSF).

[0063] La licuefacción preferiblemente se realiza en presencia de una alfa-amilasa, preferiblemente, una alfa-amilasa bacteriana o alfa-amilasa fúngica ácida. En una forma de realización, una pululanasa, isoamilasa y/o fitasa se añade durante la licuefacción. El organismo fermentador es preferiblemente una levadura, por ejemplo, una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*. Los organismos fermentadores adecuados se enumeran en la sección "Organismos fermentadores" de abajo.

[0064] La licuefacción se puede realizar como un proceso de lodo caliente de tres pasos. El lodo se calienta a entre 60-95°C, preferiblemente 80-85°C y una alfa-amilasa se añade para iniciar la licuefacción (dilución). Luego el lodo se puede cocer por chorro a una temperatura entre 95-140°C, preferiblemente 105-125°C durante aproximadamente 1-15 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 3-10 minutos, especialmente alrededor de aproximadamente 5 minutos. El lodo se enfría a 60-95°C y se añade más alfa-amilasa para completar la hidrólisis (licuefacción secundaria). El proceso de licuefacción normalmente se realiza a un pH de 4.0 a 6.5, en particular, a un pH de 4.5 a 6.

[0065] La sacarificación se puede realizar en condiciones bien conocidas en la técnica con una enzima de sacarificación, por ejemplo, beta-amilasa, glucoamilasa o amilasa maltogénica, y opcionalmente una enzima desramificante, tal como una isoamilasa o una pululanasa. Por ejemplo, un proceso de sacarificación completa puede durar de aproximadamente 24 a hasta aproximadamente 72 horas, sin embargo, resulta común hacer una pre-sacarificación durante típicamente 40-90 minutos a una temperatura entre 30-65°C, típicamente aproximadamente 60°C, seguida de sacarificación completa durante la fermentación en un proceso de sacarificación y fermentación simultánea (proceso SSF). La sacarificación típicamente se realiza a una temperatura de 20-75°C, preferiblemente de 40-70°C, típicamente alrededor de 60°C y a un pH entre 4 y 5, normalmente en alrededor de pH 4.5.

[0066] El proceso más ampliamente usado para producir un producto de fermentación, especialmente etanol, es el proceso de sacarificación y fermentación simultánea (SSF), donde no hay fase de retención para la sacarificación, lo que significa que un organismo fermentador, tal como una levadura, y enzima(s), incluyendo la hemicelulasa(s) y/o endoglucanasa(s) se puede añadir. SSF típicamente se realiza a una temperatura de 25°C a 40°C, tal como de 28°C a 35°C, de 30°C a 34°C, preferiblemente alrededor de aproximadamente 32°C. En una forma de realización, la fermentación está en curso durante 6 a 120 horas, en particular, 24 a 96 horas.

[0067] En una forma de realización particular, el proceso descrito donde comprende además, antes del paso (a), los pasos de:

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

[0068] El lodo acuoso puede contener de 10-55 p/p % sólidos secos (DS), preferiblemente 25-45 p/p % sólidos secos (DS), más preferiblemente 30-40 p/p % sólidos secos (DS) del material que contiene almidón. El lodo se calienta por encima de la temperatura de gelatinización y una alfa-amilasa, preferiblemente una alfa-amilasa fúngica bacteriana y/o ácida se puede adicionar para iniciar licuefacción (dilución). El lodo se puede cocer por chorro para gelatinizar adicionalmente el lodo antes de ser sometido a una alfa-amilasa en el paso (a).

Procesos para producir productos de fermentación a partir de un material que contiene almidón no gelatinizado

[0069] Se describen procesos para producir un producto de fermentación a partir de un material que contiene almidón sin gelatinización (es decir, sin cocción) del material que contiene almidón en presencia de una hemicelulasa(s).

[0070] También se describen procesos para producir un producto de fermentación a partir de un material que contiene almidón sin gelatinización (es decir, sin cocción) del material que contiene almidón donde una endoglucanasa(s) y una hemicelulasa(s) están presentes durante el proceso de hidrólisis de almidón crudo, donde la endoglucanasa(s) está presente en una cantidad de 0.01-1.0 EGU/g sólidos secos y en una cantidad de 1-30 microgramos/g sólidos secos, la hemicelulasa(s) está presente en una cantidad de 0.01-1.0 sólidos secos FXU/g y en una cantidad de 1-30 microgramos/g sólidos secos.

[0071] En estas formas de realización, el producto fermentador deseado, tal como etanol se produce a partir de un material que contiene almidón no gelatinizado. El proceso comprende simultáneamente sacarificación y fermentación de un material que contiene almidón, por ejemplo, almidón granulado, utilizando una alfa-amilasa, una enzima generadora de fuente de carbohidratos, y un organismo fermentador a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial del material que contiene almidón, en presencia de la endogluanasa(s) y/o hemicelulasa(s).

[0072] Como se utiliza en este caso, el término "temperatura de gelatinización inicial" significa la temperatura mínima a la que comienza la gelatinización de almidón. En general, el almidón calentado en agua empieza a gelatinizar entre aproximadamente 50°C y 75°C; la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón específico y puede determinarse rápidamente por el experto en la materia. Así, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según la especie de planta, a la variedad particular de las especias de planta al igual que con las condiciones de crecimiento. En el contexto de esta invención, la temperatura de gelatinización inicial de un material que contiene almidón dado se puede determinar como la temperatura a la que birrefringencia se pierde en 5% de los gránulos de almidón que utilizan el método descrito por Gorinstein y Lii, 1992, Starch/Starke 44(12): 461-466.

[0073] Un proceso RSH se conduce a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial, lo que significa que la temperatura típicamente se extiende en el rango entre 30-75°C, preferiblemente entre 45-

60°C. En una forma de realización, el proceso se realiza 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 32°C.

[0074] Una persona experta en la técnica puede fácilmente determinar qué dosis/cantidades de enzima y organismo fermentador usar.

[0075] En una forma de realización, un lodo de un material que contiene almidón, tal como almidón granulado, que tiene 10-55 p/p % sólidos secos (DS), preferiblemente 25-45 p/p % sólidos secos, más preferiblemente 30-40 p/p % sólidos secos del material que contiene almidón se puede preparar. El lodo puede incluir agua y/o aguas de proceso, tal como vinaza (vinaza reciclada), agua de lavado, condensado evaporador o destilado, agua de decapante lateral de destilación o agua de proceso de otras plantas de producto de fermentación. Debido a que el proceso de la invención RSH se realiza por debajo de la temperatura de gelatinización inicial y así no tiene lugar ningún aumento de viscosidad significativo, niveles altos de vinaza se pueden utilizar si se desea. En una forma de realización, el lodo acuoso contiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 70 vol. %, preferiblemente 15-60 vol. %, especialmente de aproximadamente 30 a 50 vol. % agua y/o aguas de proceso, tales como vinaza (vinaza reciclada), agua de lavado, condensado evaporador o destilado, agua de decapante lateral de destilación o agua de proceso de otras plantas de producto de fermentación, o combinaciones de las mismas o similar.

[0076] El material que contiene almidón se puede preparar reduciendo el tamaño de partícula, preferiblemente por molienda en húmedo o seco, de 0.05 a 3.0 mm, preferiblemente 0.1-0.5 mm. Después de ser sometido a un proceso de la invención al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o preferiblemente al menos 99% de los sólidos secos en el material que contiene almidón se convierten en un hidrolizado de almidón soluble.

Procesos para producir productos de fermentación a partir de un material que contiene lignocelulosa

[0077] Se describen procesos de producción de un producto de fermentación, que incluyen los pasos de:

(a) tratamiento previo de un material que contiene lignocelulosa;
(b) hidrolizado del material que contiene lignocelulosa pretratada; y
(c) fermentación utilizando un organismo fermentador en presencia de una hemicelulasa(s).

[0078] Se describen procesos de producción de un producto de fermentación, que incluyen los pasos de:

(a) tratamiento previo de un material que contiene lignocelulosa;
(b) hidrolización del material que contiene lignocelulosa pretratada; y
(c) fermentación utilizando un organismo fermentador en presencia de una endoglucanasa(s) y una hemicelulasa(s), donde la endoglucanasa(s) está presente en una cantidad de 0.01-1.0 EGU/g sólidos secos y en una cantidad de 1-30 microgramos/g sólidos secos, la hemicelulasa(s) está presente en una cantidad de 0.01-1.0 sólidos secos FXU/g y en una cantidad de 1-30 microgramos/g sólidos secos.

[0079] Los pasos (b) y (c) se pueden realizar separadamente o simultáneamente. Alternativamente, el paso (b) se puede iniciar seguido de la continuación del paso (b) con el paso (c), de otro modo conocido como una hidrólisis híbrida y proceso de fermentación.

[0080] El material que contiene lignocelulosa se puede pretratar antes de ser hidrolizado y fermentado. El objetivo del pretratamiento es separar y/o liberar celulosa, hemicelulosa y/o lignina y de esta manera mejorar el índice de hidrólisis enzimática.

[0081] Durante el pretratamiento, el material que contiene lignocelulosa puede estar presente en una cantidad entre 10-80 peso.%, por ejemplo, entre 20-50 peso. %.

[0082] El material que contiene lignocelulosa puede ser químicamente, mecánicamente y/o biológicamente pretratado antes de hidrólisis y/o fermentación. El tratamiento mecánico (frecuentemente referido como un pretratamiento físico) se puede utilizar solo o en combinación con hidrólisis posterior o simultánea, especialmente hidrólisis enzimática, para promover la separación y/o liberar celulosa, hemicelulosa y/o lignina.

[0083] Preferiblemente, el pretratamiento de sustancia química, mecánica y/o biológica se realiza antes de la hidrólisis y/o fermentación. Alternativamente, el pretratamiento de sustancia química, mecánica y/o biológica se

realiza simultáneamente con hidrólisis, tal como simultáneamente con adición de una o más enzimas celulolíticas, u otras actividades enzimáticas mencionadas abajo, para liberar azúcares fermentables, tales como glucosa y/o maltosa.

[0084] El pretratamiento de sustancia química se refiere a cualquier tratamiento de sustancia químics que promueva la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina. Los ejemplos de pasos de pretratamiento de sustancia química adecuados incluyen tratamiento con, por ejemplo, ácido diluído, cal, solvente alcalino orgánico, amoníaco, dióxido de azufre, dióxido de carbono. Además, la oxidación en húmedo e hidrotermólisis controlada por pH son también tratamientos previos de sustancia química contemplados.

[0085] Preferiblemente, el pretratamiento de sustancia química es tratamiento ácido, más preferiblemente, un tratamiento de ácido diluido continuo y/o moderado, tal como, tratamiento con ácido sulfúrico, u otro ácido orgánico, tal como ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico o una mezcla de los mismos. Otros ácidos también pueden ser usados. Tratamiento de ácido moderado en el contexto de la presente invención significa que el pH de tratamiento se extiende en el rango de 1-5, preferiblemente de pH 1-3. En una forma de realización específica, la concentración ácida está en el rango de 0.1 a 2.0 peso. % ácido, preferiblemente ácido sulfúrico. El ácido se puede mezclar o contactar con el material para ser fermentado según la invención y la mezcla se puede mantener a una temperatura en el rango de 160-220°C, tal como 165-195°C, para periodos que varían de minutos a segundos, por ejemplo, 1-60 minutos, tales como 2-30 minutos o 3-12 minutos. La adición de ácidos fuertes, tales como ácido sulfúrico se puede aplicar para eliminar hemicelulosa. Esto mejora la digestibilidad de celulosa.

[0086] Se ha mostrado que el tratamiento de solvente de celulosa convierte aproximadamente 90% de celulosa en glucosa. Se ha mostrado también que la hidrólisis enzimática podría ser mucho mayor cuando la estructura lignocelulósica se interrumpe. El alcalino H_2O_2, ozono, organosolv (usa ácidos Lewis, $FeCl_3$, $(Al)_2SO_4$ en alcoholes acuosos), glicerol, dioxano, fenol o etilenglicol están entre los solventes conocidos por interrumpir la estructura de celulosa y promover hidrólisis (Mosier et al., 2005, Bioresource Technology 96: 673-686).

[0087] El pretratamiento también puede ser un pretratamiento de sustancia química alcalina con base, por ejemplo, NaOH, Na_2CO_3 y/o amoníaco o similar. Los métodos de pretratamiento que usan amoníaco se describen en, por ejemplo, WO 2006/110891, WO 2006/110899, WO 2006/110900, WO 2006/110901.

[0088] Las técnicas de oxidación en húmedo implican el uso de agentes oxidantes, tales como: agentes oxidantes a base de sulfito o similar. Los ejemplos de tratamientos previos de solvente incluyen tratamiento con DMSO (dimetilsulfóxido) o similar. El pretratamiento químico es generalmente realizado durante 1 a 60 minutos, tal como de 5 a 30 minutos, pero se puede realizar durante periodos más cortos o más largos de tiempo en función del material para ser pretratado.

[0089] Otros ejemplos de métodos de pretratamiento adecuados se describen en Schell et al., 2003, Appl. Biochem and Biotechn. 105-108: 69-85, and Mosier et al., 2005, Bioresource Technology 96: 673-686, and U.S. application publication no. 2002/0164730.

[0090] El pretratamiento mecánico se refiere a cualquier pretratamiento mecánico o físico que promueva la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina de material que contiene lignocelulosa. Por ejemplo, el pretratamiento mecánico incluye varios tipos de fresado, irradiación, explosión de vaporización/vapor e hidrotermólisis.

[0091] El pretratamiento mecánico incluye trituración (reducción mecánica del tamaño de partícula). La trituración incluye molienda en seco, molienda en húmedo y fresado de bola vibratoria. El pretratamiento mecánico puede implicar alta presión y/o alta temperatura (explosión de vapor). En una forma de realización, alta presión significa presión en el rango de 300 a 600 psi, preferiblemente 400 a 500 psi, tal como alrededor de 450 psi. En una forma de realización de la invención, alta temperatura significa temperaturas en el rango de aproximadamente 100 a 300°C, preferiblemente de aproximadamente 140 a 235°C. En una forma de realización preferida, el pretratamiento mecánico es un procesamiento por lote, sistema de hidrolizador de pistola de vapor que usa alta presión y alta temperatura tal como se ha definido anteriormente. Para ello, se puede utilizar un hidrolizador Sunds (disponible de Sunds Defibrator AB (Suecia).

[0092] En una forma de realización, ambos tratamientos previos de sustancia química y mecánica se realizan implicando, por ejemplo, ambos pretratamiento de ácido diluido o moderado y alta temperatura y tratamiento de presión. El pretratamiento de sustancia química y mecánica se puede realizar consecutivamente o simultáneamente, como se desee.

[0093] Por consiguiente, en una forma de realización preferida, el material que contiene lignocelulosa está sujeto a pretratamiento de sustancia química y mecánica para promover la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina.

[0094] En una forma de realización preferida el pretratamiento se realiza como un paso de explosión de vapor de ácido diluido y/o moderado. En otra forma de realización preferida, el pretratamiento se realiza como un paso de explosión de fibra de amoníaco (o etapa de pretratamiento AFEX).

[0095] El pretratamiento biológico se refiere a cualquier pretratamiento biológico que promueva la separación y/o liberación de celulosa, hemicelulosa y/o lignina del material que contiene lignocelulosa. Las técnicas de pretratamiento biológico pueden implicar la aplicación de microorganismos solubilizantes de lignina (ver, por ejemplo, Hsu, T.A., 1996, Pretreatment of biomass, in Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C. E., ed., Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212; Ghosh and Singh, 1993, Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass, Adv. Appl. Microbiol. 39: 295-333; McMillan, 1994, Pretreating lignocellulosic biomass: a review, in Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, Himmel, M. E., Baker, J. O., and Overend, R. P., eds., ACS Symposium Series 566, American Chemical Society, Washington, DC, chapter 15; Gong, C. S., Cao, N. J., Du, J., and Tsao, G. T., 1999, Ethanol production from renewable resources, in Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, Scheper, T., ed., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany, 65: 207-241; Olsson and Hahn-Hagerdal, 1996, Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production, Enz. Microb. Tech. 18: 312-331; and Vallander and Eriksson, 1990, Production of ethanol from lignocellulosic materials: State of the art, Adv. Biochem. Eng./Biotechnol. 42: 63-95).

[0096] El material pretratado es hidrolizado, preferiblemente enzimáticamente, antes y/o durante la fermentación. El material que contiene lignocelulosa pretratada se puede hidrolizar para romper el sello de lignina e interrumpir la estructura cristalina de celulosa. En una forma de realización preferida, la hidrólisis se realiza enzimáticamente por una o más hidrolasas (clase E.C. 3 según la nomeclatura enzimática), preferiblemente una o más carbohidrasas con enzimas celulolíticas y enzimas hemicelulolíticas o una combinación de las mismas. Además, alfa-amilasa, glucoamilasa, proteasa y/o similar pueden estar presentes durante hidrólisis y/o fermentación ya que el material que contiene lignocelulosa puede incluir algún, por ejemplo, material amiláceo y/o proteináceo.

[0097] La(s) enzima(s) usada(s) para hidrólisis son capaces de directa o indirectamente convertir polímeros de carbohidrato en azúcares fermentables, tal como glucosa y/o maltosa, que se pueden fermentar en un producto de fermentación deseado, tal como etanol.

[0098] En una forma de realización, la(s) carbohidrasa(s) tiene(tienen) actividad celulolítica (celobiohidrolasa, endoglucanasa y beta-glucosidasa) y/o hemicelulolítica (por ejemplo; xilanasa).

[0099] En una forma de realización, la hidrólisis se realiza utilizando una preparación enzimática celulolítica que comprende además uno o más polipéptidos que tienen actividad de mejora celulolítica. En una forma de realización preferida el polipéptido(s) que tiene actividad de mejora celulolítica es(son) de origen de la familia GH61A. Los ejemplos de preparaciones enzimáticas celulolíticas adecuadas y preferidas y polipéptidos que tienen actividad de mejora celulolítica se describen en la sección "Enzimas celulolíticas" y secciones "Polipéptidos de mejora celulolítica" de abajo.

[0100] Las enzimas adecuadas se describen en la sección de "Enzimas" de abajo.

[0101] Los polímeros de hemicelulosa se pueden descomponer por enzimas hemicelulolíticas y/o hidrólisis ácida para liberar sus cinco y seis componentes de azúcar de carbono. Los seis azúcares de carbono (hexosas), tales como arabinosa, galactosa, glucosa y manosa, pueden rápidamente ser fermentados para productos de fermentación tal como acetona, butanol, ácido cítrico, etanol, ácido fumárico, glicerol, etc. mediante organismos fermentadores adecuados incluyendo levadura.

[0102] La levadura es el organismo fermentador preferido para la fermentación de etanol. Se prefieren las cepas de *Saccharomyces*, especialmente cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, preferiblemente cepas que son resistentes hacia niveles altos de etanol, es decir, hasta, por ejemplo, aproximadamente 10, 12, 15 o 20 vol. % o más etanol.

[0103] La hidrólisis enzimática preferiblemente se realiza en un medio acuoso adecuado bajo condiciones que pueden ser fácilmente determinadas por un experto en la técnica. En una forma de realización preferida, la hidrólisis se realiza en condiciones adecuadas, preferiblemente óptimas, para la(s) enzima(s) en cuestión.

[0104] El tiempo de proceso adecuado, temperatura y condiciones de pH pueden ser determinados rápidamente por un experto en la técnica. Preferiblemente, la hidrólisis se realiza a una temperatura entre 25 y 70°C, por ejemplo, entre 40 y 60°C, especialmente alrededor de 50°C. El paso se realiza preferiblemente a un pH en el rango de 3-8, por ejemplo, pH 4-6. La hidrólisis típicamente se realiza durante entre 12 y 96 horas, por ejemplo, entre 16 a 72 horas, en particular entre 24 y 48 horas.

[0105] En una forma de realización, el material que contiene lignocelulosa pretratada se lava y/o destoxifica antes o después del paso de hidrólisis (b). Esto puede mejorar la fermentabilidad de, por ejemplo, material que contiene lignocelulosa hidrolizada de ácido diluido, tal como rastrojos de maíz. La detoxificación se puede realizar en cualquier vía adecuada, por ejemplo, por extracción de vapor, evaporación, intercambio iónico, resina o tratamiento de carbón de la fracción líquida o por lavado del material pretratado.

Medio de fermentación

[0106] "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 carbohidrato que es metabolizada por el organismo fermentador.

[0107] El medio de fermentación puede comprender nutrientes y estimulador(es) de crecimiento para el organismo(s) de fermentación.
Estimuladores de nutriente y crecimiento son muy usados en la técnica de fermentación e incluyen fuentes de nitrógeno, tales como amoníaco; urea, vitaminas y minerales, o combinaciones de los mismos.
El medio de fermentación también puede incluir enzimas tales como amilasas y/o otras enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos, especialmente donde el proceso de la invención se realiza como un proceso de sacarificación simultánea y fermentación o un proceso RSH.

Organismos fermentadores

[0108] La frase "organismo fermentador" se refiere a cualquier organismo, incluyendo organismos bacterianos y fúngicos, adecuados para su uso en un proceso de fermentación y capaz de producir un producto de fermentación deseado.
El organismo fermentador puede ser un organismo fermentador C6 o C5, o una combinación de los mismos.
Tanto los organismos fermentadores C5 como C6 se conocen bien en la técnica.

[0109] Organismos fermentadores adecuados son capaces de fermentar, es decir, convertir, azúcares fermentables, tales como arabinosa, fructosa, galactosa, glucosa, maltosa, manosa, y/o xilosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado.

[0110] Ejemplos de organismos fermentadores incluyen organismos fúngicos tales como levadura.
Levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces*, en particular cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces uvarum*; una cepa de *Pichia*, preferiblemente *Pichia stipitis* tal *como Pichia stipitis* CBS 5773 o *Pichia pastoris*; una cepa de *Candida*, en particular una cepa de *Candida utilis*, *Candida arabinofermentanos*, *Candida diddensii*, *Candida sonorensis*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis*, o *Candida boidinii*.
Otros organismos fermentadores incluyen cepas de *Hansenula*, en particular *Hansenula polymorpha* o *Hansenula anomala*; *Kluyveromyces*, en particular *Kluyveromyces fragilis* o *Kluyveromyces marxianus*; y *Schizosaccharomyces*, en particular *Schizosaccharomyces pombe*.

[0111] Levadura disponible comercialmente incluye, por ejemplo, levadura RED STAR™ y ETHANOL RED™ (disponible de Fermentis/Lesaffre, USA), FALI (disponible de Fleischmann's Yeast, USA), levadura fresca SUPERSTART y THERMOSACC™ (disponible de Ethanol Technology, WI, USA), BIOFERM AFT y XR (disponible de NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, USA), GERT STRAND (disponible de Gert Strand AB, Sweden), y FERMIOL (disponible de DSM Specialties).

[0112] Organismos fermentadores bacterianos preferidos incluyen cepas de *Escherichia*, en particular *Escherichia coli*, cepas de *Zymomonas*, en particular *Zymomonas mobilis*, cepas de *Zymobacter*, en particular *Zymobactor palmae*, cepas de *Klebsiella* en particular *Klebsiella oxytoca*, cepas de *Leuconostoc*, en particular *Leuconostoc mesenteroides*, cepas de *Clostridium*, en particular *Clostridium butyricum*, cepas de *Enterobacter*, en particular *Enterobacter aerogenes* y cepas de *Thermoanaerobacter*, en particular *Thermoanaerobacter* BG1L1 (Appl. Microbiol. Biotech. 77: 61-86) y *Thermoanarobacter ethanolicus*, *Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum*, o *Thermoanaerobacter mathranii*.
Cepas de *Lactobacillus* son también previstas como son las cepas de *Corynebacterium glutamicum R*, *Bacillus thermoglucosidaisus*, y *Geobacillus thermoglucosidasius*.

[0113] En una forma de realización, el organismo fermentador es un organismo fermentador de azúcar C6 , tal como una cepa de, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*.

