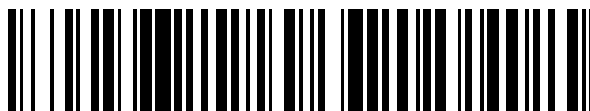


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 652**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06	(2006.01)	C12N 9/52	(2006.01)
C12P 7/08	(2006.01)		
C12N 9/28	(2006.01)		
C12N 9/58	(2006.01)		
C12P 19/14	(2006.01)		
C13K 1/06	(2006.01)		
C12N 9/26	(2006.01)		
C12N 9/44	(2006.01)		
C12N 9/62	(2006.01)		
C12P 7/14	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.11.2013 PCT/US2013/071982**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14085439**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.11.2013 E 13857906 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2925872**

54 Título: **Procesos para la creación de productos de fermentación**

30 Prioridad:

30.11.2012 US 201261731806 P

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

23.03.2020

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshoejvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 749 652 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procesos para la creación de productos de fermentación

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a procesos para crear productos de fermentación a partir de un material que contiene almidón.

10 REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS

[0002] Esta patente contiene un listado de secuencias.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15

[0003] La creación de productos de fermentación, como el etanol, a partir de un material que contiene almidón es bien conocida en la técnica. Industrialmente, hoy se utilizan dos tipos diferentes de procesos. El proceso más comúnmente utilizado, a menudo denominado "proceso convencional", incluye la licuefacción de almidón gelatinizado a alta temperatura utilizando típicamente una alfa-amilasa bacteriana, seguida de una sacarificación y fermentación simultáneas en presencia de una glucoamilasa y un organismo de fermentación. Otro proceso bien conocido, a menudo denominado proceso de "hidrólisis de almidón crudo" (proceso RSH), incluye sacarificación y fermentación simultáneas de almidón granular por debajo de la temperatura de gelatinización inicial, típicamente en presencia de al menos una glucoamilasa.

20

25

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

30

[0005] WO 2006/086792 se refiere a procesos para crear un producto de fermentación a partir de un material que contiene almidón, que comprenden licuar dicho material que contiene almidón con una alfa-amilasa, tratarlo con una proteasa, sacarificarlo en presencia de una enzima generadora de fuentes de carbohidratos y fermentarlo en presencia de un organismo fermentador.

35

[0006] Por lo tanto, todavía existe el deseo y la necesidad de proporcionar procesos para crear productos de fermentación, como el etanol, a partir de un material que contiene almidón que puede proporcionar un mayor rendimiento del producto de fermentación u otras ventajas, en comparación con un proceso convencional.

40 RESUMEN DE LA INVENCION

40

[0007] La presente invención se refiere a procesos de creación de productos de fermentación, tales como etanol, a partir de material que contiene almidón usando un organismo de fermentación.

45

[0008] En el primer aspecto, la invención se refiere a procesos para crear productos de fermentación, tales como etanol, a partir de un material que contiene almidón que comprenden las etapas de:

i) licuefacción del material que contiene almidón a una temperatura superior a la temperatura de gelatinización inicial usando:

50

- una alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* que tiene una doble delección de las posiciones I181 + G182 o R179 + G180 usando la SEC ID N.º: 1 para la numeración; y
- una proteasa que tiene un valor de termoestabilidad de más del 50 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C y además tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N.º: 13 o tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con ella; y

55

- opcionalmente una enzima generadora de fuentes de carbohidratos;

ii) sacarificación usando una enzima generadora de fuentes de carbohidratos;

iii) fermentación utilizando un organismo de fermentación;

60

en donde una composición celulolítica derivada de *Trichoderma reesei* está presente o se añade durante la fermentación o la sacarificación y fermentación simultáneas.

[0009] En una realización preferida, la licuefacción se lleva a cabo a una temperatura entre 70-100 °C, por ejemplo, entre 75-95 °C, por ejemplo, entre 75-90 °C, preferiblemente entre 80-90 °C, por ejemplo, 82-88 °C, por ejemplo, alrededor de 85 °C.