[0114] En relación con la fermentación de materiales derivados de lignocelulosa, se puede usar el organismo fermentador de azúcar C5. La mayoría de organismos fermentadores de azúcar C5 también fermentan azúcares C6. Ejemplos de organismos fermentadores de azúcar C6 incluyen cepas de *Pichia*, tales como las especies *Pichia stipitis*. C5 Las bacterias fermentadoras de azúcar son conocidas también. También algunas cepas de *Saccharomyces cerevisae* fermentan los azúcares C5 (y C6). Los ejemplos son cepas modificadas genéticamente de *Saccharomyces* spp. que son capaces de la fermentación de azúcares C5 incluyen aquellos descritos en, por ejemplo, Ho et al., 1998, Applied and Environmental Microbiology 64: 1852-1859 and Karhumaa et al., 2006, Microbial Cell Factories 5:18, and Kuyper et al., 2005, FEMS Yeast Research 5: 925-934.

[0115] El rendimiento fermentativo de ciertos organismos fermentadores se puede inhibir por la presencia de inhibidores en los medios de fermentación y así reducir la capacidad de producción de etanol. Los compuestos en el hidrolizado de biomasa y concentraciones altas de etanol se conocen por inhibir la capacidad fermentativa de determinadas células de levadura. Los métodos de pre-adaptación o de adaptación pueden reducir este efecto inhibitorio. Típicamente la pre-adaptación o adaptación de células de levadura implica el crecimiento secuencial de células de levadura, antes de la fermentación, para aumentar el rendimiento fermentativo de la levadura y aumento de la producción de etanol. Los métodos de pre-adaptación y adaptación de levadura se conocen en la técnica. Tales métodos pueden incluir, por ejemplo, el crecimiento de las células de levadura en presencia de hidrolizados de biomasa cruda; crecimiento de células de levadura en presencia de inhibidores tales como compuestos fenólicos, furaldehidos y ácidos orgánicos; crecimiento de células de levadura en presencia de cantidades sin inhibición de etanol; y complementación de los cultivos de levadura con acetaldehído. En una forma de realización, el organismo fermentador es una cepa de levadura sujeta a uno o más de métodos de pre-adaptación o de adaptación antes de la fermentación.

[0116] Según la invención, el organismo fermentador es preferiblemente cultivado bajo condiciones precisas a un índice de crecimiento particular.
Cuando el organismo fermentador es introducido en/añadido al medio de fermentación del organismo fermentador inoculado pasan un número de etapas.
Inicialmente no ocurre crecimiento.
Este periodo se conoce como el "fase de latencia" y puede ser un periodo de adaptación.
Durante la fase siguiente referida como el "fase exponencial" el índice de crecimiento aumenta gradualmente.
Después de que un periodo de crecimiento máximo, el índice cesa y el organismo fermentador entra en la "fase estacionaria".
Después de otro periodo de tiempo el organismo fermentador entra el "fase de muerte" donde el número de células viables desciende.

[0117] En una forma de realización, el organismo fermentador se añade al medio de fermentación de modo que la cuenta de organismo fermentador viable por mL de medio de fermentación está en el rango de 10^5 a 10^{12}, preferiblemente de 10^7 a 10^{10}, especialmente aproximadamente 5 x 10^7.

Materiales que contienen almidón

[0118] Cualquier material que contiene almidón adecuado se puede utilizar en la presente invención.
La materia prima es generalmente seleccionado basado en el producto de fermentación deseado.
Ejemplos de materiales que contienen almidón incluyen cereales integrales, cebada, alubias, mandioca, maíz, sorgo, guisantes, arroz, centeno, sagú, sorgo, patatas dulces, tapioca, trigo, o mezclas derivadas o almidones derivados de los mismos, o cereales.
Se comprenden también tipos también cerosos y no cerosos de maíz y cebada.

[0119] El término "almidón granular" significa almidón crudo sin cocinar, es decir, almidón en su forma natural encontrado en cereales, tubérculos o granos.
El almidón se forma dentro de células vegetales como gránulos ínfimos insolubles en agua.
Cuando se pone en agua fría, los gránulos de almidón pueden absorber una pequeña cantidad del líquido e hincharse.
A temperaturas de hasta 50°C a 75°C, el hinchazón puede ser reversible.
Sin embargo, a temperaturas más altas empieza una hinchazón llamada "gelatinización" irreversible.
Almidón granulado por procesar puede ser de una calidad de almidón altamente refinada, preferiblemente al menos 90%, al menos 95%, al menos 97% o al menos 99.5% puro o puede ser un material que contiene almidón más crudo (por ejemplo; molido) que contiene cereales integrales incluyendo fracciones no amiláceas tales como residuos de germen y fibras.
La materia prima, tal como cereales integrales, puede ser reducida de tamaño de partícula, por ejemplo, por fresado, para descubrir la estructura, y permite otros tratamientos.
Dos procesos se prefieren según la invención: molienda en seco y mojada.
En la molienda en seco, se muelen y usan granos enteros.

Molienda en húmedo da una separación buena de germen y comida (gránulos de almidón y proteína) y es frecuentemente aplicada a ubicaciones donde el almidón hidrolizado se usa en la producción de, por ejemplo, jarabes.
Molienda en húmedo y seca se conocen en la técnica de tratamiento de almidón y son igualmente contempladas para un proceso de la invención.
En una forma de realización, el tamaño de partícula se reduce a entre 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente 0,1-0,5 mm, de modo que al menos 30%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 70%, aún más preferiblemente al menos 90% del material que contiene almidón encaja a través de una criba con una pantalla 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente de 0,1-0,5 mm.

Material que contiene lignocelulosa (biomasa)

[0120] Cualquier material que contenga lignocelulosa adecuado se puede utilizar en los métodos descritos aquí. El material que contiene lignocelulosa puede ser cualquier material que contenga lignocelulosa. En una forma de realización preferida, el material que contiene lignocelulosa contiene al menos 50 peso.%, preferiblemente al menos 70 peso.%, más preferiblemente al menos 90 peso. % de lignocelulosa. Debe entenderse que el material que contiene lignocelulosa también puede comprender otros constituyentes tales como material celulósico, tal como celulosa, hemicelulosa y también puede comprender constituyentes tales como azúcares, tales como azúcares fermentables y/o azúcares no fermentables.

[0121] El material que contiene lignocelulosa se ha descubierto generalmente, por ejemplo, en los tallos, hojas, cascos, cáscaras, y mazorcas de plantas u hojas, ramas y madera de árboles. El material lignocelulósico puede ser también, pero no está limitado a material herbáceo, residuos agrícolas, residuos de silvicultura, residuos sólidos municipales, papel de desecho y pulpa, y residuos de fábrica de papel. Aquí se entiende que el material que contiene lignocelulosa puede ser en forma de material de pared celular vegetal que contiene lignina, celulosa y hemicelulosa en una matriz mezclada.

[0122] En una forma de realización, el material que contiene lignocelulosa se selecciona de uno o más de fibra de maíz, paja de arroz, madera de pino, astillas de madera, álamo, bagazo y papel, y residuos de tratamiento de pulpa.

[0123] Otros ejemplos de material que contiene lignocellulosa adecuado incluyen rastrojos de maíz, mazorcas de maíz, madera dura tal como álamo y abedul, madera blanda, paja de cereal tal como paja de trigo, pasto varilla, Miscanthus, cáscaras de arroz, residuos sólidos municipales (MSW), residuos orgánicos industriales, papel de oficina o mezclas derivadas.

[0124] En una forma de realización, el material que contiene lignocelulosa es rastrojos de maíz o mazorcas de maíz. En otra forma de realización, el material que contiene lignocelulosa es fibra de maíz. En otra forma de realización, el material que contiene lignocelulosa es pasto varilla. En otra forma de realización, el material que contiene lignocelulosa es bagazo.

Productos de fermentación

[0125] El término "producto de fermentación" significa un producto producido por un proceso que incluye un paso de fermentación que utiliza un organismo fermentador.
Productos de fermentación incluyen alcoholes (por ejemplo, arabinitol, n-butanol, isobutanol, etanol, glicerol, metanol, etilenglicol, 1,3-propanodiol [propilenglicol], butanodiol, glicerina, sorbitol, y xilitol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido acético, ácido acetónico, ácido adípico, ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido 2,5-diceto-D-glucónico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido glucárico, ácido glucónico, ácido glucurónico, ácido glutárico, ácido 3-hidroxipropiónico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido málico, ácido malónico, ácido oxálico, ácido oxaloacético, ácido propiónico, ácido succínico, y ácido xilónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico, glicina, lisina, serina, y treonina); un alcano (por ejemplo, pentano, hexano, heptano, octano, nonano, decano, undecano, y dodecano), un cicloalcano (por ejemplo, ciclopentano, ciclohexano, cicloheptano, y ciclooctano), un alqueno (por ejemplo penteno, hexeno, hepteno, y octeno); isopreno; policétido; gases (por ejemplo, metano, hidrógeno (H_2), dióxido de carbono (CO_2), y monóxido de carbono (CO)); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (por ejemplo, riboflavina, B_{12}, beta-caroteno); y hormonas.
En una forma de realización preferida el producto de fermentación es etanol, por ejemplo, etanol combustible; etanol potable, es decir, bebidas espirituosas neutrales potables; o etanol industrial o productos usadas en la industria de alcohol consumible (por ejemplo, cerveza y vino), industria lechera (por ejemplo, productos lácteos fermentados), industria de cuero e industria de tabaco.

Tipos de cerveza preferidos comprenden cerveza inglesa de malta, cerveza negra, cerveza rubia, amargas, licores de malta, cerveza happoushu, cerveza de alcohol alto, cerveza baja en alcohol, cerveza baja en calorías o cerveza light.
Procesos de fermentación preferidos incluyen procesos de fermentación alcohólicos.
En una forma de realización, el producto de fermentación es etanol, que puede estar como etanol combustible o como etanol potable.

Destilación

[0126] Después de la fermentación del producto de fermentación se puede separar el medio de fermentación.
El compuesto acuoso se puede destilar para extraer el producto de fermentación deseado o el producto de fermentación deseado del medio de fermentación por técnicas de micro o filtración de membrana.
Alternativamente el producto de fermentación se puede recuperar por stripping.
Métodos para recuperar los productos de fermentación se conocen en la técnica. típicamente, el producto de fermentación, por ejemplo, etanol, con una pureza de hasta, por ejemplo, aproximadamente 96 vol. % etanol se obtiene.

[0127] Después de la finalización del proceso de fermentación, el material restante se considera la vinaza entera.
Como se utiliza en este caso, el término "vinaza entera" incluye el material que permanece al final del proceso de fermentación tanto antes como después de la recuperación del producto de fermentación, por ejemplo, etanol.
El producto de fermentación puede opcionalmente ser recuperado por cualquier método conocido en la técnica.
En una forma de realización, la vinaza entera es separada o dividida en una fase sólida y líquida por uno o varios métodos para la separación de la vinaza fina del sedimento húmedo.
Tales métodos incluyen, por ejemplo, centrifugación y decantación.
El producto de fermentación puede ser opcionalmente recuperado antes o después de que la vinaza entera sea separada en una fase sólida y líquida.

[0128] Así, en una forma de realización, el método de la invención comprende además destilación para obtener el producto de fermentación, por ejemplo, etanol.
La fermentación y la destilación se pueden realizar simultáneamente y/o separadamente/consecutivamente; opcionalmente seguidas por uno o varios pasos de proceso para más refinamiento del producto de fermentación.

[0129] En una forma de realización de la invención, el subproducto acuoso (vinaza entera) del proceso de destilación se separa en dos fracciones, por ejemplo, por centrifugación: grano mojado (fase sólida), y vinaza fina (sobrenadante).

[0130] En otra forma de realización de la invención, el método de la invención comprende además separación de la vinaza entera producida por destilación en el grano mojado y vinaza fina; y reciclaje vinaza fina al almidón que contiene material antes de la licuefacción.

[0131] En una forma de realización, la vinaza fina se recicla en el compuesto acuoso de grano entero molido.

[0132] La fracción de grano mojado puede ser secada, típicamente en un secador rotativo.
El producto seco se conoce aquí como granos secados de destiladores, y puede ser usado, por ejemplo, como pienso para animales.

[0133] La fracción de vinaza fina se puede evaporar proporcionando dos fracciones (ver Fig. 1):

(i) una fracción de condensado de 4-6% DS (principalmente de almidón, proteínas, y componentes de pared celular), y

(ii) una fracción de jarabe, principalmente consistente en dextrinas límite y azúcares no fermentables, que puede ser introducida en un secador con los granos mojados (de el paso de separación de vinaza entera) para proporcionar un producto referido como grano secado de destiladores con solubles, que también se puede usar como pienso para animales.

[0134] Vinaza fina es el término usado para el sobrenadante de la centrifugación de la vinaza entera.
Típicamente, la vinaza fina contiene 4-6% DS (principalmente almidón y proteínas) y tiene una temperatura de aproximadamente 60-90°C.

[0135] En otra forma de realización, la vinaza fina no es reciclada, pero el flujo de condensado de vinaza fina evaporada se recicla en el compuesto acuoso con el grano entero molido para ser cocido a chorro.

Granos secos destiladores con solubles

[0136] Como explicado por encima, vinaza es el producto que permanece después de que el triturado haya sido convertido en azúcar, fermentado y destilado en el etanol.

Vinaza se puede separar en dos fracciones, tales como, por centrifugación o selección: (1) pastel mojado (fase sólida) y (2) la vinaza fina (sobrenadante).
La fracción sólida o grano mojado destilador (DWG) se puede prensar para eliminar humedad de exceso y luego secar para producir granos secos de destiladores (DDG).
Después de que el etanol haya sido quitado de la fracción líquida, el líquido restante se puede evaporar para concentrar el material soluble en solubles destiladores condensados (DS) o secados y molidos para crear solubles secos de destiladores (DDS).
DDS es frecuentemente mezclado con DDG para formar grano seco de destilador con solubles (DDGS).
DDG, DDGS, y DWG son colectivamente llamados grano(s) de destilador.

[0137] DDGS después de un proceso de producción de etanol de maíz contiene típicamente aproximadamente 13% aceite, 31% proteína y 56% carbohidratos y otros componentes.
La eliminación de parte del aceite del DDGS mejorará la calidad del DDGS para el mercado de piensos puesto que muchos productores de piensos prefieren menos aceite y grasa en el DDGS para hacer pienso de alta calidad.

Extracción de aceite y deshidratación

[0138] Métodos para deshidratar la vinaza y para extraer el aceite de un producto de fermentación se conocen en la técnica. Estos métodos incluyen decantación o de otro modo separan la vinaza entera en el sedimento húmedo y vinaza fina.
Ver, por ejemplo, patente US Nos. 6,433,146, 7,601,858, y 7,608,729, y solicitud de publicación US 2010/0058649.
Además, la vinaza fina se puede evaporar o condensar en el jarabe o vinaza gruesa donde el aceite se puede extraer usando centrifugación, filtración, calor, alta temperatura, presión aumentada, o una combinación de los mismos.
Otra forma para extraer aceite es bajar el pH de la vinaza fina o jarabe.
El uso de tensioactivos para romper emulsiones también mejora la extracción de aceite.
También pueden usarse prensas para la deshidratación.

[0139] La presencia de hemicelulasa(s) y/o endoglucanasa(s) durante la fermentación en los procesos de la invención aumenta la cantidad de aceite en la vinaza fina y además el jarabe o vinaza gruesa en comparación con la cantidad de aceite en la vinaza fina, jarabe o vinaza gruesa cuando una hemicelulasa y/o una endoglucanasa no se añaden al proceso de fermentación.

Recuperación

[0140] El(los) producto(s) de fermentación puede(n) ser opcionalmente recuperado(s) del medio de fermentación utilizando cualquier método conocido en la técnica, que incluya, pero no esté limitado a cromatografía, métodos electroforéticos, solubilidad diferencial, destilación o extracción. Por ejemplo, el alcohol se separa del material celulósico fermentado y se purifica por métodos de destilación convencionales. Etanol con una pureza de hasta aproximadamente 96 vol.% puede ser obtenido, que se puede usar como, por ejemplo, etanol combustible, etanol potable, es decir, bebidas espirituosas neutrales potables, o etanol industrial.

Hemicelulasas

[0141] La hemicelulosa se puede descomponer por hemicelulasas y/o hidrólisis de ácido para liberar sus componentes de azúcar de carbono cinco y seis.

[0142] Cualquier hemicelulasa adecuada para usar en la hemicelulosa de hidrolización, preferiblemente en la xilosa, puede ser utilizada.
Hemicelulasas preferidas incluyen acetilxilano esterasas, endo-arabinasas, arabinasas de sialidase, arabinofuranosidasas, feruloil esterasa, endo-galactanasas, exo-galactanasas, glucuronidasas, manasas, xilanasas, y mezclas de dos o más de las mismas.
Preferiblemente, la hemicelulasa para usar en la presente invención es una hemicelulasa que actúa de sialidase, y más preferiblemente, la hemicelulasa es una hemicelulasa que actúa de sialidase que tiene la capacidad para hidrolizar hemicelulosa bajo condiciones ácidas por debajo de pH 7, preferiblemente pH 3-7.

[0143] En un aspecto, la hemicelulasa(s) comprende una preparación enzimática hemicelulolítica comercial.
Ejemplos de preparaciones enzimáticas hemicelulolíticas comerciales adecuadas para usar en la presente invención incluyen, por ejemplo,(Novozymes A/S), CELLIC™ HTec (Novozymes A/S), CELLIC™ HTec2 (Novozymes A/S), VISCOZYME® (Novozymes A/S), ULTRAFLO® (Novozymes A/S), PULPZYME® HC (Novozymes A/S), MULTIFECT® Xylanase (Genencor), ACCELLERASE® XY (Genencor), ACCELLERASE® XC (Genencor), ECOPULP® TX-200A (AB Enzymes), HSP 6000 Xylanase (DSM), DEPOL™ 333P (Biocatalysts Limit, Wales, UK), DEPOL™ 740L. (Biocatalysts Limit, Gales, Reino Unido), y DEPOL™ 762P (Biocatalysts Limit, Gales, Reino Unido).

[0144] En una forma de realización la hemicelulasa es una xilanasa.
En una forma de realización la xilanasa puede preferiblemente ser de origen microbiano, tal como de origen fúngico (por ejemplo, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Meripilus*, *Trichoderma*) o de una bacteria (por ejemplo, *Bacillus*).
En una forma de realización preferida la xilanasa es derivada de un hongo filamentoso, preferiblemente derivada de una cepa de *Aspergillus*, tal como aculeatus de *Aspergillus*; o una cepa de *Humicola*, preferiblemente *Humicola lanuginosa*.
Ejemplos de xilanasas útil en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, xilanasa de *Aspergillus aculeatus* (GeneSeqP:AAR63790 WO 94/21785), xilanasas de *Aspergillus fumigatus* (WO 2006/078256), y *Thielavia terrestris* NRRL 8126 xilanasas (WO 2009/079210).
La xilanasa puede preferiblemente ser una endo-1,4-beta-xilanasa, más preferiblemente una endo-1,4-beta-xilanasa de GH 10 o GH 11.
Ejemplos de xilanasas comerciales incluyen SHEARZYME™, BIOFEED WHEAT™, HTec y HTec2 de Novozymes A/S, Denmark.

[0145] Ejemplos de beta-xilosidasas útil en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei* (UniProtKB/TrEMBL número de registro Q92458), *Talaromyces emersonii* (SwissProt número de registro Q8X212), y *Neurospora crassa* (SwissProt número de registro Q7SOW4).

[0146] Ejemplos de acetilxilano esterasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, acetilxilano esterasa de *Hipocrea jecorina* (WO 2005/001036), acetilxilano esterasa de *Neurospora crassa* (número de registro de UniProt q7s259), *Thielavia terrestris* NRRL 8126 acetilxilano esterasa (WO 2009/042846), acetilxilano esterasa *Chaetomium globosum* (número de registro de Uniprot Q2GWX4), *Chaetomium gracile* acetilxilano esterasa (número de registro de GeneSeqP AAB82124), *Phaeosphaeria nodorum* acetilxilano esterasa (número de registro de Uniprot Q0UHJ1), y *Humicola insolens* DSM 1800 acetilxilano esterasa (WO 2009/073709).

[0147] Ejemplos de esterasas de ácido ferúlico útil en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, *Humicola insolens* DSM 1800 feruloil esterasa (WO 2009/076122), *Neurospora crassa* feruloil esterasa (número de registro de UniProt Q9HGR3), y *Neosartorya fischeri* feruloil esterasa (número de registro de UniProt A1D9T4).

[0148] Ejemplos de arabinofuranosidasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, *Humicola insolens* DSM 1800 arabinofuranosidasa (WO 2009/073383) y *Aspergillus niger* arabinofuranosidasa (número de registro de GeneSeqP AAR94170).

[0149] Ejemplos de alfa-glucuronidasas útiles en los métodos de la presente invención incluyen, pero de forma no limitativa, *Aspergillus clavatus* alfa-glucuronidasa (número de registro de UniProt alcc12), *Trichoderma reesei* alfa-glucuronidasa (número de registro de Uniprot Q99024), *Talaromyces emersonii* alfa-glucuronidasa (número de registro de UniProt Q8X211), *Aspergillus niger* alfa-glucuronidasa (número de registro de Uniprot Q96WX9), *Aspergillus terreus* alfa-glucuronidasa (SwissProt número de registro Q0CJP9), y *Aspergillus fumigatus* alfa-glucuronidasa (SwissProt número de registro Q4WW45).

Endoglucanasas (EG)

[0150] El término "endoglucanasa" significa un endo-1,4-(1,3;1,4)-beta-D-glucan 4-glucanohidrolasa (E.C. No. 3.2.1.4), que cataliza endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glicosídicos en la celulosa, derivados químicos de la celulosa (tales como carboximetilcelulosa y celulosa de hidroxietilo), liquenina, beta-1,4 enlaces en mezclados beta-1,3 glucanos tales como beta-D-glucanos de cereal o xiloglucanos, y otro material vegetal que contenga componentes celulósicos.
La actividad de endoglucanasa se puede determinar utilizando hidrólisis de carboximetilcelulosa (CMC) según el procedimiento Ghose, 1987, Pure and Appl. Chem. 59: 257-268.

[0151] En una forma de realización preferida, la(s) endoglucanasa(s) se puede(n) derivar de una cepa de *Trichoderma*, tal como una cepa de Trichoderma reesei; una cepa de *Humicola*, tal como una cepa de *Humicola insolens*; o una cepa de *Chrysosporium*, tal como una cepa de *Chrysosporium lucknowense*.

Enzimas para hidrólisis de un material que contiene almidón

Hemicelulasas

[0152] Cualquiera de las hemicelulasas anteriormente descritas se pueden usar para la hidrolización de un material que contenga lignocelulosas.

[0153] La hemicelulasa se puede añadir en una cantidad eficaz para hidrolizar hemicelulosa, tal como en una cantidad de aproximadamente 0,001 a 0,5 en peso % del total de sólidos (TS), más preferiblemente de aproximadamente 0,05 a 0,5 en peso % de TS.

[0154] Las xilanasas se pueden añadir en una cantidad de 0,001-1,0 g/kg sustrato DM (sustancia seca), preferiblemente en la cantidad de 0,005-0,5 g/kg sustrato DM, y de la forma más preferible de 0,05-0,10 g/kg sustrato DM.

Actividad celulolítica

[0155] La frase "actividad celulolítica" como se utiliza en este caso incluye enzimas con actividad de celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91), por ejemplo, celobiohidrolasa I y celobiohidrolasa II, actividad de endoglucanasa (EC 3.2.1.4) y/o actividad de beta-glucosidasa (EC 3.2.1.21).

[0156] Al menos tres categorías de enzimas son importantes para la conversión de celulosa en azúcares fermentables: endoglucanasas (EC 3.2.1.4) que cortan las cadenas de celulosa al azar; celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91) que disocian unidades celobiosílicoes de las extremidades de cadena de celulosa y beta-glucosidasas (EC 3.2.1.21) que convierten celobiosa y celodextrinas solubles en glucosa.
Entre estas tres categorías de enzimas implicadas en la biodegradación de celulosa, celobiohidrolasas parece ser la enzima clave para la degradación de celulosa cristalina nativa.

[0157] La actividad celulolítica puede, en una forma de realización preferida, estar en la forma de una preparación de enzimas de origen fúngico, tal como de una cepa de *Trichoderma*, preferiblemente una cepa de *Trichoderma reesei*; una cepa de *Humicola*, tal como una cepa de *Humicola insolens*; o una cepa de *Chrysosporium*, preferiblemente una cepa de *Chrysosporium lucknowense*.

[0158] En la forma de realización preferida la preparación enzimática celulolítica contiene una o varias de las siguientes actividades: celulasa, hemicelulasa, actividad de aumento de enzima celulolítica, beta-glucosidasa, endoglucanasa, celubiohidrolasa, o xilosa isomerasa.

[0159] En una forma de realización preferida la celulasa puede ser una composición tal y como se define en PCT/US2008/065417.
En una forma de realización preferida la preparación enzimática celulolítica comprende un polipéptido con actividad de mejora celulolítica, preferiblemente un polipéptido de familia GH61A, preferiblemente el descrito en WO 2005/074656 (Novozymes).
La preparación enzimática celulolítica puede comprender además beta-glucosidasa, tal como una beta-glucosidasa derivada de una cepa de *Aspergillus*, *Penicillium*, o *Trichoderma*, con la proteína de fusión teniendo actividad de beta-glucosidasa descrita en WO 2008/057637.
En una forma de realización preferida la preparación enzimática celulolítica también puede comprende enzima CBH II, preferiblemente celobiohidrolasa II de *Thielavia terrestris* CEL6A.
En otra forma de realización preferida la preparación enzimática celulolítica también puede comprender enzimas, preferiblemente derivadas de *Trichoderma reesei* o *Humicola insolens*.

[0160] La preparación enzimática celulolítica también puede comprender un polipéptido que tiene actividad de mejora celulolítica (GH61A) descrita en WO 2005/074656; una beta-glucosidasa (proteína de fusión descrita en WO 2008/057637); y enzimas celulolíticas derivadas de *Trichoderma reesei*.

[0161] En una forma de realización la enzima celulolítica es el producto disponible comercialmente CELLUCLAST® 1.5L, CELLUZYME™, CTEC o CTEC2 disponible de Novozymes A/S, Dinamarca o ACCELERASE™ 1000 (de Genencor Inc., USA).

[0162] Una enzima celulolítica se puede añadir durante la fermentación.
La enzima celulolítica se puede dosificar en el rango de 0,1-100 FPU por sólidos de total de gramo (TS), preferiblemente 0,5-50 FPU por gramo TS, especialmente 1-20 FPU por gramo TS.
En otra forma de realización al menos 0,1 mg enzima celulolítica por sólidos de total de gramo (TS), preferiblemente al menos 3 mg enzima celulolítica por gramo TS, tal como entre 5 y 10 mg enzima(s) celulolítica por gramo TS son usados para hidrólisis.

Endoglucanasas (EG)

[0163] Cualquier endoglucanasa anteriormente descrita se puede usar para la hidrolización de un material lignocelulósico. Celobiohidrolasas (CBH)

[0164] El término "celobiohidrolasa" significa una celobiohidrolasa de 1,4-beta-D-glucano (E.C. 3.2.1.91), que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en la celulosa, celooligosacáridos, o cualquier glucosa

beta-1,4-ligada que contenga polímero, liberando celobiosa de las extremidades reductoras o no-reductoras de la cadena.

[0165] Ejemplos de celobiohidrolosas incluyen CBH I y CBH II de *Trichoderma reseei*; *Humicola insolens* y CBH II de celobiohidrolasa de *Thielavia terrestris* (CELL6A).

[0166] La actividad de celobiohidrolasa se puede determinar a los procedimientos descritos por Lever et al., 1972, Anal. Biochem. 47: 273-279 and by van Tilbeurgh et al., 1982, FEBS Letters 149: 152-156; van Tilbeurgh and Claeyssens, 1985, FEBS Letters 187: 283-288.
El método Lever et al. es adecuado para la evaluación de hidrólisis de celulosa en rastrojos de maíz y el método de van Tilbeurgh et al. es adecuado para la determinación de la actividad de celobiohidrolasa en un derivado de disacárido fluorescente.

Beta-glucosidasas

[0167] El término "beta-glucosidasa" signifca una glucohidrolasa de beta-d-glucósido (E.C. 3.2.1.21), que cataliza la hidrólisis de residuos de beta-D-glucosa no-reductora terminal con la liberación de beta-D-glucosa.
Para fines de la presente invención, la actividad de beta-glucosidasa se determina según el procedimiento básico descrito por Venturi et al., 2002, J. Basic Microbiol. 42: 55-66, excepto que condiciones diferentes fueron empleadas como se describe aquí.
Una unidad de actividad de beta-glucosidasa es definida como 1,0 micro-mol de *p*-nitrofenol producida por minuto a 50°C, pH 5 de 4 mM *p*-nitrofenil-beta-D-glucopiranósido como sustrato en 100 mM citrato sódico, 0,01% TWEEN® 20.

[0168] En una forma de realización preferida la beta-glucosidasa es de origen fúngico, tal como una cepa de *Aspergillus*, *Penicillium*, o *Trichoderma*.
En una forma de realización preferida la beta-glucosidasa es un derivado de *Trichoderma reesei*, como la beta-glucosidasa codificada por el gen bgl1 (ver Fig. 1 de EP 562003).
En otra forma de realización preferida la beta-glucosidasa es derivada de *Aspergillus oryzae* (recombinantemente producida en el *Aspergillus oryzae* según WO 2002/095014), *Aspergillus fumigatus* (recombinantemente producida en el *Aspergillus oryzae* según el Ejemplo 22 de WO 2002/095014) o *Aspergillus niger* (1981, J. Appl. 3: 157-163).

Isomerasas de xilosa

[0169] Isomerasas de xilosa (D-xilosa Ketoisomerasa) (E.C. 5.3.1.5) son enzimas que catalizan la reacción de isomerización reversible de D-xilosa para D-xilulosa.
Algunas isomerasas de xilosa también convierten la isomerización reversible de D-glucosa en D-fructosa.
Por lo tanto, xilosa isomerasa es a veces llamada "glucosa isomerasa".

[0170] Una xilosa isomerasa usada en un método o proceso de la invención puede ser cualquier enzima con actividad de xilosa isomerasa y puede ser de cualquier fuente, preferiblemente de origen bacteriano o fúngico, tal como hongos filamentosos o levadura.
Ejemplos de xilosa isomerasa bacteriana incluyen el aquellos de *Actinoplanes*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Streptomyces*, y *Thermotoga*, incluyendo T. *neapolitana* (Vieille et al., 1995, Appl. Environ. Microbiol. 61(5): 1867-1875) y *T.* maritime.

[0171] Algunos ejemplos de xilosa isomerasa fúngica son derivados de *Basidiomycetes*.

[0172] Una xilosa isomerasa preferida es derivada de una cepa de *Candida*, preferiblemente una cepa de *Candida boidinii*, especialmente la xilosa isomerasa de *Candida boidinii* descrita por, por ejemplo, Vongsuvanlert et al., 1988, Agric. Biol. Chem. 52(7): 1817-1824.
La xilosa isomerasa se puede derivar una cepa de *Candida boidinii* (Kloeckera 2201), depositada como DSM 70034 y ATCC 48180, descrita en Ogata et al., Agric. Biol. Chem. 33: 1519-1520 o Vongsuvanlert et al., 1988, Agric. Biol. Chem. 52(2): 1519-1520.

[0173] En una forma de realización la xilosa isomerasa es derivada de una cepa de *Streptomyces*, por ejemplo, derivada de una cepa de *Streptomyces murinus* (patente US nº 4,687,742); *S. flavovirens*, *S. albus*, *S. achromogenus*, *S. echinatus, S. wedmorensis* todas descritas en la patente US nº 3,616,221.
Otras xilosas isomerasas se describen en la patente US nº 3,622,463, patente US nº 4,351,903, patente US nº 4,137,126, patente US nº 3,625,828, patente HU nº 12,415, patente DE nº 2,417,642, patente JP nº 69,28,473, y WO 2004/044129.

[0174] La xilosa isomerasa puede estar bien en la forma inmovilizada o líquida.
Se prefiere la forma líquida.

[0175] Un ejemplo de una xilosa isomerasa disponible comercialmente es SWEETZYME™ T de Novozymes A/S, Dinamarca.

[0176] La xilosa isomerasa se añade para proporcionar un nivel de actividad en el rango de 0,01-100 IGIU por gramo total de sólidos.

Polipéptidos GH61

[0177] En los procesos de la presente invención, cualquier polipéptido GH61 se puede usar.

[0178] En un primer aspecto, el polipéptido GH61 comprende los motivos siguientes:

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

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

[0179] El polipéptido GH61 que comprende los motivos mencionados anteriormente puede comprender además:

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

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

[0180] En un aspecto preferido, el polipéptido GH61 comprende además H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV].
En otro aspecto preferido, el polipéptido GH61 comprende además [EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV].
En otro aspecto preferido, el polipéptido GH61 comprende además H-X(1,2)-G-P-X(3)-[YW]-[AILMV] y [EQ]-X-Y-X(2)-C-X-[EHQN]-[FILV]-X-[ILV].

[0181] En un tercer aspecto, el polipéptido GH61 comprende el motivo siguiente:

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

donde x es cualquier aminoácido, x(4,5) es cualquier aminoácidos contiguos 4 o 5, y x(3) es cualquier aminoácidos contiguos 3.
En el motivo anterior, la abreviatura de aminoácido de una sola letra IUPAC aceptada es empleada.

[0182] En un tercer aspecto, el polipéptido GH61 comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un grado de identidad al polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1 (*Thielavia terrestris*), SEC ID n.º: 2 (*Thielavia terrestris*), SEC ID n.º: 3 (*Thielavia terrestris*), SEC ID n.º: 4 (*Thielavia terrestris*), SEC ID n.º: 5 (*Thielavia terrestris*), SEC ID n.º: 6 (*Thielavia terrestris*), SEC ID n.º: 7 (*Thermoascus aurantiacus*), SEC ID n.º: 8 (*Trichoderma reesei*), SEC ID n.º: 9 (*Myceliophthora thermophila*), SEC ID n.º: 10 (*Myceliophthora thermophila*), SEC ID n.º: 11 (*Myceliophthora thermophila*), SEC ID n.º: 12 (*Myceliophthora thermophila*), SEC ID n.º: 13 (*Myceliophthora thermophila*), SEC ID n.º: 14 (*Thermoascus aurantiacus*), SEC ID n.º: 15 (*Aspergillus fumigatus*), SEC ID n.º: 16 (*Penicillium pinophilum*), SEC ID n.º: 17 (*Termoascus sp.*), SEC ID n.º: 18 (*Penicillium sp.*), SEC ID n.º: 19 (*Thielavia terrestris*), SEC ID n.º: 20 (*Thielavia terrestris*), SEC ID n.º: 21 (*Thielavia terrestris*), SEC ID n.º: 22 (*Thielavia terrestris*), SEC ID n.º: 23 (*Thielavia terrestris*), SEC ID n.º: 24 (*Thielavia terrestris*), SEC ID n.º: 25 (*Thielavia terrestris*), SEC ID n.º: 26 (*Thielavia terrestris*), SEC ID n.º: 27 (*Thielavia terrestris*), SEC ID n.º: 28 (*Thielavia terrestris*), SEC ID n.º: 29 (*Thielavia terrestris*), SEC ID n.º: 30 (*Thermoascus crustaceus*), SEC ID n.º: 31 (*Thermoascus crustaceus*), SEC ID n.º: 32 (*Thermoascus crustaceus*), SEC ID n.º: 33 (*Aurantiporus alborubescens*), o SEC ID n.º: 34 (*Aurantiporus alborubescens*) de al menos 60%, por ejemplo, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, o al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o al menos 100%.

[0183] En un sexto aspecto, el polipéptido GH61 es una variante artificial que comprende una sustitución, deleción, y/o inserción de uno o varios (o diferentes) aminoácidos del polipéptido maduro de SEC ID n.º: 1, SEC ID n.º: 2, SEC ID n.º: 3, SEC ID n.º: 4, SEC ID n.º: 5, SEC ID n.º: 6, SEC ID n.º: 7, SEC ID n.º: 8, SEC ID n.º: 9, SEC ID n.º: 10, SEC ID n.º: 11, SEC ID n.º: 12, SEC ID n.º: 13, SEC ID n.º: 14, SEC ID n.º: 15, SEC ID n.º: 16, SEC ID n.º: 17, SEC ID n.º: 18, SEC ID n.º: 19, SEC ID n.º: 20, SEC ID n.º: 21, SEC ID n.º: 22, SEC ID n.º: 23, SEC ID n.º: 24, SEC ID n.º: 25, SEC ID n.º: 26, SEC ID n.º: 27, SEC ID n.º: 28, SEC ID n.º: 29, SEC ID n.º: 30, SEC ID n.º: 31, o SEC ID n.º: 32; o una secuencia homóloga del mismo.

[0184] Preferiblemente, cambios de aminoácidos son de una naturaleza menor, es decir sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que significativamente no afectan el plegado y/o la actividad de la proteína; deleciones pequeñas, típicamente de aproximadamente 30 ácidos de amino; extensiones terminadas en amino pequeño o carboxilo, tales como un residuo de metionina aminoterminal; un péptido enlazador pequeño de hasta aproximadamente 20-25 residuos; o una extensión pequeña que facilita la purificación cambiando la carga de red u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítopo antigénico o un dominio de unión.

[0185] Los ejemplos de sustituciones conservadoras están en el grupo de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina).
Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y son descritas, por ejemplo, por H. Neurath and R.L. Hill, 1979, In, The Proteins, Academic Press, Nueva York.
Los intercambios que ocurren con mayor frecuencia son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, y Asp/Gly.

[0186] Alternativamente, los cambios aminoácidos son de tal naturaleza que las propiedades físicoquímicas de los polipéptidos son alteradas.
Por ejemplo, cambios aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad de sustrato, cambiar el pH óptimo, y similares.

[0187] Los aminoácidos esenciales en un polipéptido original se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de escaneado de alanina (Cunningham and Wells, 1989, Science 244: 1081-1085).
En la técnica anterior, mutaciones de alanina única se introducen en cada residuo en la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se evalúan para actividad de mejora celulolítica para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula.
Ver también, Hilton et al., 1996, J. Biol. Chem. 271: 4699-4708.
El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica puede también ser determinado por análisis físico de estructura, como determinado por técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica, o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de aminoácidos de sitio de contacto putativo.
Ver, por ejemplo, de Vos et al., 1992, Science 255: 306-312; Smith et al., 1992, J. Mol. Biol. 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Lett. 309: 59-64.
Las identidades de aminoácidos esenciales también pueden ser inferidas de análisis de identidades con polipéptidos que se relacionan con el polipéptido original.

[0188] Las sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples, deleciones, y/o inserciones pueden ser hechas y evaluadas usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación, y/o redistribución, seguido de un procedimiento de selección pertinente, tal como los descrito por Reidhaar-Olson and Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie and Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-2156; WO 95/17413; or WO 95/22625.
Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR con tendencia al error, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832-10837; patente US nº 5,223,409; WO 92/06204), y mutagénesis dirigida por región (Derbyshire et al., 1986, Gene 46: 145; Ner et al., 1988, DNA 7: 127).

[0189] Los métodos de mutagénesis/redistribución se pueden combinar con métodos de selección automatizados de alto rendimiento para detectar actividad de polipéptidos mutagenizados clonados expresados por células huésped (Ness et al.,1999, Nature Biotechnology 17: 893-896).
Moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y rápidamente ordenar usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido.

[0190] El número total de sustituciones de aminoácidos, deleciones y/o inserciones del polipéptido GH61 maduro de SEC ID n.º: 1, SEC ID n.º: 2, SEC ID n.º: 3, SEC ID n.º: 4, SEC ID n.º: 5, SEC ID n.º: 6, SEC ID n.º: 7, SEC ID n.º: 8, SEC ID n.º: 9, SEC ID n.º: 10, SEC ID n.º: 11, SEC ID n.º: 12, SEC ID n.º: 13, SEC ID n.º: 14, SEC ID n.º: 15, SEC ID n.º: 16, SEC ID n.º: 17, SEC ID n.º: 18, SEC ID n.º: 19, SEC ID n.º: 20, SEC ID n.º: 21, SEC ID n.º: 22, SEC ID n.º: 23, SEC ID n.º: 24, SEC ID n.º: 25, SEC ID n.º: 26, SEC ID n.º: 27, SEC ID n.º: 28, SEC ID n.º: 29, SEC ID n.º: 30, SEC ID n.º: 31, o SEC ID n.º: 32 no es más de 4, por ejemplo, 1, 2, 3, o 4.

[0191] En un aspecto, el polipéptido GH61 se usa en presencia de un catión metálico bivalente de activación soluble descrito en WO 2008/151043, por ejemplo, sulfato de manganeso.

[0192] En un aspecto, el polipéptido GH61 se utiliza en presencia de un compuesto dioxi, un compuesto bicíclico, un compuesto heterocíclico, un compuesto con nitrógeno, o un compuesto con sulfuro.

[0193] El compuesto dioxi puede incluir cualquier compuesto adecuado que contanga dos o más átomos de oxígeno.
En algunos aspectos, el dioxi compuestos contienen una fracción de arilo sustituido como se describe en este caso.
El dioxi compuestos pueden comprender uno o más (varios) hidroxilo y/o derivados de hidroxilo, pero también incluye fracciones de arilo sustituido sin hidroxilo y derivados hidroxilo.
Ejemplos no limitativos de compuestos dioxi incluyen pirocatecol o catecol; ácido cafeico; ácido 3,4-dihidroxibenzoico; 4-terc-butil-5-metoxi-1,2-bencenodiol; pirogalol; ácido gálico; metil-3,4,5-trihidroxibenzoato; 2,3,4-trihidroxibenzofenona; 2,6-dimetoxifenol; ácido sinapínico; ácido 3,5-dihidroxibenzoico; 4-cloro-1,2-benzenediol; 4-nitro-1,2-bencenediol; ácido tánico; galato etilo; glicolato de metilo; ácido dihidroxifumárico; 2-butino-1,4-diol; (ácido crocónico; 1,3-propanodiol; ácido tartárico; 2,4-pentanediol; 3-etioxi-1,2-propanodiol; 2,4,4'-trihidroxibenzofenone; cis-2-buteno-1,4-diol; 3,4-dihidroxi-3-ciclobuteno-1,2-diona; dihidroxiacetona; acroleina acetálico; metil-4-hidroxibenzoato; ácido 4-hidroxibenzoico; y metil-3; o una sal o solvato de los mismo.

[0194] El compuesto bicíclico puede incluir cualquier sistema anular fusionado sustituido adecuado como se describe en este caso.
Los compuestos pueden comprender uno o más (varios) anillos adicionales, y no se limitan a un número específico de anillos a menos que se declare de otro modo.
En un aspecto, el compuesto bicíclico es un flavonoide.
En otro aspecto, el compuesto bicíclico es un isoflavonoide opcionalmente substituido.
En otro aspecto, el compuesto bicíclico es un ión de flavilio opcionalmente sustituido, tal como una antocianidina opcionalmente sustituida o antocianina opcionalmente sustituida, o un derivado.
Ejemplos no limitativos de compuestos bicíclicos incluyen epicatequina; quercetina; miricetina; taxifolina; kaempferol; morin; acacetina; naringenina; isoramnetina; apigenina; cianidina; cianina; kuromanina; keracianina; o una sal o solvato de los mismos.

[0195] El compuesto heterocíclico puede ser cualquier compuesto adecuado, tal como un anillo aromático opcionalmente sustituido o no-aromatico que comprende un heteroátomo, como se describe en este caso.
En un aspecto, el heterocíclico es un compuesto que incluye una fracción de heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o una fracción de heteroarilo opcionalmente sustituido.
En otro aspecto, la fracción de heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o fracción de heteroarilo opcionalmente sustituido es un heterocicloalquilo opcionalmente sustituido de cinco miembros o una fracción de heteroarilo opcionalmente sustituido de cinco miembros.
En otro aspecto, el heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o fracción de heteroarilo opcionalmente sustituido es una fracción opcionalmente sustituida seleccionada de pirazolilo, furanilo, imidazolilo, isoxazolil, oxadiazolilo, oxazolilo, pirrolil, piridilo, pirimidil, piridazinil, tiazolilo, triazolilo, tienilo, dihidrotieno-pirazolilo, tianaftenilo, carbazolilo, benzimidazolilo, benzotienil, benzofuranilo, indolil, quinoleínilo, benzotriazolilo, benzotiazolilo, benzooxazolilo, benzimidazolilo, isoquinoleínilo, isoindolil, acridinilo, benzoisazolilo, dimetilhidantoína, pirazinilo, tetrahidrofuranilo, pirrolinilo, pirrolidinilo, morfinilo, indolil, diazepinilo, azepinilo, tiepinilo, piperidinil, y oxepinilo.
En otro aspecto, la fracción de heterocicloalquilo opcionalmente sustituido o fracción de heteroarilo opcionalmente sustituido es un furanilo opcionalmente sustituido.
Ejemplos no limitativos de compuestos heterocíclicos incluyen (1,2-dihidroxietil)-3,4-dihidroxifurano-2(5H)-one; 4-hidroxi-5-metil-3-furanona; 5-hidroxi-2(5H)-furanona; [1,2-dihydroxyethyl]furano-2,3,4(5H)-triona; α-hidroxi-γ-butirolactone; ribónico γ-lactone; ácido aldohexuronicaldohexurónico γ-lactona; ácido glucónico γ-lactona; 4-hidroxicumarina; dihidrobenzofurano; 5-(hidroximetil)furfural; furoin; 2(5H)-furanone; 5,6-dihidro-2H-piran-2-ona; y 5,6-dihidro-4-hidroxi-6-metil-2H-piran-2-ona; o una sal o solvato de los mismos.

[0196] El compuesto con nitrógeno puede ser cualquier compuesto adecuado con uno o más átomos de nitrógeno.
En un aspecto, el compuesto con nitrógeno comprende una fracción de amina, imina, hidroxilamina, o nitróxido.
Ejemplos no limitativos de compuestos con nitrógeno incluyen oxima de acetona; ácido violúrico; piridina-2-aldoxima; 2-aminofenol; 1,2-bencenodiamina; 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi; 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina; 6,7-dimetil-5,6,7,8-tetrahidropterina; y ácido maleámico; o una sal o solvato de los mismos.

[0197] El compuesto de quinona puede ser cualquier compuesto adecuado que comprende una fracción de quinona como se describe en este caso.
Ejemplos no limitativos de compuestos de quinona incluyen 1,4-benzoquinona; 1,4-naftoquinona; 2-hidroxi-1,4-naftoquinona; 2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona o coenzima Q0, 2,3,5,6-tetrametil-1,4-benzoquinona o duroquinona; 1,4-dihidroxiantraquinona; 3-hidroxi-1-metil-5,6-indolinediona o adrenocromo; 4-tert-butil-5-metoxi-1,2-benzoquinona; quinona de pirroloquinolina; o una sal o solvato de los mismos.

[0198] El compuesto con sulfuro puede ser cualquier compuesto adecuado que comprenda uno o más átomos de azufre.
En un aspecto, el que contiene sulfuro comprende una fracción seleccionada de tionilo, tioéter, sulfinilo, sulfonil, sulfamida, sulfonamida, ácido sulfónico, y éster sulfónico.

Ejemplos no limitativos de compuestos que contienen sulfuro incluyen etanotiol; 2-propanetiol; 2-propena-1-tiol; ácido 2-mercaptoetanosulfónico; bencenotiol; benceno-1,2-ditiol; cisteína; metionina; glutationa; cistina; o una sal o solvato de los mismos.

[0199] En una forma de realización, el polipéptido GH61 está presente en la cantidad de 2-1000 microgramos/g sólidos secos (DS), por ejemplo, 5-100,10-40, o 20-40 microgramos/g DS.