65

[0010] En una realización, el pH durante la licuefacción es de 4,5-5,0, por ejemplo, de 4,5-4,8. En otra realización, la licuefacción se lleva a cabo a un pH por encima de 5,0-6,5, por ejemplo, por encima de 5,0-6,0, por ejemplo, por encima de 5,0-5,5, por ejemplo, entre 5,2-6,2, por ejemplo, alrededor de 5,2, por ejemplo, alrededor de 5,4, por ejemplo, alrededor de 5,6, por ejemplo, alrededor de 5,8.

• A continuación se dan ejemplos de variantes de alfa-amilasa termoestables de *Bacillus stearothermophilus*. Los ejemplos preferidos incluyen alfa-amilasas seleccionadas del grupo de las variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*:

- I181* + G182* + N193F + E129V + K177L + R179E;
- I181* + G182* + N193F + V59A + Q89R + E129V + K177L + R179E + H208Y + K220P + N224L + Q254S;
- I181* + G182* + N193F + V59A + Q89R + E129V + K177L + R179E + Q254S + M284V;
- I181* + G182* + N193F + V59A + E129V + K177L + R179E + Q254S + M284V; y
- I181* + G182* + N193F + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S.

[0011] Una pululanasa puede estar presente durante la licuefacción. La pululanasa puede ser una pululanasa de la familia GH57, por ejemplo, una pululanasa que incluye un dominio X47 tal como se describe en WO 2011/087836. Se dan más ejemplos en la sección "Pululanasa presente y/o añadida durante la licuefacción" a continuación.

[0012] Se pueden encontrar ejemplos de proteasas termoestables usadas en un proceso de la invención en la sección "Proteasa presente y/o añadida durante la licuefacción" a continuación. En una realización preferida, la proteasa termoestable es una proteasa derivada de una cepa de *Pyrococcus furiosus* que tiene las secuencias mostradas como SEC ID N.º: 13 en el presente documento, SEC ID N.º: 29 en el presente documento o se describe en la patente EE. UU. n.º 6.358.726-B1.

[0013] Se pueden encontrar ejemplos de enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos opcionales adecuadas, preferiblemente enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos termoestables, en particular una glucoamilasa termoestable, en la sección "Enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos presentes y/o añadidas durante la licuefacción" más adelante.

[0014] En una realización, la enzima generadora de fuentes de carbohidrato, en particular una glucoamilasa, es una glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*, o una variante de la misma.

[0015] Otras actividades enzimáticas también pueden estar presentes.

Definiciones

Enzimas:

[0016] Composición celulolítica, enzimas celulolíticas o celulosa se refieren a un preparado que comprende una o más (por ejemplo, varias) enzimas que hidrolizan un material celulósico. Dichas enzimas incluyen endoglucanasa(s), celobiohidrolasa(s), beta-glucosidasa(s) o combinaciones de las mismas. Los dos enfoques básicos para medir la actividad celulolítica incluyen: (1) medir la actividad celulolítica total y (2) medir las actividades celulolíticas individuales (endoglucanasas, celobiohidrolasas y beta-glucosidasas) tal como se ha revisado en Zhang et al., Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies, 2006, Biotechnology Advances 24: 452-481. La actividad celulolítica total generalmente se mide usando sustratos insolubles, incluyendo papel de filtro Whatman n.º 1, celulosa microcristalina, celulosa bacteriana, celulosa de algas, algodón, lignocelulosa pretratada, etc. El ensayo de actividad celulolítica total más común es el ensayo de papel de filtro usando papel de filtro Whatman n.º 1 como sustrato. El ensayo fue establecido por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) (Ghose, 1987, Measurement of cellulase activities, Pure Appl. Chem 59: 257-68).