Enzimas para usar en un proceso convencional y alfa-amilasas de proceso de hidrólisis de almidón crudo

[0200] Cualquier alfa-amilasa se puede utilizar para convertir un material que contiene almidón en dextrinas.
Alfa-amilasas preferidas son de origen microbiano, tal como origen bacteriano o fúngico.
La alfa-amilasa más adecuada depende de las condiciones del proceso pero pueden fácilmente ser determinadas por un experto en la técnica.

[0201] En una forma de realización la alfa-amilasa preferida es una alfa-amilasa ácida, por ejemplo, una alfa-amilasa ácida fúngica o una alfa-amilasa ácida bacteriana.
La frase "alfa-amilasa ácida" significa una alfa-amilasa (E.C. 3.2.1.1) que tiene actividad óptima a un pH en el rango de 3 a 7, preferiblemente de 3,5 a 6, o más preferiblemente de 4-5.

Alfa-amilasas bacterianas

[0202] En otra forma de realización preferida la alfa-amilasa es de origen de *Bacillus*.
La alfa-amilasa de *Bacillus* puede preferiblemente derivar de una cepa de *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis, B. stearothermophilus, o B. subtilis,* pero también puede ser de otra especie de *Bacillus*.
Ejemplos específicos de alfa-amilasas contempladas incluyen la alfa-amilasa *de Bacillus licheniformis* mostrada en SEC ID n.º: 4 en WO 99/19467, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* SEC ID n.º: 5 en WO 99/19467 y la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en SEC ID n.º: 3 en WO 99/19467.
En una forma de realización de la invención la alfa-amilasa puede ser una enzima con un grado de identidad de al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferido al menos 80%, aún más preferido al menos 90%, tal como al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% a cualquiera de las secuencias mostradas en la identidad de SEC nº 3, 4 o 5, respectivamente, en WO 99/19467.

[0203] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser variante y/o híbrido, especialmente uno descrito en cualquiera de WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059, y WO 02/10355.
Las variantes de alfa-amilasa contempladas en concreto se describen en la patente US nº 6,093,562, 6,297,038 o 6,187,576 e incluyen variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (BSG alfa-amilasa) con una deleción de uno o dos aminoácidos en posiciones R179 a G182, preferiblemente una deleción doble descrita en WO 96/23873 - ven por ejemplo, página 20, líneas 1-10, preferiblemente correspondientes a delta (181-182) en comparación con la secuencia alfa-amilasa aminoácida tipo salvaje BSG expuesto en SEC ID n.º: 3 descrita en WO 99/19467 o deleción de aminoácidos R179 y G180 que usa SEC ID n.º: 3 en WO 99/19467 para la numeración.
Se prefieren todavía más las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, que tiene una deleción doble que corresponde con delta(181-182) y además comprenden una sustitución N193F (también denominada 1181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia alfa-amilasa aminoácida tipo salvaje BSG expuesta en SEC ID n.º: 3 descrita en WO 99/19467.

Alfa-amilasas de híbrido bacteriano

[0204] Una alfa-amilasa híbrida específicamente contemplada comprende 445 residuos de aminoácidos C-terminal de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (mostrada en SEC ID n.º: 4 de WO 1999/19467) y los 37 residuos de aminoácidos N-terminal de la alfa-amilasa derivada de *Bacillus amyloliquefaciens* (mostrada en SEC ID n.º: 5 de WO 99/19467), con una o varias, especialmente todas, de las siguientes sustituciones: G48A+T49I+G107A+H156Y+A181T+N190F+1201F+A209V+Q264S (utilizando la numeración de *Bacillus licheniformis* en SEC ID n.º: 4 de WO 99/19467).
También se prefieren variantes con una o varias de las siguientes mutaciones (o mutaciones correspondientes en otra columna vertebral de alfa-amilasa de *Bacillus*): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o una deleción de dos residuos entre posiciones 176 y 179, preferiblemente una deleción de E178 y G179 (utilizando la numeración de SEC ID n.º: 5 WO 99/19467).

Alfa-amilasas fúngicas

[0205] Alfa-amilasas fúngicas incluyen alfa-amilasas derivadas de una cepa de *Aspergillus*, tales como *Aspergillis kawachii*, *Aspergillus niger*, y *Aspergillus oryzae*.

[0206] Una alfa-amilasa fúngica ácida preferida es una alfa-amilasa de tipo Fungamyl que es derivada de una cepa de *Aspergillus oryzae*.

Según la presente invención, la frase "alfa-amilasa tipo Fungamyl" indica una alfa-amilasa que muestra una identidad alta, es decir, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85% más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, más del 99% o incluso 100% de identidad a la parte madura de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEC ID n.º: 10 en WO 96/23874.

[0207] Otra alfa-amilasa ácida preferida es derivada de una cepa de *Aspergillus niger*.
En una forma de realización preferida la alfa-amilasa fúngica de ácido es la de A. *niger* descrita como "AMYA ASPNG" en la base de datos Swiss-prot/TeEMBL bajo el número de acceso primario P56271 y descrita en WO 89/01969 (ejemplo 3).
Una alfa-amilasa fúngica de ácido disponible comercialmente derivada de *Aspergillus niger* es SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

[0208] Otras alfa-amilasas de tipo salvaje contempladas incluyen aquellas derivadas de una cepa del géneros *Rhizomucor* y *Meripilus*, preferiblemente una cepa de *Rhizomucor pusillus* (WO 2004/055178) o *Meripilus giganteus*.

[0209] En una forma de realización preferida la alfa-amilasa es derivada de *Aspergillus kawachii* y descrita por Kaneko et al., 1996, J. Ferment. Bioeng. 81: 292-298, "Molecular-cloning and determination of the nucleotide-sequence of a gene encoding an acid-stable alpha-amylase from *Aspergillus kawachii*"; y además como EMBL:#AB008370.

[0210] La alfa-amilasa fúngica también puede ser enzima tipo salvaje que comprende un dominio de unión al almidón (SBO) y un dominio catalítico de alfa-amilasa (es decir; no híbrido), o un variante de los mismos.
En una forma de realización la alfa-amilasa tipo salvaje es derivada de una cepa de *Aspergillus kawachii*.

Alfa-amilasas de híbrido fúngico

[0211] En una forma de realización preferida la alfa-amilasa ácida fúngica es una alfa-amilasa híbrida.
Ejemplos preferidos de alfa-amilasas de híbrido fúngico incluyen aquellos descritos en WO 2005/003311 o solicitud de publicación US 2005/0054071 (Novozymes) o solicitud US nº 60/638,614 (Novozymes).
Una alfa-amilasa híbrida puede comprender un dominio catalítico de alfa-amilasa (CO) y un dominio/módulo de enlace de carbohidratos (CBM), tal como un dominio de unión al almidón, y opcionalmente un enlazador.

[0212] Ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellas descritos en las tablas 1 a 5 de los ejemplos de solicitud de patente US nº 60/638,614, incluyendo variante de fungamil con dominio catalítico JA118 y *Athelia rolfsii* SBD (SEC ID n.º: 100 en la solicitud US nº 60/638,614), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de *Athelia rolfsii* AMG y SBD (SEC ID n.º: 101 en la solicitud US nº 60/638,614), alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD (que es descrito en tabla 5 como una combinación de secuencias de aminoácidos SEC ID n.º: 20, SEC ID n.º: 72 y SEC ID n.º: 96 en la solicitud US nº 11/316,535) o como V039 en la tabla 5 en WO 2006/069290, y *Meripilus giganteus* alfa-amilasa con enlazador de glucoamilasa *Athelia rolfsii* y SBD (SEC ID n.º: 102 en la solicitud US nº 60/638,614).
Otras alfa-amilasas de híbrido específicamente contempladas son cualquiera del aquellas enumeradas en tablas 3, 4, 5, y 6 en el ejemplo 4 en la solicitud US nº 11/316,535 y WO 2006/069290.

[0213] Otros ejemplos específicos de alfa-amilasas híbridas contempladas incluyen aquellos descritos en solicitud de publicación US 2005/0054071, incluyendo aquellos descritos en la tabla 3 en la página 15, tal como alfa-amilasa de *Aspergillus niger* con enlazador de *Aspergillus kawachii* y dominio de unión al almidón.

[0214] También se contemplan alfa-amilasas que muestran una identidad alta para cualquiera de las alfa-amilasas mencionadas arriba, es decir, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, más del 99% o incluso 100% de identidad a las secuencias de enzima madura.

[0215] Unas alfa-amilasas de ácido pueden según la invención adicionada en una cantidad de 0,1 a 10 AFAU/g DS, preferiblemente 0,10 a 5 AFAU/g DS, especialmente 0,3 a 2 AFAU/g DS.

Productos de alfa-amilasa comerciales

[0216] Las composiciones comerciales preferidas que comprenden alfa-amilasa incluyen micolasa de DSM, BAN™, TERMAMYL™ SC, FUNGAMYL™, LIQUOZYMET™ X, SAN™ SUPER, y SAN™ EXTRA L (Novozymes A/S) y CLARASE™ L-40,000, DEX-LO™, SPEZYME™ Federico, SPEZYME™ AA, SPEZYME™, DELTA AA GC358 y Clearflow AA (Genencor Int.), y la alfa-amilasa fúngica de ácido vendida bajo el nombre comercial SP288 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca).

Fitasas

[0217] Cualquier fitasa se puede utilizar en un proceso de la presente invención.
Las fitasas son enzimas que degradan fitatos y/o ácido fítico específicamente hidrolizando la conexión de éster entre inositol y fósforo.
Actividad de fitasa se acredita con fósforo y disponibilidad iónica en muchos ingredientes.
En algunas formas de realización, la fitasa es capaz de liberar al menos un fosfato inorgánico de un hexafosfato de inositol (por ejemplo, ácido fítico).
Las fitasas se pueden reagrupar según su preferencia para una posición específica del grupo de fosfato éster en la molécula de fitato en la que hidrólisis es iniciada (por ejemplo, 3-fitasa (EC 3.1.3.8) o 6-fitasa (EC 3.1.3.26)).
Un ejemplo de fitasa es mio-inositol-hexakifosfato-3-fosfohidrolasa.

[0218] Las fitasas se pueden obtener de microorganismos tales como organismos fúngicos y bacterianos.
Por ejemplo, la fitasa se puede obtener de hongos filamentosos tales como *Aspergillus* (por ejemplo, *A. ficuum*, *A. fumigatus*, *A. niger*, y *A. terreus*), *Cladospirum*, *Mucor* (por ejemplo, *Mucor piriformis*), *Myceliophthora* (por ejemplo, *M. thermophila*), *Penicillium* (por ejemplo, *P. hordei* (ATCC nº 22053)), *P. piceum* (ATCC nº 10519), o *P. brevi-compactum* (ATCC nº 48944), *Talaromyces* (por ejemplo, *T. thermophilus*), *Thermomyces* (WO 99/49740), y *Trichoderma spp*. (por ejemplo, *T. reesei*).

[0219] En una forma de realización, la enzima de degradación de fitato se obtiene de levadura (por ejemplo, *Arxula adeninivorans*, *Pichia anomala*, *Schwanniomyces occidentalis*), bacterias gram-negativas (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*., *Pseudomonas spp*.), y bacterias gram-positivas (por ejemplo, *Bacillus spp*. tales como *Bacillus subtilis*).

[0220] La fitasa también se pueden obtener de *Citrobacter*, *Enterbacter*, o *Peniophora*.

[0221] En una forma de realización, la fitasa es derivada de *Buttiauxiella spp*. tales como *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. ferragutiase*, *B. gaviniae*, *B. izardii*, *B. noackiae*, y *B. warmboldiae*.
En algunas formas de realización, la fitasa es una fitasa descrita en WO 2006/043178 o solicitud US nº 11/714,487.

[0222] En una forma de realización preferida, la fitasa tiene al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 88%, al menos 90%, al menos 93%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% y al menos 99% identidad de secuencia a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID n.º: 31 de solicitud US nº 12/263,886.

[0223] Fitasas disponibles comercialmente son NATUPHOS (BASF), RONOZYME P (Novozymes A/S), PHZYME (Danisco A/S, Diversa) y FINASE (AB Enzymes).
El método para detterminar la actividad de fitasa microbiana y la definición de una unidad de fitasa se describe en Engelen et al., 1994, Journal of AOAC International 77: 760-764.
La fitasa puede ser una fitasa tipo salvaje, una variante activa o un fragmento activo de la misma.

Pululanasas

[0224] Cualquier pululanasa se puede utilizar en un proceso de la presente invención.
En una forma de realización, la pululanasa es una GH57 pululanasa, por ejemplo, una pululanasa obtenida de una cepa de *Thermococcus,* incluyendo *Thermococcus sp.AM4, Thermococcus sp. HJ21, Thermococcus, barophilus Thermococcus, gammatolerans Thermococcus hydrothermalis; Thermococcus, kodakarensis Thermococcus litoralis,* y *Thermococcus onnurineus;* o de una cepa de *Pyrococcus*, tal como *Pyrococcus abissi* y *Pyrococcus furiosus.*

Enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos

[0225] La frase "enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos" incluye glucoamilasa (un generador de glucosa), beta-amilasa y amilasa maltogénica (ambas generadoras de maltosa) y también pululanasa y alfa-glucosidasa.
Una enzima generadora de fuentes de carbohidratos es capaz de producir un carbohidrato que se puede usar como una fuente de energía por el organismo(s) de fermentación en cuestión, por ejemplo, cuando se usa en un proceso para producir un producto de fermentación tal como etanol.
El carbohidrato generado se puede convertir directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado, preferiblemente etanol.
Según la invención una mezcla de enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos puede estar presente.
Mezclas especialmente contempladas son las mezclas de al menos una glucoamilasa y una alfa-amilasa, especialmente una amilasa ácida, aún más preferida una alfa-amilasa fúngica ácida.
La proporción entre actividad de alfa-amilasa fúngica ácida (AFAU) por actividad de glucoamilasa (AGU) (AFAU por AGU) puede ser al menos 0,1, en particular al menos 0,16, tal como en el rango de 0,12 a 0,50 o superior.

Glucoamilasas

[0226] Una glucoamilasa se puede derivar de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, de un microorganismo o una planta.
Las glucoamilasas preferidas son de origen fúngico o bacteriano seleccionado del grupo consistente en glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular glucoamilasa *A. niger* G1 o G2 (Boel et al., 1984, EMBO J. 3(5): 1097-1102), y variantes de las mismas, tales como las descritas en WO 92/00381, WO 2000/104136 y WO 2001/04273 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa de *A. awamori* descrita en WO 84/02921, glucoamilasa de *A. oryzae* (Agric. Biol. Chem. 55(4): 941-949 (1991)), y variantes o fragmenta de las mismas.
Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes con termoestabilidad mejorada: G137A y G139A (Chen et al., 1996, Prot. Eng. 9: 499-505); D257E y D293E/Q (Chen et al., 1995, Prot. Eng. 8: 575-582); N182 (Chen et al., 1994, Biochem. J. 301: 275-281); enlaces de disulfuro, A246C (Fierobe et al., 1996, Biochemistry 35: 8698-8704; y la introducción de residuos Pro en las posiciones A435 y S436 (Li et al., 1997, Protein Eng. 10: 1199-1204).

[0227] Otras glucoamilasas incluyen *Athelia rolfsii* (previamente denominada *Corticium rolfsii*) glucoamilasa (ver patente US nº 4,727,026 y Nagasaka et al., 1998, "Purification and properties of te raw-starch-degrading glucoamilases from Corticium rolfsii, Appl. Microbiol. biotecnol. 50:323-330), glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular derivados de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces* leycettanus (patente US nº Re. 32,153), *Talaromyces duponti*, y *Talaromyces thermophilus* (patente US nº 4,587,215).

[0228] Glucoamilasas bacterianas incluyen glucoamilasas de *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (EP 135,138), y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831) y *Trametes cingulata* descritas en WO 2006/069289.

[0229] Glucoamilasas híbridas también puede ser usadas en un proceso de la invención.
Ejemplos de glucoamilasas híbridas se describe en WO 2005/045018.
Ejemplos específicos incluyen la glucoamilasa híbrida descrita en tablas 1 y 4 del ejemplo 1 de WO 2005/045018.

[0230] También se contemplan glucoamilasas que muestran una identidad alta para cualquiera de las glucoamilasas mencionadas arriba, es decir, más del 70%, más del 75%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, más del 99% o incluso 100% de identidad a las secuencias de enzimas maduras.

[0231] Composiciones disponibles comercialmente que comprenden glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SAN™, sUPER SAN™ EXTRA L, SPIRIZYME™ PLUS, SPIRIZYME™ FUEL, SPIRIZYME™ B4U y AMG™ E (de Novozymes A/S); OPTIDEX™ 300 (de Genencor Int.); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME™ G900, G-ZYME™, GC480; GC148; GC019 y G990 ZR (de Genencor Int.).

[0232] Las glucoamilasas se pueden añadir en una cantidad de 0,02-20 AGU/g DS, preferiblemente 0,1-10 AGU/g DS, especialmente entre 1-5 AGU/g DS, tal como 0,5 AGU/g DS.

Beta-amilasas

[0233] El término "beta-amilasa" (E.C 3.2.1.2) es el nombre generalmente dado para que amilasas maltogénicas que exo-actúan, que catalizan la hidrólisis de enlaces 1,4-alfa-glicosídicos en la amilosa, amilopectina y polímeros de glucosa relacionados.
Las unidades de maltosa son sucesivamente quitadas de las extremidades de cadena no-reductora de una manera gradual hasta que la molécula es degradada o, en el caso de amilopectina, hasta que se alcanza un punto de derivación.
La maltosa liberada tiene la configuración anomérica beta, de ahí el nombre beta-amilasa.

[0234] Las beta-amilasas han sido aisladas de varias plantas y microorganismos (Fogarty and Kelly, 1979, Progress in Industrial Microbiology 15: 112-115).
Estas beta-amilasas se caracterizan por el hecho de que tienen temperaturas óptimas en el rango de 40°C a 65°C y pH óptimo en el rango de 4,5 a 7.
Una beta-amilasa disponible comercialmente de cebada es NOVOZYM™ WBA de Novozymes A/S, Dinamarca y SPEZYME™ BBA 1500 de Genencor Int., EE.UU.

Amilasas maltogénicas

[0235] La amilasa también puede ser 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.

Alfa-amilasas maltogénicas son descritas en las patentes US Nº 4,598,048, 4,604,355 y 6,162,628.

[0236] La amilasa maltogénica se puede añadir en una cantidad de 0,05-5 mg total proteína/gramo DS o 0,05-5 MANU/g DS.

Proteasas

[0237] Una proteasa se puede añadir durante la sacarificación, fermentación, sacarificación y fermentación simultáneas.
La proteasa se puede añadir para deflocular el organismo fermentador, especialmente levadura, durante la fermentación.
La proteasa puede ser cualquier proteasa.
En una forma de realización preferida la proteasa es una proteasa ácida de origen microbiano, preferiblemente de origen fúngico o bacteriano.
Una proteasa fúngica ácida es preferida, pero también pueden usarse otras proteasas.

[0238] Las proteasas adecuadas incluyen proteasas microbianas, tales como proteasas fúngicas y bacterianas.
Las proteasas preferidas son proteasas ácidas, es decir, proteasas caracterizadas por la capacidad para hidrolizar proteínas bajo condiciones ácidas inferiores a pH 7.

[0239] Las proteasas fúngicas ácidas contempladas incluyen proteasas fúngicas derivadas de *Aspergillus, Candida, Coriolus, Endothia, Enthomophtra, Irpex, Mucor, Penicillium, Rhizopus, Sclerotium* y *Torulopsis*.
Especialmente contemplado son proteasas derivadas de *Aspergillus niger* (ver, por ejemplo, Koaze et al., 1964, Agr. Biol. Chem. Japón 28: 216), *Aspergillus saitoi* (ver, por ejemplo, Yoshida, 1954, J. Agr. Chem. Soc. Japón 28: 66), *Aspergillus awamori* (Hayashida et al., 1977, Agric. Biol. Chem. 42(5): 927-933), *Aspergillus aculeatus* (WO 95/02044), o *Aspergillus* oryzae, como la proteasa de pepA; y proteasas ácidas de *Mucor pusillus* o *Mucor miehei*.

[0240] Se contemplan proteasas también neutrales o alcalinas, tales como una proteasa derivada de una cepa de Bacillus.
Una proteasa particular contemplada para la invención es derivada de Bacillus amyloliquefaciens y tiene la secuencia disponible en Swissprot con el número de registro P06832.

[0241] También se contemplanlas proteasa con al menos 90% ide identidad a la secuencia de aminoácidos obtenible en Swissprot con ek número de acceso P06832 tal como al menos 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o particularmente al menos 99% de identidad.

[0242] Se contemplan además las proteasas con al menos 90% de identidad a la secuencia de aminoácidos descrita como SEC ID NO:1 en WO 2003/048353 tal como a 92%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o particularmente al menos 99% de identidad.

[0243] También se contemplan proteasas tipo papaína tales como proteasas dentro de E.C. 3.4.22.* (proteasa de cisteína), tales como EC 3.4.22.2 (papaína), EC 3.4.22.6 (quimopapaina), EC 3.4.22.7 (asclepaína), EC 3.4.22.14 (actinidaína), EC 3.4.22.15 (catepsina L), EC 3.4.22.25 (glicilendopeptidasa) y EC 3.4.22.30 (caricaína).

[0244] En una forma de realización la proteasa es una preparación de proteasa derivada de una cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae*.
En otra forma de realización la proteasa es derivada de una cepa de *Rhizomucor*, preferiblemente *Rhizomucormeihei*.
En otra forma de realización contemplada la proteasa es una preparación de proteasa, preferiblemente una mezcla de una preparación proteolítica derivada de una cepa de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae*, y una proteasa derivada de una cepa de *Rhizomucor*, preferiblemente *Rhizomucor meihei*.

[0245] Proteasas de ácido aspártico son descritas en, por ejemplo, Handbook of Proteolytic Enzymes, Edited by A.J. Barrett, N.D. Rawlings and J.F. Woessner, Academic Press, San Diego, 1998, Chapter 270).
Los ejemplos adecuados de proteasa de ácido aspártico incluyen, por ejemplo, aquellos descritos en Berka et al., 1990, Gene 96: 313; Berka et al., 1993, Gene 125: 195-198; and Gomi et al., 1993, Biosci. Biotech. Biochem. 57: 1095-1100.

[0246] Productos disponibles comercialmente incluyen ALCALASE®, ESPERASE™, FLAVOURZYME™, PROMIX™, NEUTRASE®, RENNILASE®, NOVOZYM™ FM 2.0L, y NOVOZYM™ 50006 (disponible de Novozymes A/S, Dinamarca) y GC106T™ y SPEZYME™ FAN de Genencor Int., Inc., EE.UU.

[0247] La proteasa puede estar presente en una cantidad de 0,0001-1 mg proteína enzimática por 9 DS, preferiblemente 0,001 a 0,1 mg proteína enzimática por 9 DS.

Alternativamente, la proteasa puede estar presente en una cantidad de 0,0001 a 1 LAPU/g DS, preferiblemente 0,001 a 0,1 LAPU/g DS y/o 0,0001 a 1 mAU-RH/g DS, preferiblemente 0,001 a 0,1 mAU-RH/g DS.

[0248] La invención descrita y reivindicada aquí no está limitada en su alcance por las formas de realización aquí descritas, ya que estas formas de realización se pretende que sean ilustraciones de varios aspectos de la invención. Cualquier forma de realización equivalente se pretende que esté dentro del alcance de esta invención, así como combinaciones de una o más formas de realización. Varias modificaciones de la invención, además de aquellas mostradas y descritas aquí serán evidentes para aquellos expertos en la técnica de la decripción anterior. Tales modificaciones también se pretende que se incluyan en el alcance de las revindicaciones anexas.

[0249] La presente invención se describe además por los siguientes ejemplos que no deberían interpretarse como limitativos del alcance de la invención.

Materiales y métodos

Métodos

Medición de actividad de celulasa que usa ensayo de papel de filtro (ensayo FPU)

1. Fuente del método

[0250]

1.1 El método se describe en "Measurement of Cellulase Activities" por dney and Baker, 1996, Laboratory Analytical Procedure, LAP-006, National Renewable Energy Laboratory (NREL) que se basa en el método de IUPAC para medir actividad de celulasa (Ghose, 1987, Measurement of Cellulase Activities, Pure & Appl. Chem. 59: 257-268.

2. Procedimiento

[0251]

2.1 El método se realiza como se describe por Adney y Baker, 1996, supra, menos por el uso de una placa de 96 pocillos para leer los valores de absorbancia después del desarrollo del color, como se describe abajo.

2.2 *Tubos de ensayo enzimático*:

2.2.1 Una banda de papel de filtro laminado (#1 Whatman; 1 x 6 cm; 50 mg) se añade al fondo de una probeta (13 X 100 mm).

2.2.2 Al tubo se añade 1,0 ml de 0,05 M tampón de citrato sódico (pH 4,80).

2.2.3 Los tubos que contienen papel de filtro y tampón son incubados 5 minutos a 50°C (± 0,1 °C) en un baño maría circulante.

2.2.4 Tras la incubación, 0.5 ml de dilución de enzima en el tampón de citrato se añaden al tubo.

Las diluciones enzimáticas se diseñan para producir valores ligeramente por encima y por debajo del valor asignado de 2,0 mg de glucosa.

2.2.5 El contenido del tubo se mezclanpor removiendo suavemente durante 3 segundos.

2.2.6 Después de remover, los tubos se incuban durante 60 minutos a 50°C (± 0,1 °C) en un baño maría circulante.

2.2.7 Inmediatamente después de la incubación de 60 minutos, los tubos son quitados del baño maría, y 3,0 ml de reactivo de ácido dinitrosalicílico (DNS) se añade a cada tubo para parar la reacción.

Los tubos se agitan en vórtex 3 segundos para la mezcla.

2.3 *Forma preliminar y controles*

2.3.1 Una forma preliminar reactiva es preparada añadiendo 1,5 ml de tampón de citrato a una probeta.

2.3.2 Un control de sustrato se prepara por la colocación de una banda de papel de filtro laminado en el fondo de una probeta, y añadiendo 1,5 ml de tampón de citrato.

2.3.3 Controles enzimáticos se preparan para dilución de cada enzima mediante la mezcla de 1,0 ml de tampón de citrato con 0,5 ml de la dilución de enzima apropiada.

2.3.4 La forma preliminar reactiva, el control de sustrato, y los controles enzimáticos son ensayados de la misma manera que los tubos de ensayo enzimáticos, y hechos junto con éstos.

2.4 *Estándares de glucosa*

2.4.1 Una solución madre de 100 ml de solución de glucosa (10.0 mg/ml) es preparada, y 5 ml partes alícuotas son congeladas.

Antes de su uso, partes alícuotas son descongeladas y agitadas en vórtex para mezclarlas.

2.4.2 Las diluciones de la solución madre han sido hechas en el tampón de citrato de la siguiente manera:

G1 = 1,0 ml reserva + 0,5 ml tampón = 6,7 mg/ml = 3,3 mg/0,5ml
G2 = 0,75 ml reserva + 0,75 ml tampón = 5,0 mg/ml = 2,5 mg/0,5ml
G3 = 0,5 ml reserva + 1,0 ml tampón = 3,3 mg/ml = 1,7 mg/0,5ml
G4 = 0,2 ml reserva + 0,8 ml tampón = 2,0 mg/ml = 1,0 mg/0,5ml

2.4.3 Tubos estándar de glucosa son preparados añadiendo 0,5 ml de cada dilución a 1,0 ml de tampón de citrato.
2.4.4 Los tubos estándar de glucosa son ensayados de la misma manera que los tubos de ensayo enzimáticos, y hechos junto con éstos.

2.5 *Desarrollo de color*

2.5.1 Después de la incubación de 60 minutos y de la adición de DNS, los tubos son todos hervidos juntos durante 5 minutos al baño maría.
2.5.2 Después de la ebullición, son inmediatamente enfriados en un baño de hielo/agua.
2.5.3 Cuando ya están enfriados, los tubos son brevemente agitados en vórtex, y se permite que la pulpa se pose.
Luego cada tubo es diluido añadiendo 50 microlitros del tubo a 200 microlitros de agua destilada doble a una placa de 96 pocillos.
Cada pocillo es mezclado, y la absorbancia es leída a 540 nm.

2.6 *Cálculos (ejemplos se dan en el documento NREL)*

2.6.1 Una curva estándar de glucosa se prepara por la concentración de glucosa de graficación (mg/0,5 ml) para los cuatro estándares (G1-G4) vs. absorbancia a 540 nm.
Es equipado utilizando una regresión lineal (Prism Software), y la ecuación para la línea se usa para decidir la glucosa producida para cada uno de los tubos de ensayo enzimáticos.
2.6.2 Un gráfico de glucosa producido (mg/0.5 ml) vs. dilución de enzima total es preparado, con el eje Y (dilución enzimática) estando en una escala de logaritmo.
2.6.3 Una línea es extraída entre la dilución enzimática que produjo justo por encima de 2,0 mg de glucosa y la dilución que produjo justo por debajo.
De esta línea, se determina la dilución enzimática que habría producida exactamente 2,0 mg de glucosa.
2.6.4 Las unidades de papel de filtro /ml (FPU/ml) se calculan de la siguiente manera:

FPU/mL = 0,37 dilución enzimática que produce 2,0 mg de glucosa.

Ensayo de EGU

[0252] Diez litros de un 0,1 M tampón de fosfato de pH6 ,0 se prepara y es posteriormente usado para preparar 1 litro de 35 g/l, reactivo carboximetilcelulosa de pH 6,0 (CMC, Aqualon 7LF).
UnEGU estándar tiene permitido permanecer 15 minutos a temperatura ambiente antes de ser pesado.
Aproximadamente 1 g de este estándar se pesa en un matraz aforado 5de 0 ml y rellenado hasta la marca con tampón fosfato.
Esta solución madre es luego agitada durante 15 minutos.
Estándares de trabajo se preparan como se describe en la tabla más debajo:

Estándar nº	Proporción de dilución	Obtener proporción de dilución por dilución como:		Concentración (EGU/ml)
		Solución madre enzimática	Diluyente	
1	0	0	1000	0,000
2	20	50	950	0,270
3	14	71	928	0,386
4	10	100	900	0,540
5	8	125	875	0,675
6	7	142	857	0,772
7	5	200	800	1,080

[0253] La muestra se prepara para el ensayo permitiéndole calentarse a temperatura ambiente.
La muestra es pesada, diluida con 0,1 M tampón de fosfato de pH 6,0 y agitado durante un mínimo de 15 minutos con un tiempo máximo de remover de 30 minutos.
Las muestras enzimáticas son diluidas de modo que la actividad de la dilución final está aproximadamente en medio de la curva.

Todos los pesos y diluciones son registrados.
Las muestras se pueden analizar robóticamente utilizando un ZiMATE II ROBOT (Zymark; EE.UU), o manualmente según las especificaciones siguientes: un volumen 0,375 ml de tampón de fosfato se pipeta en una probeta.
Después, 0,125 ml del estándar o muestra se pipeta en la probeta con el tampón de fosfato.
Es importante que las soluciones deben ser agitadas de nuevo cuando son pipetadas.
Cuatro ml de sustrato CFC se precalienta a 25°C, y se mezcla en el mezclador de torbellino durante 25-30 segundos.
La muestra en la probeta se incuba en un baño maría a 40°C durante 30 minutos.
Después del enjuague la probeta se coloca en el soporte de probeta del viscosímetro de manera que el husillo de vibración está en el centro de la probeta, y se deja durante 20 segundos.
La señal mV es leída y registrada.
Las mediciones de los estándares enzimáticos se utilizan para trazar una curva estándar, con actividad enzimática como el eje x y la correspondiente señal mV como el eje y.
La curva estándar se equipa por regresión a un polinomio de 3º grado.
Los valores mV para las diluciones diferentes de las muestras son luego usados para leer los valores de actividad enzimática correspondientes de la curva estándar.
La actividad de cada muestra (EGU/g) es luego computarizada de la siguiente manera:

Actividad de muestra = (C x Matraz x Dilución) / (Peso)

donde:

C = actividad enzimática calculada a través de la línea de regresión (EGU/ml)
Matraz = volumen de matraz de solución (mL)
Dilución = otra dilución de la muestra

Ensayo FXU

[0254] Dos litros de solución de trabajo 15% (p/v) BRIJ 35 son obtenidos a partir de una solución madre 30% (p/v) BRIJ 35 (Sigma B4184-1 L) por la dilución con agua desmineralizada.
Cinco litros de diluyentes muestra (50 mM tampón ACES con 225 mg BRIJ/L, pH 6,0) se preparan por pesando 45,55 g ± 0,005 g ACES y transfiriendo la sal a un 5000 mL matraz graduado.
Aproximadamente 4550 ml de agua desmineralizada se añade y mezcla con un agitador magnético durante un mínimo de 20 minutos o hasta que se disuelva. 7,50 Ml de solución madre de 15% BRIJ 35 (p/v) se pipeta en la solución.
El pH se ajusta con hidróxido sódico a 6,00 ± 0,03 a temperatura ambiente y el volumen se ajusta a 5,0 l.

[0255] 250 ml de 50 mM XiL-BUF/S: tampón MES, pH 6,0 se prepara pesando 2,441 g MES ± 0,005 g y transferido a un 250 mL matraz graduado.
Aproximadamente 240 ml agua desmineralizada se añade y mezcla con un agitador magnético durante un mínimo de 20 minutos o hasta que se disuelva.
El pH se ajusta con hidróxido sódico a 6,00 ± 0,03 a temperatura ambiente y el volumen se ajusta a 250 ml. 50 ml de XiL-SUB/S: arabinoxilano de trigo de sustrato 5,60 g/l en el tampón MES 50 mM, pH 6,0 se prepara pesando 0,2800 g ± 0,001 g de arabinoxilano de trigo en un vaso de precipitados 100 ml.
La solución se agita con calor en el vaso de precipitados a aproximadamente 55°C durante 30 minutos o hasta disolverse.
Tras enfriarse, el pH se ajusta con hidróxido sódico a 6,00 ± 0,03 a temperatura ambiente y el volumen se ajusta a 50 ml. 50 ml de 500 mM NaOH se prepara pesando 4 microesferas (gránulos: frescos, no apelmazado junto) de NaOH (por ejemplo, Merck 1.06498) en un matraz aforado 50 ml.
El peso real de las 4 microesferas es anotado (aproximadamente 0,8 g) = W.
Se multiplica W, peso con 50 (= aproximadamente 40 g), y el resultado es anotado.
El matraz es llenó a 50*W+/- 0,001 g peso con agua desmineralizada y fue agitado con un agitador magnético durante 5 minutos. 25 ML de hidrácida de ácido benzoico de *p*-hidroxi (PAHBAH) PAHBAH/S: solución de PAHBAH/bismuto/tartrato se prepara pesando 0,1380 ± 0,0001 g de bismuto (III)-acetato (por ejemplo, Aldrich 401587).
Luego, 0,5000 ± 0,001 g de PAHBAH se pesa (Sigma H-9882,152.2 g/mol, 4 kg dividido en partes alícuotas en contenedores de vidrio de 2,5 g).
Una cantidad de 1,2500 ± 0,001 g de tartrato de sodio de potasio, tetrahidrato se pesa (Merck 1,08087, 282,2 g/mol).
Los polvos se transfieren a un matraz graduado de 25 ml.
El matraz fue llenado hasta la marca con 500 mM NaOH y envuelto inmediatamente en la hoja de aluminio para protegerlo de luz o vertido en una botella marrón.
La muestra se agita durante 15 minutos con un agitador magnético.

[0256] Un FXU estándar se prepara pesando 0,4520 g (± 0,0005 g) y se disuelve en el diluyente muestra en un matraz aforado de 250 ml y agitado durante 15 minutos.

Una curva estándar se prepara con un curva de 7 puntos con un factor 4,0 entre el punto estándar mínimo y máximo, el volumen recomendado 1200 microlitros.
Las soluciones estándar se preparan por otra dilución de la solución madre con diluyente de muestra en un diluidor en las tazas de muestra, según la tabla:

Estándar nº	Ejemplo		Proporción de dilución	Concentración (FXU/ml)
	Solución madre (microlitros)	Diluyente (microlitros)		
1	30	1170	40	0.1563
2	40	1160	30	0,2084
3	50	1150	24	0,2605
4	60	1140	20	0,3126
5	80	1120	15	0,4168
6	100	1100	12	0,5210
7	120	1080	10	0,6252

[0257] Una muestra se pesa y se disuelve en el diluyente de muestra.
La solución madre se agita durante 15 minutos.
La solución de trabajo se diluye con la solución madre para hallarse en el rango de la curva estándar con diluyente de muestra.
El ensayo de actividad se realiza utilizando un analizador Konelab 30 (ThermoFischer Scientific).
Todos los reactivos, estándares y muestras se colocan en el analizador.
La actividad enzimática de las muestras diluidas es leída de la curva estándar.
Los resultados se pueden calcular automáticamente.
El cálculo de actividad de una muestra en FXU/g se realiza según la fórmula:

$$FXU/g = (S \times V \times F) / W$$

donde

S = lectura de la curva estándar en FXU/mL
V = volumen del matraz de medición usado en mL
F = factor de dilución para la segunda dilución
W = peso de muestra (g)

Actividad de glucoamilasa

[0258] La actividad de glucoamilasa se puede medir en unidades AGI o en unidades de glucoamilasa (AGU).

Actividad de glucoamilasa (AGI)

[0259] La glucoamilasa (equivalente a amiloglucosidasa) convierte almidón en glucosa.
La cantidad de glucosa se determina mediante el método de glucosa-oxidasa para la determinación de actividad.
El método descrito en la sección 76-11 Starch-Glucoamylase Method with Subsequent Measurement of Glucose with Glucose Oxidase in "Approved methods of the American Association of Cereal Chemists". Vol. 1-2 MCC, American Association of Cereal Chemists, 2000; ISBN: 1-891127-12-8.

[0260] Una unidad de glucoamilasa (AGI) es la cantidad de enzima que formará 1 micromol de glucosa por minuto bajo las condiciones estándar del método.

Condiciones estándar/condiciones de reacción:	
Sustrato	Almidón Soluble, concentración aprox. 16 g materia/L seca
Tampón	Acetato, aprox. 0,04 M, pH=4,3
PH	4,3
Temperatura de incubación	60°C
Tiempo de reacción	15 minutos
Terminación de la reacción	NaOH a una concentración de aproximadamente 0,2 g/L (alrededor de pH 9)

Concentración enzimática	0,15-0,55 AAU/mL

[0261] El almidón deberá ser almidón Lintner, que es un almidón de ebullición fino usado en el laboratorio como un indicador colorimétrico.
Almidón Lintner se obtiene con el tratamiento de ácido clorhídrico diluido de almidón natural de modo que retiene la capacidad para colorerar azul con yodo.

Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0262] La unidad novo glucoamilasa (AGU) es definida como la cantidad de enzima, que hidroliza 1 micromol demaltosa por minuto bajo las condiciones estándar 37°C, pH 4,3, sustrato: 23,2 mM maltosa, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

[0263] Un sistema autoanalizador puede ser utilizado.
Mutarotasa se añade al reactivo de glucosa deshidrogenasa de modo que cualquier alfa-D-glucosa presente se convierte en beta-D-glucosa.
Glucosa deshidrogenasa reacciona específicamente con beta-D-glucosa en la reacción mencionada anteriormente, formando NADH que es determinada usando un fotómetro a 340 nm como una medida de la concentración de glucosa original.

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

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

Actividad de alfa-amilasa

Actividad de alfa-amilasa (KNU)

[0264] La actividad de alfa-amilasa se puede determinar utilizando almidón de patata como sustrato.
Este método se basa en la degradación de almidón de patata modificado por la enzima, y la reacción es seguida de mezcla de muestras de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo.
Inicialmente se forma un color azul negruzco, pero durante la degradación del almidón el color azul se vuelve más débil y gradualmente se convierte en un marrón rojizo, que se compara con un estándar de vidrio coloreado.

[0265] Una unidad de Kilo Novo alfa-amilasa (KNU) se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (es decir, a 37°C +/- 0,05, 0,0003 M Ca^{2+}; y pH 5,6) dextriniza 5260 mg de sustancia seca de almidón Merck Amylum soluble.

Actividad de alfa-amilasa ácida

[0266] Cuando se usa según la presente invención la actividad de cualquier alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica de ácido).
Alternativamente la actividad de una alfa-amilasa ácida se puede medir en AAU (unidades de alfa-amilasa ácida).

Unidades de alfa-amilasa ácida (AAU)

[0267] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AAU (unidades de alfa-amilasa ácida), que es un método absoluto.
Una unidad de amilasa ácida (AAU) es la cantidad de conversión de enzima 1 g de almidón (100% de sustancia seca) por hora bajo condiciones estandarizadas en un producto con una transmisión a 620 nm después de la reacción con una solución de yodo de fuerza conocida igual a la de una referencia de color.

Condiciones estándar/condiciones de reacción:

[0268]

Sustrato:	Almidón Soluble. Concentración aprox. 20 g DS/L
Tampón:	Citrato, aprox. 0,13 M, pH=4,2
Solución de yodo:	40,176 g yoduro potásico + 0,088 g yodo/L
Agua de ciudad	15- 20°dH (dureza de grado alemán)
PH:	4,2
Temperatura de incubación:	30°C
Tiempo de reacción:	11 minutos
Longitud de onda:	620 Nm
Concentración enzimática:	0,13-0,19 AAU/mL
Rango de trabajo de enzima:	0,13-0,19 AAU/mL

[0269] El almidón debería ser almidón Lintner. Detalles adicionales se pueden encontrar en EP 0140410.

Actividad de alfa-amilasa ácida (AFAU)

[0270] La actividad de alfa-amilasa ácida se puede medir en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida), que es determinada relativo a un estándar enzimático.
Una AFAU se define como la cantidad de enzima que degrada 5,260 mg de sustancia seca de almidón por hora bajo las condiciones estándar mencionadas abajo.

[0271] Alfa-amilasa ácida, una endo-alfa-amilasa (1,4-alfa-D-glucano-glucanohidrolasa, E.C. 3.2.1.1) hidroliza enlaces alfa-1,4-glucosídicos en las regiones internas de la molécula de almidón para formar dextrinas y oligosacáridos con longitudes de cadena diferentes.
La intensidad de color formada con yodo es directamente proporcional a la concentración de almidón.
La actividad amilasa es determinada utilizando colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón bajo las condiciones analíticas específicas.

Almidón + yodo	Alfa-amilasa →	Dextrinas + oligosacáridos
Azul/violeta	40°C, pH 2,5	T = 23 segundos de decoloración

Condiciones estándar/condiciones de reacción:

[0272]

Sustrato:	Almidón Soluble, aprox. 0,17 g/l
Tampón:	Citrato, aprox. 0,03 M
Yodo (12):	0,03 G/l
CaC_2:	1,85 MM
PH:	2,50 ± 0,05

Temperatura de incubación:	40°C
Tiempo de reacción:	23 segundos
Longitud de onda:	590 Nm
Concentración enzimática:	0,025 AFAU/ml
Rango de trabajo de enzima:	0,01-0,04 AFAU/ml

Ensayo de isomerasa de xilosa/glucosa (IGIU)

[0273] Una IGIU es la cantidad de enzima que convierte glucosa en fructosa a un nivel inicial de 1 micromol por minuto en condiciones analíticas estándar.

Condiciones estándar

[0274]

Concentración de glucosa:	45% P/p
pH:	7,5
Temperatura:	60°C
Concentración Mg^{2+}:	99 Mg/l (1,0 g/l $MgSO_4$ * 7 H_2O)
Concentración Ca^{2+}	< 2 ppm
Activador, concentración SO_2:	100 Ppm (0,18 g/l $Na_2S_2O_5$)
Tampón, Na_2CO_3, concentración:	2 MM Na_2CO_3

Actividad de proteasa

Método de ensayo de proteasa (LAPU)

[0275] Una Unidad de Leucina Amino Peptidasa (LAPU) es la cantidad de enzima que descompone sustrato 1 micromol por minuto en las condiciones siguientes: 26 mM de L-leucina-*p*-nitroanilida como sustrato, 0,1 M Tris tampón (pH 8,0), 40°C, 10 minutos de tiempo de reacción.

Método de ensayo de proteasa AU(RH)

[0276] La actividad proteolítica se puede determinar con hemoglobina desnaturalizada como sustrato.
En el método Anson-Hemoglobin para la determinación de actividad proteolítica hemoglobina desnaturalizada es digerida, y la hemoglobina no asimilada se precipita con ácido tricloroacético (ATC).
La cantidad de producto soluble ATC se determina con reactivo de fenol, que da un color azul con tirosina y triptófano.

[0277] Una unidad de Anson (AU(RH)) es definida como la cantidad de enzima que bajo condiciones estándar (es decir, 25°C, tiempo de reacción de 10 minutos y pH 5,5) digiere hemoglobina a un nivel inicial de manera que se libera por minuto una cantidad de producto soluble ATC que da el mismo color con reactivo de fenol que un miliequivalente de tirosina.

Determinación de actividad amilasa maltogénica (MANU)

[0278] Una MANU (Unidad de amilasa maltogénica Novo) se puede definir como la cantidad de enzima requerida para liberar un micromol de maltosa por minuto a una concentración de 10 mg de sustrato de maltotriosa (Sigma M 8378) por ml de 0,1 M tampón de citrato, pH 5,0 a 37°C durante 30 minutos.

Materiales

[0279] Spirizyme Excel - una mezcla de glucoamilasa de *T. cingulata* y *T. emersonii* (Novozymes A/S, Dinamarca)) CELLIC™ CTec - una composición de celulasa de *Trichoderma reesei* suplementada con polipéptido GH61 y proteína de fusión de beta-glucosidasa (Novozymes A/S, Dinamarca).

[0280] HTec-xiianasa de CELLICT™ (Novozymes A/S, Dinamarca).

[0281] CELLIC™ CTec2 - una mezcla de (a) una composición de celulasa de *Trichoderma reesei* suplementada con polipéptido GH61 y beta-glucosidasa y (b) CELLIC™ HTec2 (Novozymes A/S, Dinamarca). CELLICT™ HTec2 - xilanasa (Novozymes A/S, Dinamarca).

[0282] Glucoamilasa A (AMG A): glucoamilasa derivada de *Trametes cingulata* descrita en SEC ID n.º: 2 en WO 2006/069289 (Novozymes A/S).

[0283] Alfa-amilasa A (AAA): una alfa-amilasa híbrida que consiste en *Rhizomucor pusillus* alfa-amilasa con enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y SBD descrita como V039 en la tabla 5 en WO 2006/069290 (Novozymes A/S).

[0284] Celluclast 1,5L - una composición de celulasa de *Trichoderma reesei* con actividad de xilanasa.

[0285] Ultraflo - beta-glucanasa de *Humicola insolens* con esterasa de ácido ferúlico y actividad de xilanasa. Shearzima 2x- xilanasa de *Aspergillus aculeatus*.

[0286] Shearzima Plus - xilanasa de *Aspergillus aculeatus*.

Ejemplos

Ejemplo 1

[0287] Triturado de maíz no fermentado fue usado para preparar muestras de fermentación.
Urea y penicilina fueron añadidas a una concentración final de 1000 ppm y 3 mg/L respectivamente.
El pH del triturado fue ajustado a pH 5.
Aproximadamente 620 g de triturado fueron colocados en vasos LR-2.ST 1 L de reactor (IKA, Wilmington, NC) que fueron mantenidos en un baño maría a 32°C con mezcla constante durante las 54 horas de fermentación.

[0288] SPIRIZYME Excel fue dosificado a una concentración final de 0,06% (% p/p de maíz).
CELLIC™ CTec, CELLIC™ HTec y polipéptido GH61 de *Aspergillus fumigatus* fueron igualmente dosificados cada uno como 33,3 microgramos de proteína de enzima/g DS.
Las fermentaciones fueron iniciadas añadiendo 0,68 g de levadura seca de Ethanol Red (RedStar Yeast Co., Milwaukee, WI) directamente al reactor.