[0017] La actividad de la enzima celulolítica se determina midiendo el aumento de la hidrólisis de un material celulósico por parte de la(s) enzima(s) celulolítica(s) en las siguientes condiciones: 1-50 mg de proteína enzimática celulolítica/g de celulosa en rastrojos de maíz pretratados ("PCS") (u otra material celulósico pretratado) 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. Las condiciones típicas son reacciones de 1 ml, PCS lavadas o sin lavar, sólidos insolubles al 5 %, acetato de sodio 50 mM, pH 5, MnSO₄ 1 mM, 50 °C, 55 °C o 60 °C, 72 horas, análisis de azúcar mediante columna AMINEX® HPX-87H (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU.).

[0018] Glucosidasa familia 61: El término "glucosidasa familia 61" o "familia GH61" o "GH61" se refiere a un polipéptido que está en la familia 61 de glucosidasa según Henrissat B., 1991, A classification of glycosylhydrolases based on amino-acid sequence similarities, Biochem. J. 280: 309-316y Henrissat B. y Bairoch

A., 1996, Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases, *Biochem. J.* 316: 695-696. Las enzimas de esta familia se clasificaron originalmente como una familia de glucosidasas basándose en la medición de una actividad muy débil de endo-1,4-beta-D-glucanasa en un miembro de la familia. La estructura y el modo de acción de estas enzimas no son canónicos y no pueden considerarse como glucosidasas auténticas. Sin embargo, se mantienen en la clasificación CAZy sobre la base de su capacidad para mejorar la descomposición de la lignocelulosa cuando se usan junto con una celulasa o una mezcla de celulasas.

[0019] Polipéptido con actividad potenciadora celulolítica: El término "polipéptido con actividad potenciadora celulolítica" se refiere a un polipéptido GH61 que cataliza la mejora de la hidrólisis de un material celulósico mediante enzimas que tienen actividad celulolítica. Para los fines de la presente invención, la actividad de mejora celulolítica se determina midiendo el aumento de azúcares reductores o el aumento del total de celobiosa y glucosa de la hidrólisis de un material celulósico mediante enzimas celulolíticas en las siguientes condiciones: 1-50 mg de proteína total/g de celulosa en PCS, donde la proteína total está compuesta por un 50-99,5 % p/p de proteína enzimática celulolítica y un 0,5-50 % p/p de proteína de un polipéptido GH61 con actividad potenciadora celulolítica durante 1-7 días a una temperatura adecuada, *p. ej.*, 50 °C, 55 °C, o 60 °C, y pH, *p. ej.*, 5,0 o 5,5, en comparación con una hidrólisis de control con igual carga de proteína total sin actividad potenciadora celulolítica (1-50 mg de proteína celulolítica/g de celulosa en PCS). En un aspecto, una mezcla de CELLUCLAST® 1,5 l (Novozymes A/S, Bagsværd, Dinamarca) en presencia de un 2-3 % del peso total proteico de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (producida de manera recombinante en *Aspergillus oryzae* de acuerdo con WO 02/095014) o un 2-3 % del peso total proteico de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (producida de manera recombinante en *Aspergillus oryzae* tal como se describe en WO 2002/095014) de la carga de proteína de celulasa se utiliza como fuente de la actividad celulolítica.

[0020] El polipéptido GH61 que tiene actividad potenciadora celulolítica mejora la hidrólisis de un material celulósico catalizado mediante enzimas que tienen actividad celulolítica reduciendo la cantidad de enzima celulolítica requerida para alcanzar el mismo grado de hidrólisis preferiblemente al menos 1,01 veces, por ejemplo, al menos 1,05 veces, al menos 1,10 veces, al menos 1,25 veces, al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces, o al menos 20 veces.

[0021] Beta-glucosidasa: El término "beta-glucosidasa" se refiere a una beta-D-glucósido glucohidrolasa (E.C. 3.2.1.21) que cataliza la hidrólisis de los residuos terminales no reductores de beta-D-glucosa con la liberación de beta-D-glucosa.