[0289] Después de 54 horas, las fermentaciones fueron detenidas añadiendo 10 microlitros de 40% (v/v) H_2SO_4/g triturado y almacenadas en los reactores de vidrio durante toda la noche a 4°C.
Cada tratamiento fue luego transferido a tres botellas 250 ml Nalgene, tapado, y centrifugado durante 15 minutos a 3500 x g a aproximadamente 30°C en un rotor F14BCI-6x250cy en un Avanti J-E centrífugo (Beckman Coulter, Brea, CA).
Los sobrenadantes de cada tratamiento fueron recombinados, dejados para que se enfriaran a temperatura ambiente, y el aceite fue recuperado según el método siguiente:

[0290] El sobrenadante de cada tratamiento fue combinado en un embudo separador de 250 ml.
Las botellas Nalgene donde las muestras fueron centrifugadas fueron enjuagadas con una pequeña cantidad de hexano (<5 ml), seguido de extracción del sobrenadante (tres extracciones, 40 ml hexano por extracción).
La fase orgánica fue recogida en un matraz de fondo redondo prepesado, transferida a tubos 50 ml para centrifugación a 11.000 x g durante 15 minutos luego transferida de nuevo al matraz de fondo redondo.
El estrato orgánico fue destilado al vacío utilizando un evaporador giratorio R-205(Buchi, Flawil, Suiza) a 240 r.p.m. con un baño maría fijado a 85°C y el matraz de fondo redondo fue repesado para obtener el peso de aceite final.

[0291] Para comparar con precisión rendimientos de aceite, el aceite recuperado fue proporcionado como un porcentaje de masa del triturado inicial usado en el tratamiento.
Para los tratamientos de SSF, se usó el peso de triturado inicial registrado para el cálculo.
Para calcular el triturado inicial usado para cada muestra, se midió la cantidad de triturado dividido en partes alícuotas en la fermentación a gran escala.
El rendimiento de aceite fue calculado basado en una base de peso por ciento de aceite obtenido a triturado de maíz inicial usado (tabla 1).

Tabla1: Rendimiento de aceite

Tratamiento	% aceite (p/p)
SPIRIZYME Excel	0,60%
SPIRIZYME, priman CELLIC™ CTec, CELLIC™ HTec y polipéptido GH61	0,86%

[0292] Los resultados muestran que la adición de una mezcla de CELLIC™ CTEC, CELLIC™ HTec, y polipéptido GH61 aumenta significativamente la cantidad de aceite de maíz extraído en un 43% en comparación con la muestra de control.

Ejemplo 2

[0293] El triturado producido no fermentado industrialmente fue mezclado en una mezcladora durante 5 minutos.
Esto sirvió para aumentar el área de superficie disponible para la actividad enzimática y posiblemente para interrumpir más el germen que contiene aceite.
Una muestra de 100 g de este triturado de maíz fue dividida en partes alícuotas en matraces de plástico Erlenmeyer® de 250 mL con tapas equipadas con filtro.
La sacarificación fue realizada utilizando AAA + AMG A (10,5 AGU/FAU-F) a una dosis de 0,04 peso %. CELLIC™ CTec2 fue dosificado a 12 mg producto/g DS.

[0294] Levadura RED STAR™ rehidratada (Fermentis/Lesaffre; EE.UU) fue usada en la fermentación, 3,3 g de levadura suspendida en 50 mL de agua del grifo a 32°C durante 30 minutos antes de añadir 2 mL de este cultivo en cada triturado.
Se permitió que SSF procediera durante 72 horas en una incubadora de aire de agitación mutuo/orbital a 32°C.
Después de 72 horas, las fermentaciones fueron detenidas añadiendo 10 microlitros de 40% (v/v) H_2SO_4/g triturado.

[0295] Para medir la cantidad de aceite capturada en las fases acuosa y de aceite de las muestras, un ensayo extractivo basado en hexanos fue desarrollado.
Las muestras fermentadas fueron decantadas en dos 50 mL tubos centrifugadores cónicos.
La pared del matraz de fermentación fue enjuagada bien con agua desionizada y decantada en un tercer tubo centrífugo 50 ml.
Todos los tubos fueron centrifugados en un centrífugo Allegra 6R de mesa de trabajo con rotor GH-3.8 (Beckmen Coulter, Brea, CA) a 1462 x g durante 10 minutos.
El sobrenadante fue decantado en un nuevo matraz aforado 250 mL.
Utilizando una pequeña cantidad (<5 ml) de hexano, el petróleo residual fue enjuagado de las paredes de tubo centrífugo y añadido al matraz aforado.
Agua desionizada se añadió para resuspender el granulado en los dos tubos centrifugadores y fue combinada en un tubo y centrifugada otra vez.
El sobrenadante fue vertido en el matraz aforado y los lados de los tubos fueron enjuagados utilizando una pequeña cantidad de hexano.
El sobrenadante en el matraz fue vertido en un embudo separador de 250 ml, seguido de 2 g de NaCl, e invertido varias veces para mezclarlo.
Luego, 15 ml de hexano fueron añadidos en el embudo y mezclados íntegramente con la ventilación, y luego se permitio que se separaran para decantar la capa acuosa en un vaso de precipitado.
La capa de hexano fue transferida a un vaso adecuado.
La capa acuosa fue añadida de nuevo al embudo y lavada con hexano y recogidoa una segunda vez.
Un tercer lavado fue realizado en el embudo con hexano dejando la capa acuosa fuera y solo lavando las paredes del embudo.
Todas las capas de hexano fueron vertidas en el embudo una cuarta vez y enjuagadas con 100 ml de agua del grifo caliente.
Después de que las fases se separaran, la fase acuosa fue decantada y la capa de hexano fue transferida en un matraz de fondo redondo prepesado.
La estrato orgánica fue destilada al vacío a 240 r.p.m. con un baño maría a 85°C utilizando un evaporador giratorio R-205 (Buchi, Flawil, Suiza) y el matraz de fondo redondo fue repesado para obtener el peso de aceite final.

[0296] Para comparar con precisión los rendimientos de aceite, el aceite recuperado fue proporcionado como un porcentaje de masa del triturado inicial usado en el tratamiento.
Para tratamientos los SSF, se utilizó el peso de triturado inicial registrado para el cálculo.
Para calcular el triturado inicial usado para cada muestra se midió la cantidad de triturado dividido en partes alícuotas en la fermentación a gran escala.
El rendimiento de aceite fue calculado basándose en una base de peso por ciento de aceite obtenido a triturado de maíz inicial usado (tabla 2).

Tabla 2: Rendimiento de aceite

Tratamiento	% aceite (p/p)
1. AAA + AMG A (10,5 AGU/FAU-F)	0,48%
2. AAA + AMG A (10,5 AGU/FAU-F) + CELLIC™ CTec2	1,48%

[0297] Los resultados muestran que la adición de CELLIC™ CTec2 significativamente aumentó la cantidad de aceite de maíz extraído en un 208% en comparación con la muestra de control.

Ejemplo 3

[0298] Triturado de maíz industrialmente producido fue usado para todos experimentos de validación de ensayo.
Un contenedor de 5 galones con el triturado licuado fue descongelado, dividido en cantidades menores (botellas Nalgene de 1 litro con tapa de rosca), y recongelado.
Un litro de este triturado fue descongelado durante aproximadamente 4 horas antes del inicio de este estudio.
El triturado fue suplementado con 3 ppm de penicilina y 1000 ppm de urea que usa soluciones de 1 g/l penicilina y 200 g/l urea, y ajustado a pH 5,0 con 40% (v/v) H_2SO_4.
El contenido en sustancias secas del triturado fue medido en un modelo de equilibrio de humedad de lámpara de halógeno HB43-S (Mettler-Toledo, Toledo, Ohio) con un valor resultante de aproximadamente 30% DS.
Aproximadamente 25 g del triturado industrial fueron adicionados a tubos de 50 ml centrifugadores cónicos con tapones de rosca.
Se realizaron un total de 24 fermentaciones.

[0299] SPIRIZYME Ultra fue dosificado a una concentración final de 0,056% (% p/p de maíz).
Celluclast 1.5L, Shearzyme 2x, CELLIC™ Ctec2, CELLIC™ Htec2, y Shearzyme Plus fueron cada una dosificadas como 10 o 100 microgramos de enzima proteína/g DS.

[0300] Agua fue dosificada a cada muestra de 25 g de manera que el volumen adicionado total de enzima y agua fue normalizado para cada muestra en el conjunto.
Un total de 5,5 g de levadura Fermentis Ethanol Red fue rehidratado en 100 mL de agua del grifo a 35°C por incubación a 32°C durante 30 minutos.
Cada muestra de 25 g fue luego dosificada con una parte alícuota de 250 microlitros de la solución de levadura rehidratada.
Los tubos fueron pesados en el momento 0 y luego fermentados durante 70 horas a 32°C a 150 r.p.m. en una coctelera orbital incubada modelo SHKE4000-5 (ThermoScientific, Waltham, MA).
Después de 52 o 70 horas, los tubos fueron pesados y la concentración de etanol fue calculada utilizando la ecuación:

$$\text{g etanol/g DS} = \frac{\text{g } CO_2 \text{ pérdida de peso} \times \frac{1 \text{ mol } CO_2}{44{,}0098 \text{ g } CO_2} \times \frac{1 \text{ mol etanol}}{1 \text{ mol } CO_2} \times \frac{46{,}094 \text{ g etanol}}{1 \text{ mol etanol}}}{\text{g triturado en tubo} \times \%DS}$$

Destilación

[0301] Un sistema de evaporación Büchi Multivapor fue usado para todas las destilaciones (Buchi, Flawil, Suiza).
La unidad destiló 12 muestras de una vez.
Los parámetros evaluados para el tratamiento de deshidratación de sedimento húmedo se muestran en la tabla 3 y los parámetros para el tratamiento de extracción de aceite de maíz se muestran en la tabla 4:

Tabla 3. Parámetros de destilación para la deshidratación del sedimento húmedo

Tiempo	54 min
Temperatura	75°C
Vacío	275 - 185 mBar (35 min)
	175 mBar (14 min)
	185 - 175 mBar (15 min)
r.p.m.	8

Tabla 4. Parámetros de destilación para la extracción de aceite de maíz

Tiempo	45 min
Temperatura	75°C
Vacío	450 - 200 mBar
r.p.m.	8

Tratamiento final (deshidratación de sedimento húmedo)

[0302] Después de la destilación, las muestras de vinaza entera fueron centrifugadas a 1,400 x g durante 10 minutos en una serie centrífuga Avanti J-E con un rotor JS-5,3 (Beckman Coulter, Brea, CA).
Tras la centrifugación, las muestras fueron inmediatamente decantadas en tubos cónicos prepesados de 15 mL.
Los pesos del sedimento húmedo resultante y la vinaza fina fueron registrados.
El sedimento húmedo fue rascado del tubo y colocado en bandejas secadas prepesadas e incubado a 55°C durante toda la noche y transferido a 105°C durante 2 horas en los hornos de incubación (modelos VWR: 1545 y 1370FM, respectivamente).
Los pesos fueron registrados antes y después de cada incubación.
Estos valores fueron usados para calcular valores de sólidos secos usando la fórmula siguiente:

$$\%DS = \frac{g\,\text{muestra seca}}{g\,\text{muestra húmeda}} * 100\%$$

Tratamiento final (extracción de aceite de maíz)

[0303] Hexano se añadió a cada muestra de vinaza entera en una dosis de 0,125 mL de materia prima de hexano/g.
Cada tubo fue sellado para prevenir fuga de muestra, y fue mezclado íntegramente.
Tubos fueron centrifugados a 3,000 x g durante 10 minutos en una serie centrífuga Avanti JE con un rotor JS-5.3.
Después de la centrifugación, la capa de aceite/hexano (sobrenadante) fue quitada utilizando una pipeta de desplazamiento positivo, transferida a un tubo prepesado de 5 ml de cubierta retirable, y repesado.
La densidad de la muestra fue medida utilizando un medidor de densidad analítica de investigación modelo DDM 2911 (Rudolph Research Analytical, Hackettstown, NJ).
La densidad del sobrenadante fue luego insertada en la ecuación de curva estándar para encontrar el porcentaje de aceite en el sobrenadante.
De este valor se derivó el porcentaje de aceite total en la materia prima.

[0304] Los resultados son mostrados debajo en las tablas 5-13.

Tabla 5

			% cambio con respecto al control			
T. aurantiacus GH61A	Dosis (microgramos EP/g DS)	Dosis (actividad/g DS)	Sedimento húmedo	Vinaza fina	Sólidos secos	Aceite
	10	n/a	-2,0	1,5	2,5	1,8
	100	n/a	-1,4	1,1	1,7	2,7

Tabla 6

			% cambio con respecto al control			
CELLIC™ CTec	Dosis (microgramos EP/g DS)	Dosis (actividad/g DS)	Sedimento húmedo	Vinaza fina	Sólidos secos	Aceite
	10	0,0578 EGU	-2,4	1,5	2,5	1,8
	100	0,578 EGU	1,9	-1,4	1,3	7,6

Tabla 7

			% cambio con respecto al control			
Celluclast 1,5L	Dosis (microgramos EP/g DS)	Dosis (actividad/g DS)	Sedimento húmedo	Vinaza fina	Sólidos secos	Aceite
	10	0,04 EGU	-3,9	2,7	1,3	-1,2
	100	0,4 EGU	-4,8	3,5	3,8	2,3

Tabla 8

% cambio con respecto al control

Shearzyme 2X	Dosis (microgramos EP/g DS)	Dosis (actividad/g DS)	Sedimento húmedo	Vinaza fina	Sólidos secos	Aceite
	10	0,3 FXU	-1,6	1,2	0,3	1,6
	100	3,0 FXU	-2,4	1,4	0,04	8,9

Tabla 9

CELLIC™ HTec2	Dosis (microgramos EP/g DS)	Dosis (actividad/g DS)	% cambio con respecto al control			
			Sedimento húmedo	Vinaza fina	Sólidos secos	Aceite
	10	0,011 EGU, 0,2173 FXU	-2,5	1,9	0,5	-1,8
	100	0,11 EGU, 2,173 FXU	-2,3	1,7	0,6	3,0

Tabla 10

Shearzyme Plus	Dosis (microgramos EP/g DS)	Dosis (actividad/g DS)	% cambio con respecto al control			
			Sedimento húmedo	Vinaza fina	Sólidos secos	Aceite
	10	0,0365 EGU, 0,026 FXU	-5,5	4,0	4,3	4,7
	100	0,365 EGU, 0,26 FXU	-11,9	8,5	5,6	18,7

Tabla 11

CELLIC™ CTec2	Dosis (microgramos EP/g DS)	Dosis (actividad/g DS)	% cambio con respecto al control			
			Sedimento húmedo	Vinaza fina	Sólidos secos	Aceite
	10	0,076 EGU, 0,0147 FXU	-3,1	2,2	2,3	9,7
	100	0,76 EGU, 0,147 FXU	-9,6	6,6	4,8	7,1

[0305] Los resultados indican que la combinación de actividades de celulasa, xilanasa, y GH61 aumentó la eficacia de extracción de aceite y la deshidratación en una forma sinergística.
Además, cuanto mayor es la proporción entre la actividad de celulasa y la actividad de xilanasa cuando estas actividades fueron combinadas, superior es la mejora de la extracción de aceite de maíz y efectos de deshidratación.
De manera individual, ninguna de las actividades (celulasa, xilanasa y GH61) contribuyó significativamente a aumentar la extracción o deshidratación de aceite, a menos que fueran usadas en dosis antieconómicamente altas.

Ejemplo 4

[0306] Triturado de maíz industrialmente producido fue usado para todas las muestras.
Un contenedor de 5 galones con el triturado licuado fue descongelado, dividido en cantidades menores (botellas con tapa de rosca Nalgene de 1 litro) y recongelado.
Un litro de este triturado fue descongelado durante aproximadamente 4 horas antes del inicio este estudio.
El triturado fue suplementado con 3 ppm de penicilina y 1000 ppm de urea usando soluciones de 1 g/l penicilina y 200 g/L urea, respectivamente, y ajustado a pH 5,0 con 40% H2SO4.
El contenido en sustancias secas del triturado fue medido en un equilibrio de humedad Mettler-Toledo (HB43-S halógeno), con un valor resultante de 30,00% DS.
Aproximadamente 5 g del triturado industrial se añadió a tubos centrifugadores cónicos con tpas retirables 15 ml (NUNC #362694).
Se realizaron un total de 126 fermentaciones.
Las enzimas fueron dosificadas según las especificaciones de producto en la siguiente tabla y el volumen de solución madre para añadir a la fermentación fue determinado utilizando la ecuación:

$$\text{Dosis de enzima (ml)} = \frac{\text{Dosis enz. final (mg EP/g DS) x peso de triturado (g) x contenido sólido (\%DS)}}{\text{Conc. enzima (mg EP/ml)}}$$

	Enzima	Dosis	Unidades
1	Spirizyme Ultra (Control)	0,500	AGU/g DS
2	CELLIC™ CTEC2	100,000	Microgramos EP/g DS
3	CELLIC™ CTEC2	1000,000	Microgramos EP/g DS
4	Celluclast 1,5L	100,000	Microgramos EP/g DS
5	Shearzyme Plus	10,000	Microgramos EP/g DS
6	Shearzyme Plus	100,000	Microgramos EP/g DS

[0307] El agua fue dosificada en cada muestra de manera que el volumen adicionado total de enzima y agua fue aproximadamente de 70 microliters/25 g de muestra.
Levadura rehidratada (5,5 g levadura Fermentis Ethanol Red en 100 mL a 35°C en agua del grifo incubada a 32°C durante 30 minutos) fue dosificada a 50 microlitros de solución de levadura en cada muestra de 5 g.
Los tubos fueron pesados en el momento 0 y luego fermentados durante 52 o 70 horas a 32°C, controlando pérdida de peso en toda fermentación y calculando retroactivamente para determinar la cantidad de etanol producido según la ecuación siguiente:

$$\text{g etanol/g DS} = \frac{\text{g } CO_2 \text{ pérdida de peso} \times \frac{1 \text{ mol } CO_2}{44{,}0098 \text{ g } CO_2} \times \frac{1 \text{ mol etanol}}{1 \text{ mol } CO_2} \times \frac{46{,}094 \text{ g etanol}}{1 \text{ mol etanol}}}{\text{g triturado en tubo} \times \%DS}$$

Análisis de HPLC

[0308] Al final del punto de tiempo de fermentación, 50 microlitros de 40% H_2SO_4 se añadieron a cada muestra y se agitaron en vórtex para asegurar la mezcla.
Las muestras fueron centrifugadas a 1570 x g (3000 r.p.m.) durante 10 minutos en una mesa de trabajo centrífuga Beckman Coulture (Allegra 6R) con rotor GH3.8 y luego filtradas en los viales de HPLC a través de 0,45 filtros de jeringa de micra (Whatman) antes de someterlas a análisis de HPLC.

Sistema de HPLC:
- Serie de Agilent 1100/1200 con el software de la estación Chem
- Desgasificador
- Bomba cuadrática
- Auto-muestreador
- Compartimento de columna /peso calefactor
- Detector de índice de refracción (RI)

Columna:
- Bio-Rad HPX- 87H Ion Exclusion Column 300 mm x 7,8 mm partes# 125-0140
- Bio-Rad catión de cartucho de guardia H partes# 125-0129, Holder partes# 125-0131

Método:
- 0,005 M H_2SO_4 fase móvil
- Velocidad de flujo de 0,6 ml/min
- Temperatura de columna - 65°C
- Temperatura detectora de RI - 55°C

[0309] El método cuantifica diferentes analitos usando estándares de calibración para dextrinas (DP4+), maltotriosa, maltosa, glucosa, fructosa, ácido acético, ácido láctico, glicerol y etanol.
Se utiliza una calibración de 4 puntos incluyendo el origen.

[0310] Los resultados de rendimiento y aumento de etanol sobre el control a 52 y 70 horas de fermentación se resumen en la tabla 12.

Tabla 12 - comparación de producciones de etanol después de 52 y 70 horas de tiempo de fermentación

	52 horas de fermentación		70 horas de fermentación	
Muestra	Etanol (g/l)	Aumento %	Etanol (g/l)	Aumento %

Control	133,30		135,29	
CELLIC™ CTec2 (100 microgramos EP/g DS)	134,64	1,01%	136,88	1,17%
CELLIC™ CTec2 (1 mg EP/g DS)	137,26	2,97%	138,74	2,55%
Celluclast 1,5L (100 microgramos EP/g DS)	134,42	0,84%	135,89	0,44%
Shearzyme Plus (10 microgramos EP/g DS)	133,90	0,45%	135,51	0,17%
Shearzyme Plus (100 microgramos EP/g DS)	133,50	0,15%	135,76	0,35%

[0311] Los resultados muestran que después de 52 horas, hay dos muestras que tienen aumento significativo en el etanol, CELLIC™ CTec2 dosificado a 100 microgramos EP/g DS (aumento de 1,01%) y a 1 mg EP/g DS (aumento de 2,97%).
Después de 70 horas, los mismos resultados fueron observados CELLIC™ CTec2, la única muestra con un aumento significativo sobre el control cuando dosificada a 100 microgramos EP/g DS (aumento de 1,17%) y 1 mg EP/g DS (aumento de 2,55%).
Ninguna otra muestra indicó un aumento significativo sobre el control aunque también son enzimas de degradación de celulosa y hemicelulosa (celulasas y xilanasa).
Esto sugiere que una una combinación de celulasa y enzimas de degradación de xilanasa se necesita para mejorar el rendimiento de etanol en la proporción contenida en el CELLIC™ CTec2.
Esta proporción óptima se soporta por el hecho de que Shearzyme Plus también contiene celulasas y enzimas de degradación de xilanasa pero en una cantidad mucho más alta de xilanasa los resultados en rendimiento no son tan altos como CELLIC™ CTec2.

Ejemplo 5

[0312] Una porción de maíz fue molida en seco utilizando un molino Fitzpatrick Hammer con una pantalla nº 7.
El contenido de sustancia en seco del producto molido fue medido gravimétricamente a 88,0% p/p.
Un triturado con 30% de sustancia seca fue hecho utilizando 681,8 g de maíz molido y 1318,2 g de agua de ciudad. 0,11 g de Termamyl SC-L (alfa-amilasa) fueron añadidos en una dosificación que fue equivalente a 20 KNU/kg de maíz molido.
El triturado fue calentado de 55°C a 90°C durante 60 minutos con agitación y luego enfriado a 32°C y dividido en partes de 240 g para la sacarificación simultánea y ensayos de fermentación que fueron llevados en matraz de 500 ml de tapa azul con una esclusa de aire colocada en el tapón de caucho.

[0313] Después de la licuefacción del triturado de maíz usando Termamyl SC-L las clases enzimáticas y los productos mostrados en la tabla 13 fueron usados:

Tabla 13

Clases enzimáticas	Productos enzimáticos y dosificaciones (% de sustancia seca de maíz)
Glucoamilasa	Spirizyme Plus 0,1%
Glucoamilasa + complejo de celulasa con actividad de xilanasa (familia GH3)	Spirizyme Plus 0,1% + Celluclast 1,5L 1%
Glucoamilasa + complejo de celulasa con actividad de xilanasa (familia GH3) + esterasa de ácido ferúlico y beta-glucanasa con actividad de xilanasa (familia GH3)	Spirizyme Plus 0,1% + Celluclast 1,5L 0,5% + Ultraflo L 0,5%
Glucoamilasa + esterasa de ácido ferúlico y beta-glucanasa con actividad de xilanasa (familia GH3)	Spirizyme Plus 0,1 % + Ultraflo L 1%

[0314] Después de 30 minutos se añadió preparación con las enzimas y dosificaciones proporcionados en la tabla 13, 0,20 g de levadura panadera fresca (Danish Distillers A/S) a cada matraz.
Los ensayos simultáneos de sacarificación y fermentación fueron llevados a cabo en una cámara termostatizada con la tabla de agitación a 32°C a 150 r.p.m. en una coctelera Innova® 44.
El tiempo de fermentación fue de 67 horas y al final del periodo de fermentación todas las muestras fueron analizadas para evaluar su de etanol y azúcares solubles residuales en la HPLC.

[0315] Para determinar grasa/aceite, todas las muestras fueron centrifugadoas y los sobrenadantes y el sedimento fueron separados y liofilizados en las bandejas de aluminio.
El contenido de aceite en el sedimento fue analizado en un extractor de solvente acelerado ASE 300 (Dionex Corporation).

[0316] El aceite del sobrenadante fue diluido en el hexano y filtrado.
El hexano fue evaporado en una campana de gas y el aceite fue pesado.

[0317] Los resultados de las determinaciones de etanol después de 67 horas estuvieron en el intervalo de 11-13% p/p dando como resultado rendimientos alcohólicos en el intervalo de 27-34 kg etanol/100 kg sustancia seca basada en maíz molido.
Estos rendimientos estuvieron en el rango normal para ensayos de laboratorio.

[0318] La tabla 14 muestra los datos de recuperación de aceite real y los rendimientos medios de aceite al sobrenadante (vinaza) se calcula al igual que los rendimiento extra obtenidos según la invención.
El cálculo de rendimiento fue basado en un contenido de aceite de 10,50% p/p encontrado en el producto de maíz molido.

Tabla 14 - recuperación de aceite

Productos enzimáticos y dosificaciones (% de sustancia seca de maíz)	Masa de DDG, g	Masa de aceite en DDG, g	Rendimiento de aceite (a sobrenadante),%	Rendimiento medio de aceite (a sobrenadante),%	% rendimiento extra según la invención
Spirizyme Plus 0,1%	30,86	3,76	52,8	59,5	0
	31,35	2,68	66,3		
Spirizyme Plus 0,1% + Celluclast 1,5 L 1%	27,98	2,04	74,3	74,0	24
	28,59	2,10	73,6		
Spirizyme Plus 0,1% + Celluclast 1,5 L 0,5% + Ultraflo L 0,5%	24,50	1,90	76,1	80,1	35
	23,54	1,26	84,2		
Spirizyme Plus 0,1 % + Ultraflo L 1%	22,84	2,45	69,2	69,1	16
	23,40	2,46	69,1		

[0319] Los resultados muestran que hay un efecto sinergístico de celulasas, xilanasas y esterasa ferúlica que resultó en un rendimiento extra de 35% de aceite.
Casi el doble de la masa de aceite podría ser extraída aplicando la enzimas de degradación de pared celular que trabajan sinergísticamente (Celluclast + Ultraflo).
Se cree que a mayor concentración de etanol en la vinaza fina, superior la cantidad de aceite (incluyendo fosfolípidos) que puede ser extraída.

[0320] No se realizó ningún pretratamiento especial de la harina de maíz diferente al fresado.

[0321] Un fresado fino es recomendado, bien seco o mojado en un paso adecuado del proceso para mejorar más los rendimientos.

LISTADO DE SECUENCIAS

```
<110>  Saunders, Jeremy D.
       Akerman, Michael
       Jump, Joseph M.
       Olsen, Hans Sejr
       Guichard, Amanda
       Kreel, Nathaniel  E.
       Hjulmand, Anne

<120>  Métodos para el aumento de productos derivados de procesos de
fermentación

<130>  11683-WO-PCT

<150>  US 61/318,787
<151>  2010-03-30
```

<160> 32

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 326
<212> PRT
<213> Thielavia terrestris

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Ala Asp Gly Ser Ser Gly Trp Phe Lys Val Phe Gln Asp Ser
115 120 125

Trp Ala Lys Asn Pro Ser Gly Ser Thr Gly Asp Asp Asp Tyr Trp Gly
130 135 140

Thr Lys Asp Leu Asn Ser Cys Cys Gly Lys Met Asn Val Lys Ile Pro
145 150 155 160

Glu Asp Ile Glu Pro Gly Asp Tyr Leu Leu Arg Ala Glu Val Ile Ala
165 170 175

Leu His Val Ala Ala Ser Ser Gly Gly Ala Gln Phe Tyr Met Ser Cys
180 185 190

Tyr Gln Leu Thr Val Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Pro Ser Thr Val
195 200 205

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

Ile His Ala Pro Met Ser Thr Tyr Val Val Pro Gly Pro Thr Val Tyr
225 230 235 240

Ala Gly Gly Ser Thr Lys Ser Ala Gly Ser Ser Cys Ser Gly Cys Glu
245 250 255

Ala Thr Cys Thr Val Gly Ser Gly Pro Ser Ala Thr Leu Thr Gln Pro
260 265 270

Thr Ser Thr Ala Thr Ala Thr Ser Ala Pro Gly Gly Gly Gly Ser Gly
275 280 285

Cys Thr Ala Ala Lys Tyr Gln Gln Cys Gly Gly Thr Gly Tyr Thr Gly
290 295 300

Cys Thr Thr Cys Ala Ser Gly Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Pro Pro
305 310 315 320

Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu
325

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

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Val Pro Glu Gly Leu Ala Pro Gly Asn Tyr Leu Val Arg His Glu
165 170 175

Leu Ile Ala Leu His Gln Ala Asn Asn Pro Gln Phe Tyr Pro Glu Cys
180 185 190

Ala Gln Val Val Ile Thr Gly Ser Gly Thr Ala Gln Pro Asp Ala Ser
195 200 205

Tyr Lys Ala Ala Ile Pro Gly Tyr Cys Asn Gln Asn Asp Pro Asn Ile
210 215 220

Lys Val Pro Ile Asn Asp His Ser Ile Pro Gln Thr Tyr Lys Ile Pro
225 230 235 240

Gly Pro Pro Val Phe Lys Gly Thr Ala Ser Lys Lys Ala Arg Asp Phe
245 250 255

Thr Ala

<210> 4
<211> 226
<212> PRT
<213> Thielavia terrestris

<400> 4

Met Leu Ala Asn Gly Ala Ile Val Phe Leu Ala Ala Ala Leu Gly Val
1 5 10 15

Ser Gly His Tyr Thr Trp Pro Arg Val Asn Asp Gly Ala Asp Trp Gln
20 25 30

Gln Val Arg Lys Ala Asp Asn Trp Gln Asp Asn Gly Tyr Val Gly Asp
35 40 45

Val Thr Ser Pro Gln Ile Arg Cys Phe Gln Ala Thr Pro Ser Pro Ala
50 55 60

Pro Ser Val Leu Asn Thr Thr Ala Gly Ser Thr Val Thr Tyr Trp Ala
65 70 75 80

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

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

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

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

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

Val Ala Gln Ser Val Gly Gly Ala Gln Phe Tyr Ile Ser Cys Ala Gln

165 170 175

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

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

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

Ser Cys
225

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

<400> 5

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

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

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

Val Thr Asp Leu Thr Ser Asp Asp Leu Arg Cys Asn Val Gly Ala Gln
50 55 60

Gly Ala Gly Thr Asp Thr Val Thr Val Lys Ala Gly Asp Gln Phe Thr
65 70 75 80

Phe Thr Leu Asp Thr Pro Val Tyr His Gln Gly Pro Ile Ser Ile Tyr
85 90 95

Met Ser Lys Ala Pro Gly Ala Ala Ser Asp Tyr Asp Gly Ser Gly Gly
100 105 110

Trp Phe Lys Ile Lys Asp Trp Gly Pro Thr Phe Asn Ala Asp Gly Thr
115 120 125

Ala Thr Trp Asp Met Ala Gly Ser Tyr Thr Tyr Asn Ile Pro Thr Cys
130 135 140

Ile Pro Asp Gly Asp Tyr Leu Leu Arg Ile Gln Ser Leu Ala Ile His
145 150 155 160

Asn Pro Trp Pro Ala Gly Ile Pro Gln Phe Tyr Ile Ser Cys Ala Gln
165 170 175

Ile Thr Val Thr Gly Gly Gly Asn Gly Asn Pro Gly Pro Thr Ala Leu
180 185 190

Ile Pro Gly Ala Phe Lys Asp Thr Asp Pro Gly Tyr Thr Val Asn Ile
195 200 205

Tyr Thr Asn Phe His Asn Tyr Thr Val Pro Gly Pro Glu Val Phe Ser
210 215 220

Cys Asn Gly Gly Gly Ser Asn Pro Pro Pro Pro Val Ser Ser Ser Thr
225 230 235 240

Pro Ala Thr Thr Thr Leu Val Thr Ser Thr Arg Thr Thr Ser Ser Thr
245 250 255

Ser Ser Ala Ser Thr Pro Ala Ser Thr Gly Gly Cys Thr Val Ala Lys
260 265 270

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

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

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

<400> 6

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

Thr Ile Phe Val Gln Leu Glu Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Pro Val Ser

20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Ala Glu Met Ile Ala Leu His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Ala
165 170 175

Gln Leu Tyr Met Glu Cys Ala Gln Ile Asn Val Val Gly Gly Ser Gly
180 185 190

Ser Ala Ser Pro Gln Thr Tyr Ser Ile Pro Gly Ile Tyr Gln Ala Thr
195 200 205

Asp Pro Gly Leu Leu Ile Asn Ile Tyr Ser Met Thr Pro Ser Ser Gln
210 215 220

Tyr Thr Ile Pro Gly Pro Pro Leu Phe Thr Cys Ser Gly Ser Gly Asn
225 230 235 240

Asn Gly Gly Gly Ser Asn Pro Ser Gly Gly Gln Thr Thr Thr Ala Lys
245 250 255

Pro Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Thr Thr Ser Ser Ala Ala Pro Thr
260 265 270

Ser Ser Gln Gly Gly Ser Ser Gly Cys Thr Val Pro Gln Trp Gln Gln
275 280 285

Cys Gly Gly Ile Ser Phe Thr Gly Cys Thr Thr Cys Ala Ala Gly Tyr
290 295 300

Thr Cys Lys Tyr Leu Asn Asp Tyr Tyr Ser Gln Cys Gln
305 310 315

<210> 7
<211> 249
<212> PRT
<213> Thermoascus aurantiacus

<400> 7

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

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

Lys Tyr Tyr Gly Gly Tyr Leu Val Asn Gln Tyr Pro Tyr Met Ser Asn
35 40 45

Pro Pro Glu Val Ile Ala Trp Ser Thr Thr Ala Thr Asp Leu Gly Phe
50 55 60

Val Asp Gly Thr Gly Tyr Gln Thr Pro Asp Ile Ile Cys His Arg Gly
65 70 75 80

Ala Lys Pro Gly Ala Leu Thr Ala Pro Val Ser Pro Gly Gly Thr Val
85 90 95

Glu Leu Gln Trp Thr Pro Trp Pro Asp Ser His His Gly Pro Val Ile
100 105 110

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

Gln Leu Glu Phe Phe Lys Ile Ala Glu Ser Gly Leu Ile Asn Asp Asp
130 135 140

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

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

Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Gln Asn Gln Asp Gly
180 185 190

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

Ser Asp Asn Pro Ala Gly Thr Leu Gly Thr Ala Leu Tyr His Asp Thr
210 215 220

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

Ile Pro Gly Pro Pro Leu Tyr Thr Gly
245

<210> 8
<211> 249
<212> PRT
<213> Trichoderma reesei

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Pro Gly Ile Leu Phe Asn Pro Tyr Thr Thr Ile Thr Ser Tyr Thr
225 230 235 240

Ile Pro Gly Pro Ala Leu Trp Gln Gly
245

<210> 9
<211> 232
<212> PRT
<213> Myceliophthora thermophila

<400> 9

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

Ala His Tyr Thr Phe Pro Arg Ala Gly Thr Gly Gly Ser Leu Ser Gly
20 25 30

Glu Trp Glu Val Val Arg Met Thr Glu Asn His Tyr Ser His Gly Pro
35 40 45

Val Thr Asp Val Thr Ser Pro Glu Met Thr Cys Tyr Gln Ser Gly Val
50 55 60

Gln Gly Ala Pro Gln Thr Val Gln Val Lys Ala Gly Ser Gln Phe Thr
65 70 75 80

Phe Ser Val Asp Pro Ser Ile Gly His Pro Gly Pro Leu Gln Phe Tyr
85 90 95

Met Ala Lys Val Pro Ser Gly Gln Thr Ala Ala Thr Phe Asp Gly Thr
100 105 110

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

Thr Asp Ser Ile Thr Trp Pro Ser Ala Gly Lys Thr Glu Val Ser Val
130 135 140

Thr Ile Pro Ser Cys Ile Asp Asp Gly Glu Tyr Leu Leu Arg Val Glu
145 150 155 160

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

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

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

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

Pro Gly Pro Ala Pro Val Ser Cys
225 230

<210> 10

<211> 235
<212> PRT
<213> Myceliophthora thermophila

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

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

Asn Asn Gly Gln Trp Gly Thr Ser Thr Val Ile Ser Asn Gly Gly Glu
130 135 140

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

Arg Ala Glu Met Ile Ala Leu His Ala Ala Gly Ser Pro Gly Gly Ala
165 170 175

Gln Leu Tyr Met Glu Cys Ala Gln Ile Asn Ile Val Gly Gly Ser Gly
180 185 190

Ser Val Pro Ser Ser Thr Val Ser Phe Pro Gly Ala Tyr Ser Pro Asn
195 200 205

Asp Pro Gly Leu Leu Ile Asn Ile Tyr Ser Met Ser Pro Ser Ser Ser
210 215 220

Tyr Thr Ile Pro Gly Pro Pro Val Phe Lys Cys
225 230 235

<210> 11
<211> 323
<212> PRT
<213> Myceliophthora thermophila

<400> 11

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Asp Gly Ser Ser Gly Trp Phe Lys Val Phe Glu Asp Gly Trp
115 120 125

Ala Lys Asn Pro Ser Gly Gly Ser Gly Asp Asp Asp Tyr Trp Gly Thr
130 135 140

Lys Asp Leu Asn Ser Cys Cys Gly Lys Met Asn Val Lys Ile Pro Ala
145 150 155 160

Asp Leu Pro Ser Gly Asp Tyr Leu Leu Arg Ala Glu Ala Leu Ala Leu

165 170 175

His Thr Ala Gly Ser Ala Gly Gly Ala Gln Phe Tyr Met Thr Cys Tyr
180 185 190

Gln Leu Thr Val Thr Gly Ser Gly Ser Ala Ser Pro Pro Thr Val Ser
195 200 205

Phe Pro Gly Ala Tyr Lys Ala Thr Asp Pro Gly Ile Leu Val Asn Ile
210 215 220

His Ala Pro Leu Ser Gly Tyr Thr Val Pro Gly Pro Ala Val Tyr Ser
225 230 235 240

Gly Gly Ser Thr Lys Lys Ala Gly Ser Ala Cys Thr Gly Cys Glu Ser
245 250 255

Thr Cys Ala Val Gly Ser Gly Pro Thr Ala Thr Val Ser Gln Ser Pro
260 265 270

Gly Ser Thr Ala Thr Ser Ala Pro Gly Gly Gly Gly Gly Cys Thr Val
275 280 285

Gln Lys Tyr Gln Gln Cys Gly Gly Glu Gly Tyr Thr Gly Cys Thr Asn
290 295 300

Cys Ala Ser Gly Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Pro Pro Tyr Tyr Ser
305 310 315 320

Gln Cys Val

<210> 12
<211> 310
<212> PRT
<213> Myceliophthora thermophila

<400> 12

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

Ala Ile Phe Gln Arg Val Ser Val Asn Gly Gln Asp Gln Gly Gln Leu
20 25 30

Lys Gly Val Arg Ala Pro Ser Ser Asn Ser Pro Ile Gln Asn Val Asn
35 40 45

Asp Ala Asn Met Ala Cys Asn Ala Asn Ile Val Tyr His Asp Ser Thr
50 55 60

Ile Ile Lys Val Pro Ala Gly Ala Arg Val Gly Ala Trp Trp Gln His
65 70 75 80

Val Ile Gly Gly Pro Gln Gly Ala Asn Asp Pro Asp Asn Pro Ile Ala
85 90 95

Ala Ser His Lys Gly Pro Ile Gln Val Tyr Leu Ala Lys Val Asp Asn
100 105 110

Ala Ala Thr Ala Ser Pro Ser Gly Leu Arg Trp Phe Lys Val Ala Glu
115 120 125

Arg Gly Leu Asn Asn Gly Val Trp Ala Val Asp Glu Leu Ile Ala Asn
130 135 140

Asn Gly Trp His Tyr Phe Asp Leu Pro Ser Cys Val Ala Pro Gly Gln
145 150 155 160

Tyr Leu Met Arg Val Glu Leu Leu Ala Leu His Ser Ala Ser Ser Pro
165 170 175

Gly Gly Ala Gln Phe Tyr Met Gly Cys Ala Gln Ile Glu Val Thr Gly
180 185 190

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

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

Lys Pro Thr Asn Gly Gly Arg Ser Tyr Pro Ile Pro Gly Pro Arg Pro
225 230 235 240

Ile Ser Cys Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Asn Asn Gly Gly Gly Gly
245 250 255

Asp Asp Asn Asn Asn Asn Asn Gly Gly Gly Asn Asn Gly Gly Gly Gly
260 265 270

Gly Gly Ser Val Pro Leu Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Tyr Thr
275 280 285

Gly Pro Thr Thr Cys Ala Gln Gly Thr Cys Lys Val Ser Asn Glu Tyr
290 295 300

Tyr Ser Gln Cys Leu Pro
305 310

<210> 13
<211> 246
<212> PRT
<213> Myceliophthora thermophila

<400> 13

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

Gly His Ala Ile Phe Gln Lys Val Ser Val Asn Gly Ala Asp Gln Gly
20 25 30

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

Val Asn Ser Gln Asp Met Ile Cys Gly Gln Ser Gly Ser Thr Ser Asn
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ala Pro Ile Ser Cys
245

<210> 14
<211> 354
<212> PRT
<213> Thermoascus aurantiacus

<400> 14

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

Ser Leu Ala Ala Ala His Gly Tyr Val Thr Gly Ile Val Ala Asp Gly
20 25 30

Thr Tyr Tyr Gly Gly Tyr Ile Val Thr Gln Tyr Pro Tyr Met Ser Thr
35 40 45

Pro Pro Asp Val Ile Ala Trp Ser Thr Lys Ala Thr Asp Leu Gly Phe
50 55 60

Val Asp Pro Ser Ser Tyr Ala Ser Ser Asp Ile Ile Cys His Lys Gly
65 70 75 80

Ala Glu Pro Gly Ala Leu Ser Ala Lys Val Ala Ala Gly Gly Thr Val
85 90 95

Glu Leu Gln Trp Thr Asp Trp Pro Glu Ser His Lys Gly Pro Val Ile
100 105 110

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

Lys Leu Glu Phe Phe Lys Ile Asp Glu Ser Gly Leu Ile Asp Gly Ser
130 135 140

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

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

Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Gly Asn Thr Asn Gly
180 185 190

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

Thr Asp Thr Pro Ala Gly Thr Leu Gly Thr Glu Leu Tyr Lys Ala Thr
210 215 220

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

Ile Pro Gly Pro Ala Leu Tyr Thr Gly Gly Ser Ser Gly Ser Ser Gly
245 250 255

Ser Ser Asn Thr Ala Lys Ala Thr Thr Ser Thr Ala Ser Ser Ser Ile
260 265 270

Val Thr Pro Thr Pro Val Asn Asn Pro Thr Val Thr Gln Thr Ala Val
275 280 285

Val Asp Val Thr Gln Thr Val Ser Gln Asn Ala Ala Val Ala Thr Thr
290 295 300

Thr Pro Ala Ser Thr Ala Val Ala Thr Ala Val Pro Thr Gly Thr Thr

305 310 315 320

Phe Ser Phe Asp Ser Met Thr Ser Asp Glu Phe Val Ser Leu Met Arg
325 330 335

Ala Thr Val Asn Trp Leu Leu Ser Asn Lys Lys His Ala Arg Asp Leu
340 345 350

Ser Tyr

<210> 15
<211> 250
<212> PRT
<213> Aspergillus fumigatus

<400> 15

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

Ser Leu Val Ala Gly His Gly Phe Val Ser Gly Ile Val Ala Asp Gly
20 25 30

Lys Tyr Tyr Gly Gly Tyr Leu Val Asn Gln Tyr Pro Tyr Met Ser Asn
35 40 45

Pro Pro Asp Thr Ile Ala Trp Ser Thr Thr Ala Thr Asp Leu Gly Phe
50 55 60

Val Asp Gly Thr Gly Tyr Gln Ser Pro Asp Ile Ile Cys His Arg Asp
65 70 75 80

Ala Lys Asn Gly Lys Leu Thr Ala Thr Val Ala Ala Gly Ser Gln Ile
85 90 95

Glu Phe Gln Trp Thr Thr Trp Pro Glu Ser His His Gly Pro Leu Ile
100 105 110

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

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

Asn Pro Pro Gly Val Trp Ala Asp Asp Glu Met Ile Ala Asn Asn Asn
145 150 155 160

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

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

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

Ser Ala Gln Gly Ser Gly Thr Ala Gly Thr Ser Leu Tyr Lys Asn Thr
210 215 220

Asp Pro Gly Ile Lys Phe Asp Ile Tyr Ser Asp Leu Ser Gly Gly Tyr
225 230 235 240

Pro Ile Pro Gly Pro Ala Leu Phe Asn Ala
245 250

<210> 16
<211> 322
<212> PRT
<213> Penicillium pinophilum

<400> 16

Met Pro Ser Thr Lys Val Ala Ala Leu Ser Ala Val Leu Ala Leu Ala
1 5 10 15

Ser Thr Val Ala Gly His Gly Phe Val Gln Asn Ile Val Ile Asp Gly
20 25 30

Lys Ser Tyr Ser Gly Tyr Leu Val Asn Gln Phe Pro Tyr Glu Ser Asn
35 40 45

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

Val Ala Pro Ser Glu Tyr Thr Asn Ala Asp Ile Ile Cys His Lys Asn
65 70 75 80

Ala Thr Pro Gly Ala Leu Ser Ala Pro Val Ala Ala Gly Gly Thr Val

85 90 95

Glu Leu Gln Trp Thr Thr Trp Pro Asp Ser His His Gly Pro Val Ile
100 105 110

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

Lys Leu Asp Phe Val Lys Ile Asp Gln Gly Gly Leu Ile Asp Asp Thr
130 135 140

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

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

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

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

Thr Ala Ala Pro Ser Gly Thr Ala Gly Glu Lys Leu Tyr Thr Ser Thr
210 215 220

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

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

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

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

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

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

Val Leu

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

<400> 17

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

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

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

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

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

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

Pro Asn Ser Ala Pro Leu Asp Pro Ser His Lys Gly Pro Ala Ala Val
100 105 110

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

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

Lys Trp Gly Thr Thr Lys Met Ile Glu Asn Asn Gly His Ile Ser Val
145 150 155 160

Lys Val Pro Asp Asp Ile Glu Gly Gly Tyr Tyr Leu Ala Arg Thr Glu
165 170 175

Leu Leu Ala Leu His Ala Ala Asn Glu Gly Asp Pro Gln Phe Tyr Val
180 185 190

Gly Cys Ala Gln Leu Phe Ile Asp Ser Ala Gly Thr Ala Lys Pro Pro
195 200 205

Thr Val Ser Ile Gly Glu Gly Thr Tyr Asp Leu Ser Met Pro Ala Met
210 215 220

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

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

Ser Gly Ser Ala Ser Ala Thr Arg Ser Ser Ala Ile Pro Thr Ala Thr
260 265 270

Ala Val Thr Asp Cys Ser Ser Glu Glu Asp Arg Glu Asp Ser Val Met
275 280 285

Ala Thr Gly Val Pro Val Ala Arg Ser Thr Leu Arg Thr Trp Val Asp
290 295 300

Arg Leu Ser Trp His Gly Lys Ala Arg Glu Asn Val Lys Pro Ala Ala
305 310 315 320

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

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

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

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

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

Ser Asn Pro Thr Gly Pro Pro Asn Lys Gly Lys Asp Ile Thr Pro Thr

405 410 415

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

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

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

<400> 18

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

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

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

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

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

Cys His Arg Asn Ala Thr Pro Ala Pro Leu Thr Ala Pro Val Ala Ala
85 90 95

Gly Gly Thr Val Glu Leu Gln Trp Thr Pro Trp Pro Asp Ser His His
100 105 110

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

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

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

Ala Asn Asn Asn Ser Trp Thr Val Thr Ile Pro Asn Ser Val Ala Pro
165 170 175

Gly Asn Tyr Val Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Asn
180 185 190