[0022] Para los fines de la presente invención, la actividad de beta-glucosidasa se determina usando *p*-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido como sustrato de acuerdo con el procedimiento de 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 se define como 1,0 μmol de anión *p*-nitrofenolato producido por minuto a 25 °C, pH 4,8 a partir de *p*-nitrofenil-beta-D-glucopiranosido 1 mM como sustrato en citrato de sodio 50 mM que contiene TWEEN® 20 (monolaurato de polioxietilensorbitano) al 0,01 %.

[0023] Celobiohidrolasa: El término "celobiohidrolasa" se refiere a una 1,4-beta-D-glucano celobiohidrolasa (EC 3.2.1.91) que cataliza la hidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en celulosa, celooligosacáridos o cualquier polímero beta-1,4 enlazado que contenga glucosa, liberando celobiosa de los extremos reductores o no reductores 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).

[0024] La actividad de la celobiohidrolasa se determina de acuerdo con 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 y Claeysens, 1985, *FEBS Letters*, 187: 283-288; y Tomme et al., 1988, *Eur. J. Biochem.* 170: 575-581. En la presente invención, el método de Tomme et al. se puede utilizar para determinar la actividad de la celobiohidrolasa.

[0025] Endoglucanasa: El término "endoglucanasa" se refiere a una endo-1,4-(1,3;1,4)-beta-D-glucano 4-glucanohidrolasa (EC 3.2.1.4) que cataliza la endohidrólisis de los enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en celulosa, derivados de celulosa (como carboximetilcelulosa e hidroxietilcelulosa), liquenina, enlaces beta-1,4 en beta-1,3 glucanos mixtos como beta-D-glucanos o xiloglucanos de cereales, y otros materiales vegetales que contienen componentes celulósicos.

[0026] La actividad de endoglucanasa se puede determinar midiendo la reducción en la viscosidad del sustrato o el aumento en los extremos reductores determinados mediante un ensayo de azúcares reductores (Zhang et al., 2006, *Biotechnology Advances* 24: 452-481) Para los fines de la presente invención, la actividad de endoglucanasa se determina usando carboximetilcelulosa (CMC) como sustrato de acuerdo con el procedimiento de Ghose, 1987, *Pure and Appl. Chem* 59: 257-268, a pH 5, 40 °C.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0027] La presente invención se refiere a procesos de creación de productos de fermentación, tales como etanol, a partir de material que contiene almidón usando un organismo de fermentación.

[0028] En el primer aspecto, la invención se refiere a procesos para crear productos de fermentación, preferiblemente etanol, a partir de un material que contiene almidón que comprenden las etapas de:

i) licuefacción del material que contiene almidón a una temperatura superior a la temperatura de gelatinización inicial usando:

- una alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* que tiene una doble delección de las posiciones I181 + G182 o R179 + G180 usando la SEC ID N.º: 1 para la numeración; y
- una proteasa que tiene un valor de termoestabilidad de más del 50 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C y además tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N.º: 13 o tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con ella; y
- opcionalmente una enzima generadora de fuentes de carbohidratos;

ii) sacarificación usando una enzima generadora de fuentes de carbohidratos;

iii) fermentación utilizando un organismo de fermentación;

en donde una composición celulolítica derivada de *Trichoderma reesei* está presente o se añade durante la fermentación o la sacarificación y fermentación simultáneas.