Asn Lys Asp Gly Ala Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Ile Asn Ile Glu Val
195 200 205

Thr Gly Gly Gly Ser Asp Ala Pro Glu Gly Thr Leu Gly Glu Asp Leu
210 215 220

Tyr His Asp Thr Asp Pro Gly Ile Leu Val Asp Ile Tyr Glu Pro Ile
225 230 235 240

Ala Thr Tyr Thr Ile Pro Gly Pro Pro Glu Pro Thr Phe
245 250

<210> 19
<211> 223
<212> PRT
<213> Thielavia terrestris

<400> 19

Met Lys Leu Ser Ser Gln Leu Ala Ala Leu Thr Leu Ala Ala Ala Ser
1 5 10 15

Val Ser Gly His Tyr Ile Phe Glu Gln Ile Ala His Gly Gly Thr Lys
20 25 30

Phe Pro Pro Tyr Glu Tyr Ile Arg Arg Asn Thr Asn Tyr Asn Ser Pro
35 40 45

Val Thr Ser Leu Ser Ser Asn Asp Leu Arg Cys Asn Val Gly Gly Glu
50 55 60

Thr Ala Gly Asn Thr Thr Val Leu Asp Val Lys Ala Gly Asp Ser Phe
65 70 75 80

Thr Phe Tyr Ser Asp Val Ala Val Tyr His Gln Gly Pro Ile Ser Leu
85 90 95

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

100 105 110

Asp Trp Phe Lys Ile His Asp Trp Gly Pro Thr Phe Ser Asn Gly Gln
115 120 125

Ala Ser Trp Pro Leu Arg Asp Asn Tyr Gln Tyr Asn Ile Pro Thr Cys
130 135 140

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

Asn Pro Gly Ala Thr Pro Gln Phe Tyr Ile Ser Cys Ala Gln Val Arg
165 170 175

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

Gly Ala Phe Lys Ala Thr Asp Pro Gly Tyr Thr Ala Asn Ile Tyr Asn
195 200 205

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

<210> 20
<211> 246
<212> PRT
<213> Thielavia terrestris

<400> 20

Met Lys Phe Ser Leu Val Ser Leu Leu Ala Tyr Gly Leu Ser Val Glu
1 5 10 15

Ala His Ser Ile Phe Gln Arg Val Ser Val Asn Gly Gln Asp Gln Gly
20 25 30

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

Val Asn Ser Gln Asn Met Ile Cys Gly Gln Ser Gly Ser Lys Ser Gln
50 55 60

Thr Val Ile Asn Val Lys Ala Gly Asp Arg Ile Gly Ser Leu Trp Gln
65 70 75 80

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

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

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

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

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

Pro Gly Gln Tyr Leu Leu Arg Val Glu Val Leu Ala Leu His Ser Ala
165 170 175

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

Val Ser Gly Ser Gly Ser Phe Ser Pro Ser Gln Thr Val Ser Ile Pro
195 200 205

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

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

Pro Ala Pro Ile Ser Cys
245

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

<400> 21

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

Val Ala Gly His Ala Ile Phe Gln Gln Leu Trp His Gly Ser Ser Cys

20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asp Tyr Leu Leu Arg Ala Glu Ala Leu Ala Leu His Thr Ala Gly
165 170 175

Gln Val Gly Gly Ala Gln Phe Tyr Met Ser Cys Tyr Gln Ile Thr Val
180 185 190

Ser Gly Gly Gly Ser Ala Ser Pro Ala Thr Val Lys Phe Pro Gly Ala
195 200 205

Tyr Ser Ala Asn Asp Pro Gly Ile His Ile Asn Ile His Ala Ala Val
210 215 220

Ser Asn Tyr Val Ala Pro Gly Pro Ala Val Tyr Ser Gly Gly Thr Thr
225 230 235 240

Lys Val Ala Gly Ser Gly Cys Gln Gly Cys Glu Asn Thr Cys Lys Val
245 250 255

Gly Ser Ser Pro Thr Ala Thr Ala Pro Ser Gly Lys Ser Gly Ala Gly
260 265 270

Ser Asp Gly Gly Ala Gly Thr Asp Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Pro
275 280 285

Asp Thr Gly Ser Ala Cys Ser Val Gln Ala Tyr Gly Gln Cys Gly Gly
290 295 300

Asn Gly Tyr Ser Gly Cys Thr Gln Cys Ala Pro Gly Tyr Thr Cys Lys
305 310 315 320

Ala Val Ser Pro Pro Tyr Tyr Ser Gln Cys Ala Pro Ser Ser
325 330

<210> 22
<211> 227
<212> PRT
<213> Thielavia terrestris

<400> 22

Met Lys Leu Ser Val Ala Ile Ala Val Leu Ala Ser Ala Leu Ala Glu
1 5 10 15

Ala His Tyr Thr Phe Pro Ser Ile Gly Asn Thr Ala Asp Trp Gln Tyr
20 25 30

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

Thr Ser Asp Gln Ile Arg Cys Tyr Glu Arg Asn Pro Gly Thr Gly Ala
50 55 60

Gln Gly Ile Tyr Asn Val Thr Ala Gly Gln Thr Ile Asn Tyr Asn Ala
65 70 75 80

Lys Ala Ser Ile Ser His Pro Gly Pro Met Ser Phe Tyr Ile Ala Lys
85 90 95

Val Pro Ala Gly Gln Thr Ala Ala Thr Trp Asp Gly Lys Gly Ala Val
100 105 110

Trp Thr Lys Ile Tyr Gln Asp Met Pro Lys Phe Gly Ser Ser Leu Thr
115 120 125

Trp Pro Thr Met Gly Ala Lys Ser Val Pro Val Thr Ile Pro Arg Cys
130 135 140

Leu Gln Asn Gly Asp Tyr Leu Leu Arg Ala Glu His Ile Ala Leu His
145 150 155 160

Ser Ala Ser Ser Val Gly Gly Ala Gln Phe Tyr Leu Ser Cys Ala Gln
165 170 175

Leu Thr Val Ser Gly Gly Ser Gly Thr Trp Asn Pro Lys Asn Arg Val
180 185 190

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

Ile Tyr Tyr Pro Val Pro Thr Ser Tyr Ser Pro Pro Gly Pro Pro Ala
210 215 220

Glu Thr Cys
225

<210> 23
<211> 368
<212> PRT
<213> Thielavia terrestris

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Asp Pro Gly Ile Leu Val Asn Ile Tyr Ser Ala Pro Ile Thr Tyr
225 230 235 240

Thr Val Pro Gly Pro Ala Leu Ile Ser Gly Ala Val Ser Ile Ala Gln
245 250 255

Ser Ser Ser Ala Ile Thr Ala Ser Gly Thr Ala Leu Thr Gly Ser Ala
260 265 270

Thr Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr Thr Ser Thr Thr Asn Ala
275 280 285

Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ala Gly Thr Ser Thr Thr
290 295 300

Thr Thr Ser Ala Ala Ala Val Val Gln Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser
305 310 315 320

Ala Pro Ser Ser Ala Ala Ala Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala Ala Ser
325 330 335

Ala Arg Pro Thr Gly Cys Ser Ser Gly Arg Ser Arg Lys Gln Pro Arg
340 345 350

Arg His Ala Arg Asp Met Val Val Ala Arg Gly Ala Glu Glu Ala Asn
355 360 365

<210> 24
<211> 330
<212> PRT
<213> Thielavia terrestris

<400> 24

Met Pro Pro Ala Leu Pro Gln Leu Leu Thr Thr Val Leu Thr Ala Leu
1 5 10 15

Thr Leu Gly Ser Thr Ala Leu Ala His Ser His Leu Ala Tyr Ile Ile
20 25 30

Val Asn Gly Lys Leu Tyr Gln Gly Phe Asp Pro Arg Pro His Gln Ala
35 40 45

Asn Tyr Pro Ser Arg Val Gly Trp Ser Thr Gly Ala Val Asp Asp Gly
50 55 60

Phe Val Thr Pro Ala Asn Tyr Ser Thr Pro Asp Ile Ile Cys His Ile
65 70 75 80

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

Ile His Val Gln Trp Asn Gly Trp Pro Val Gly His Ile Gly Pro Val
100 105 110

Leu Ser Tyr Leu Ala Arg Cys Glu Ser Asp Thr Gly Cys Thr Gly Gln
115 120 125

Asn Lys Thr Ala Leu Arg Trp Thr Lys Ile Asp Asp Ser Ser Pro Thr

130 135 140

Met Gln Asn Val Ala Gly Ala Gly Thr Gln Gly Glu Gly Thr Pro Gly
145 150 155 160

Lys Arg Trp Ala Thr Asp Val Leu Ile Ala Ala Asn Asn Ser Trp Gln
165 170 175

Val Ala Val Pro Ala Gly Leu Pro Thr Gly Ala Tyr Val Leu Arg Asn
180 185 190

Glu Ile Ile Ala Leu His Tyr Ala Ala Arg Lys Asn Gly Ala Gln Asn
195 200 205

Tyr Pro Leu Cys Met Asn Leu Trp Val Asp Ala Ser Gly Asp Asn Ser
210 215 220

Ser Val Ala Ala Thr Thr Ala Ala Val Thr Ala Gly Gly Leu Gln Met
225 230 235 240

Asp Ala Tyr Asp Ala Arg Gly Phe Tyr Lys Glu Asn Asp Pro Gly Val
245 250 255

Leu Val Asn Val Thr Ala Ala Leu Ser Ser Tyr Val Val Pro Gly Pro
260 265 270

Thr Val Ala Ala Gly Ala Thr Pro Val Pro Tyr Ala Gln Gln Ser Pro
275 280 285

Ser Val Ser Thr Ala Ala Gly Thr Pro Val Val Val Thr Arg Thr Ser
290 295 300

Glu Thr Ala Pro Tyr Thr Gly Ala Met Thr Pro Thr Val Ala Ala Arg
305 310 315 320

Met Lys Gly Arg Gly Tyr Asp Arg Arg Gly
325 330

<210> 25
<211> 236
<212> PRT
<213> Thielavia terrestris

<400> 25

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

His Gly Tyr Val Asp Asn Ala Thr Ile Gly Gly Gln Phe Tyr Gln Asn
20 25 30

Pro Ala Val Leu Thr Phe Phe Gln Pro Asp Arg Val Ser Arg Ser Ile
35 40 45

Pro Gly Asn Gly Pro Val Thr Asp Val Thr Leu Ile Asp Leu Gln Cys
50 55 60

Asn Ala Asn Ser Thr Pro Ala Lys Leu His Ala Thr Ala Ala Ala Gly
65 70 75 80

Ser Asp Val Ile Leu Arg Trp Thr Leu Trp Pro Glu Ser His Val Gly
85 90 95

Pro Val Ile Thr Tyr Met Ala Arg Cys Pro Asp Thr Gly Cys Gln Asp
100 105 110

Trp Met Pro Gly Thr Ser Ala Val Trp Phe Lys Ile Lys Glu Gly Gly
115 120 125

Arg Asp Gly Thr Ser Asn Thr Trp Ala Asp Thr Pro Leu Met Thr Ala
130 135 140

Pro Thr Ser Tyr Thr Tyr Thr Ile Pro Ser Cys Leu Lys Lys Gly Tyr
145 150 155 160

Tyr Leu Val Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ala Ala Tyr Thr Tyr
165 170 175

Pro Gly Ala Gln Phe Tyr Pro Gly Cys His Gln Leu Asn Val Thr Gly
180 185 190

Gly Gly Ser Thr Val Pro Ser Ser Gly Leu Val Ala Phe Pro Gly Ala
195 200 205

Tyr Lys Gly Ser Asp Pro Gly Ile Thr Tyr Asp Ala Tyr Lys Ala Gln
210 215 220

Thr Tyr Gln Ile Pro Gly Pro Ala Val Phe Thr Cys
225 230 235

<210> 26
<211> 250
<212> PRT
<213> Thielavia terrestris

<400> 26

Met Ala Leu Leu Leu Leu Ala Gly Leu Ala Ile Leu Ala Gly Pro Ala
1 5 10 15

His Ala His Gly Gly Leu Ala Asn Tyr Thr Val Gly Asn Thr Trp Tyr
20 25 30

Arg Gly Tyr Asp Pro Phe Thr Pro Ala Ala Asp Gln Ile Gly Gln Pro
35 40 45

Trp Met Ile Gln Arg Ala Trp Asp Ser Ile Asp Pro Ile Phe Ser Val
50 55 60

Asn Asp Lys Ala Leu Ala Cys Asn Thr Pro Ala Thr Ala Pro Thr Ser
65 70 75 80

Tyr Ile Pro Ile Arg Ala Gly Glu Asn Ile Thr Ala Val Tyr Trp Tyr
85 90 95

Trp Leu His Pro Val Gly Pro Met Thr Ala Trp Leu Ala Arg Cys Asp
100 105 110

Gly Asp Cys Arg Asp Ala Asp Val Asn Glu Ala Arg Trp Phe Lys Ile
115 120 125

Trp Glu Ala Gly Leu Leu Ser Gly Pro Asn Leu Ala Glu Gly Met Trp
130 135 140

Tyr Gln Lys Ala Phe Gln Asn Trp Asp Gly Ser Pro Asp Leu Trp Pro
145 150 155 160

Val Thr Ile Pro Ala Gly Leu Lys Ser Gly Leu Tyr Met Ile Arg His
165 170 175

Glu Ile Leu Ser Ile His Val Glu Asp Lys Pro Gln Phe Tyr Pro Glu
180 185 190

Cys Ala His Leu Asn Val Thr Gly Gly Gly Asp Leu Leu Pro Pro Asp
195 200 205

Glu Phe Leu Val Lys Phe Pro Gly Ala Tyr Lys Glu Asp Asn Pro Ser
210 215 220

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

Thr Ile Pro Gly Gly Pro Ile Trp Asp Gly
245 250

<210> 27
<211> 478
<212> PRT
<213> Thielavia terrestris

<400> 27

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

Ala Ser Leu Ser Thr Ala His Thr Val Phe Thr Thr Leu Phe Ile Asn
20 25 30

Gly Val Asp Gln Gly Asp Gly Thr Cys Ile Arg Met Ala Lys Lys Gly
35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Arg Gly Pro Pro Pro Phe His Gly Glu Gly Ala Ala Ala Glu Thr Ala

355 360 365

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 28

Met Gln Leu Leu Val Gly Leu Leu Leu Ala Ala Val Ala Ala Arg Ala
1 5 10 15

His Tyr Thr Phe Pro Arg Leu Val Val Asn Gly Gln Pro Glu Asp Lys
20 25 30

Asp Trp Ser Val Thr Arg Met Thr Lys Asn Ala Gln Ser Lys Gln Gly
35 40 45

Val Gln Asp Pro Thr Ser Pro Asp Ile Arg Cys Tyr Thr Ser Gln Thr
50 55 60

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

Ser Thr Gln Gln Ile Asn His Pro Gly Pro Thr Gln Tyr Tyr Leu Ala
85 90 95

Lys Val Pro Ala Gly Ser Ser Ala Lys Thr Trp Asp Gly Ser Gly Ala
100 105 110

Val Trp Phe Lys Ile Ser Thr Thr Met Pro Tyr Leu Asp Asn Asn Lys
115 120 125

Gln Leu Val Trp Pro Asn Gln Asn Thr Tyr Thr Thr Val Asn Thr Thr
130 135 140

Ile Pro Ala Asp Thr Pro Ser Gly Glu Tyr Leu Leu Arg Val Glu Gln
145 150 155 160

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

Ala Cys Ser Gln Ile Gln Ile Thr Gly Gly Gly Asn Gly Thr Pro Gly
180 185 190

Pro Leu Val Ala Leu Pro Gly Ala Tyr Lys Ser Asn Asp Pro Gly Ile
195 200 205

Leu Val Asn Ile Tyr Ser Met Gln Pro Gly Asp Tyr Lys Pro Pro Gly
210 215 220

Pro Pro Val Trp Ser Gly
225 230

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

<400> 29

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

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

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

35 40 45

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Glu Gln Phe Met Pro Ser Thr Val Glu Tyr Ser Gln Trp Tyr Val
180 185 190

Asn Cys Ala His Val Asn Ile Ile Gly Pro Gly Gly Gly Thr Pro Thr
195 200 205

Gly Phe Ala Arg Phe Pro Gly Thr Tyr Thr Val Asp Asp Pro Gly Ile
210 215 220

Lys Val Pro Leu Asn Gln Ile Val Asn Ser Gly Glu Leu Pro Gln Asp
225 230 235 240

Gln Leu Arg Leu Leu Glu Tyr Lys Pro Pro Gly Pro Ala Leu Trp Thr
245 250 255

Gly

<210> 30
<211> 251
<212> PRT
<213> Thermoascus crustaceus

<400> 30

Met Ala Phe Ser Gln Ile Met Ala Ile Thr Gly Val Phe Leu Ala Ser
1 5 10 15

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

Gly Lys Ser Tyr Gly Gly Tyr Ile Val Asn Gln Tyr Pro Tyr Met Ser
35 40 45

Asp Pro Pro Glu Val Val Gly Trp Ser Thr Thr Ala Thr Asp Leu Gly
50 55 60

Phe Val Asp Gly Thr Gly Tyr Gln Gly Pro Asp Ile Ile Cys His Arg
65 70 75 80

Gly Ala Lys Pro Ala Ala Leu Thr Ala Gln Val Ala Ala Gly Gly Thr
85 90 95

Val Lys Leu Glu Trp Thr Pro Trp Pro Asp Ser His His Gly Pro Val
100 105 110

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

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

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

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

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

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

Gly Ser Gly Asn Pro Pro Ala Gly Ala Leu Gly Thr Ala Leu Tyr Lys
210 215 220

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

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

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

<400> 31

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

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

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

Pro Pro Glu Leu Ile Ala Trp Ser Thr Lys Ala Thr Asp Leu Gly Phe
50 55 60

Val Asp Gly Ser Gly Tyr Thr Ser Pro Asp Ile Ile Cys His Lys Gly
65 70 75 80

Ala Glu Pro Gly Ala Gln Ser Ala Lys Val Ala Ala Gly Gly Thr Val
85 90 95

Glu Leu Gln Trp Thr Ala Trp Pro Glu Ser His Lys Gly Pro Val Ile
100 105 110

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

Ala Leu Lys Phe Phe Lys Ile Asp Glu Ser Gly Leu Ile Asp Gly Asn
130 135 140

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

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

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

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

Glu Asn Pro Ala Gly Thr Leu Gly Thr Ala Leu Tyr Thr Asp Thr Asp
210 215 220

Pro Gly Leu Leu Val Asn Ile Tyr Gln Gly Leu Ser Asn Tyr Ser Ile
225 230 235 240

Pro Gly Pro Ala Leu Tyr Ser Gly Asn Ser Asp Asn Ala Gly Ser Leu
245 250 255

Asn Pro Thr Thr Thr Pro Ser Ile Gln Asn Ala Ala Ala Ala Pro Ser
260 265 270

Thr Ser Thr Ala Ser Val Val Thr Asp Ser Ser Ser Ala Thr Gln Thr
275 280 285

Ala Ser Val Ala Ala Thr Thr Pro Ala Ser Thr Ser Ala Val Thr Ala
290 295 300

Ser Pro Ala Pro Asp Thr Gly Ser Asp Val Thr Lys Tyr Leu Asp Ser
305 310 315 320

Met Ser Ser Asp Glu Val Leu Thr Leu Val Arg Gly Thr Leu Ser Trp
325 330 335

Leu Val Ser Asn Lys Lys His Ala Arg Asp Leu Ser His
340 345

<210> 32
<211> 436
<212> PRT

<213> Thermoascus crustaceus

<400> 32

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

Leu Leu Gly Thr Ala His Ala His Thr Leu Met Thr Thr Met Phe Val
20 25 30

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

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

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

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

Pro Asn Ser Ser Pro Leu Asp Pro Ser His Lys Gly Pro Ala Ala Val
100 105 110

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

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

Lys Trp Gly Thr Thr Lys Met Ile Glu Asn Asn Gly His Ile Ser Val
145 150 155 160

Lys Val Pro Asp Asp Ile Glu Gly Gly Tyr Tyr Leu Ala Arg Thr Glu
165 170 175

Leu Leu Ala Leu His Ser Ala Asp Gln Gly Asp Pro Gln Phe Tyr Val
180 185 190

Gly Cys Ala Gln Leu Phe Ile Asp Ser Asp Gly Thr Ala Lys Pro Pro
195 200 205

Thr Val Ser Ile Gly Glu Gly Thr Tyr Asp Leu Ser Met Pro Ala Met

210 215 220

Thr Tyr Asn Ile Trp Glu Thr Pro Leu Ala Leu Pro Tyr Pro Met Tyr
225 230 235 240

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

Thr Ser Ser Ser Ala Val Pro Thr Ala Thr Glu Ser Ser Phe Val Glu
260 265 270

Glu Arg Ala Asn Pro Val Thr Ala Asn Ser Val Tyr Ser Ala Arg Gly
275 280 285

Lys Phe Lys Thr Trp Ile Asp Lys Leu Ser Trp Arg Gly Lys Val Arg
290 295 300

Glu Asn Val Arg Gln Ala Ala Gly Arg Arg Ser Thr Leu Val Gln Thr
305 310 315 320

Val Gly Leu Lys Pro Lys Gly Cys Ile Phe Val Asn Gly Asn Trp Cys
325 330 335

Gly Phe Glu Val Pro Asp Tyr Asn Asp Ala Glu Ser Cys Trp Ala Ala
340 345 350

Ser Asp Asn Cys Trp Lys Gln Ser Asp Ala Cys Trp Asn Lys Thr Gln
355 360 365

Pro Thr Gly Tyr Asn Asn Cys Gln Ile Trp Gln Asp Lys Lys Cys Lys
370 375 380

Val Ile Gln Asp Ser Cys Ser Gly Pro Asn Pro His Gly Pro Pro Asn
385 390 395 400

Lys Gly Lys Asp Leu Thr Pro Glu Trp Pro Pro Leu Lys Gly Ser Met
405 410 415

Asp Thr Phe Ser Lys Arg Thr Ile Gly Tyr Arg Asp Trp Ile Val Arg
420 425 430

Arg Arg Gly Ala
435

REIVINDICACIONES

1. Proceso de deshidratación de una vinaza entera que comprende
(a) conversión de un material que contiene almidón en dextrinas con una alfa-amilasa;
(b) sacarificación de las dextrinas utilizando una fuente de enzima generadora de carbohidratos para formar un azúcar;
(c) fermentación del azúcar en un medio de fermentación a un producto de fermentación que utiliza un organismo fermentador, donde el medio de fermentación comprende una hemicelulasa(s), una endoglucanasa(s), y un polipéptido(s) GH61;
(d) destilación del producto de fermentación para formar la vinaza entera; y
(e) separación de la vinaza entera en la vinaza fina y el sedimento húmedo; donde se transfiere más fase líquida a la vinaza fina.

2. Proceso según la reivindicación 1, donde la hemicelulasa(s) es seleccionada del grupo consistente en acetilxilano esterasa, arabinofuranosidasa, feruloil esterasa, glucuronidasa, xilanasa, y xilosidasa.

3. Proceso según la reivindicación 2, donde la hemicelulasa(s) es una xilanasa.

4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el medio de fermentación comprende además una celobiohidrolasa(s).

5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el medio de fermentación comprende además una beta-glucosidasa(s).

6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el medio de fermentación comprende además una proteasa(s).

7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el medio de fermentación comprende además una beta-glucanasa(s).

8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el medio de fermentación comprende además una esterasa(s) de ácido ferúlico.