[0029] Los pasos ii) y iii) se llevan a cabo de forma secuencial o simultánea. En una realización preferida, los pasos ii) y iii) se llevan a cabo simultáneamente. La alfa-amilasa y la proteasa termoestable, la enzima generadora de fuentes de carbohidratos opcional, preferiblemente glucoamilasa, y/u opcionalmente una pululanasa, se pueden agregar antes y/o durante la etapa de licuefacción i). Se pueden encontrar ejemplos de alfa-amilasas en la sección "Alfa-amilasa presente y/o añadida durante la licuefacción" más adelante. Se pueden encontrar ejemplos de proteasas termoestables en la sección "Proteasa presente y/o añadida durante la licuefacción" más adelante. Se pueden encontrar ejemplos de enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos opcionales adecuadas, preferiblemente enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos termoestables, en particular una glucoamilasa termoestable, en la sección "Enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos presentes y/o añadidas durante la licuefacción" más adelante. Se puede encontrar una pululanasa opcional adecuada en la sección "Pululanasa presente y/o añadida durante la licuefacción" más adelante.

[0030] El pH durante la licuefacción puede estar entre 4-7. En una realización, el pH durante la licuefacción es de 4,5-5,0, por ejemplo, de 4,5-4,8. En otra realización, la licuefacción se lleva a cabo a un pH por encima de 5,0-6,5, por ejemplo, por encima de 5,0-6,0, por ejemplo, por encima de 5,0-5,5, por ejemplo, entre 5,2-6,2, por ejemplo, alrededor de 5,2, por ejemplo, alrededor de 5,4, por ejemplo, alrededor de 5,6, por ejemplo, alrededor de 5,8.

[0031] Según la invención, la temperatura está por encima de la temperatura de gelatinización inicial. El término "temperatura de gelatinización inicial" se refiere a la temperatura más baja a la que comienza la solubilización del almidón, típicamente por calentamiento. La temperatura puede variar para diferentes almidones.

[0032] En una realización, la temperatura durante la etapa de licuefacción i) está en el intervalo de 70-100 °C, por ejemplo, entre 75-95 °C, por ejemplo, entre 75-90 °C, preferiblemente entre 80-90 °C, por ejemplo, entre 82-88 °C, por ejemplo, alrededor de 85 °C.

[0033] En una realización, el proceso de la invención comprende además, antes del paso i), los pasos de:

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

[0034] El material de partida que contiene almidón, por ejemplo, los granos enteros, puede reducirse en tamaño de partícula, por ejemplo, mediante molienda, para abrir la estructura, aumentar el área de superficie y permitir un procesamiento adicional. En general, hay dos tipos de procesos: molienda en húmedo y en seco. En la molienda en seco se muelen y utilizan granos enteros. La molienda húmeda proporciona una buena separación de germen y harina (gránulos de almidón y proteínas). La molienda húmeda a menudo se aplica en lugares donde se usa el hidrolizado de almidón en la producción de, por ejemplo, jarabes. Tanto la molienda en seco como en húmedo son bien conocidas en la técnica del procesamiento de almidón. De acuerdo con la presente invención, se prefiere la molienda en seco. En una realización, el tamaño de partícula se reduce hasta un valor entre 0,05 y 3,0 mm, preferiblemente 0,1-0,5 mm, o de modo que al menos el 30 %, preferiblemente al menos el 50 %, más preferiblemente al menos el 70 %, incluso más preferiblemente al menos el 90 % del material que

contiene almidón pase a través de un tamiz con una malla de 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente una malla de 0,1-0,5 mm. En otra realización, al menos el 50 %, preferiblemente al menos el 70 %, más preferiblemente al menos el 80 %, especialmente al menos el 90 % del material que contiene almidón pasa a través de un tamiz con malla 6.

5 [0035] La suspensión acuosa puede contener un 10-55 % p/p de sólidos secos (DS), preferiblemente un 25-45 % p/p de sólidos secos (DS), más preferiblemente un 30-40 % p/p de sólidos secos (DS) de material que contiene almidón.

10 [0036] La suspensión se puede calentar por encima de la temperatura de gelatinización inicial, preferiblemente entre 80-90 °C, entre pH 4-7, preferiblemente entre 4,5-5,0 o 5,0 y 6,0, durante un tiempo de 30 minutos a 5 horas, por ejemplo, alrededor de 2 horas.

15 [0037] La alfa-amilasa y la proteasa termoestable, la enzima generadora de fuentes de carbohidratos opcional, en particular la glucoamilasa termoestable y/o la pululanasa opcional se pueden agregar inicialmente a la suspensión acuosa para iniciar la licuefacción (dilución). En una realización, solo una porción de las enzimas se agrega a la suspensión acuosa, mientras que el resto de las enzimas se agregan durante la etapa de licuefacción i).

20 [0038] La etapa de licuefacción i) se lleva a cabo según la invención durante 0,5-5 horas, por ejemplo, 1-3 horas, por ejemplo, típicamente alrededor de 2 horas.

25 [0039] En una realización, la suspensión acuosa puede ser cocinada a chorro para gelatinizar aún más la suspensión antes de ser sometida a licuefacción en la etapa i). La cocción a chorro se puede llevar a cabo a una temperatura entre 110-145 °C, preferiblemente 120-140 °C, por ejemplo, 125-135 °C, preferiblemente alrededor de 130 °C durante aproximadamente 1-15 minutos, preferiblemente durante aproximadamente 3- 10 minutos, especialmente alrededor de unos 5 minutos.

Sacarificación y fermentación

30 [0040] Pueden estar presentes y/o añadirse una o más enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos, en particular glucoamilasa, durante la etapa de sacarificación ii) y/o la etapa de fermentación iii). La enzima generadora de fuentes de carbohidratos puede ser preferiblemente una glucoamilasa, pero también puede ser una enzima seleccionada del grupo que consiste en: beta-amilasa, amilasa maltogénica y alfa-glucosidasa. La enzima generadora de fuentes de carbohidratos agregada durante la etapa de sacarificación ii) y/o la etapa de fermentación iii) es típicamente diferente de la enzima generadora de fuentes de carbohidratos opcional, en particular glucoamilasa termoestable, opcionalmente agregada durante la etapa de licuefacción i). En una realización preferida, las enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos, en particular glucoamilasa, se añaden junto con una alfa-amilasa fúngica.

35 40 Se pueden encontrar ejemplos de enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos, incluidas las glucoamilasas, en la sección "Enzima generadora de fuentes de carbohidratos presente y/o añadida durante la sacarificación y/o fermentación" más adelante.

45 [0041] Cuando se realiza la sacarificación y la fermentación secuenciales, la etapa de sacarificación ii) se puede llevar a cabo en condiciones bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la etapa de sacarificación ii) puede durar de aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas. En una realización, se realiza la presacarificación. La presacarificación se realiza típicamente durante 40-90 minutos a una temperatura entre 30-65 °C, típicamente a alrededor de 60 °C. En una realización, la presacarificación se lleva a cabo seguida de sacarificación durante la fermentación en el caso de sacarificación y fermentación simultáneas ("SSF"). La sacarificación se lleva a cabo típicamente a temperaturas de 20-75 °C, preferiblemente de 40-70 °C, típicamente alrededor de 60 °C, y a un pH entre 4 y 5, normalmente alrededor de pH 4,5.

55 [0042] La sacarificación y fermentación simultáneas ("SSF") se utilizan ampliamente en los procesos de creación de productos de fermentación a escala industrial, especialmente en los procesos de producción de etanol. Al hacer SSF, la etapa de sacarificación ii) y la etapa de fermentación iii) se llevan a cabo simultáneamente. No hay una etapa de retención para la sacarificación, lo que significa que un organismo fermentador, como la levadura, y la(s) enzima(s), se pueden agregar de manera conjunta. Sin embargo, también se contempla agregar el organismo fermentador y la(s) enzima(s) por separado. SSF se realiza según la invención típicamente a una temperatura de 25 °C a 40 °C, por ejemplo, de 28 °C a 35 °C, por ejemplo, de 30 °C a 34 °C, preferiblemente alrededor de aproximadamente 32 °C. En una realización, la fermentación dura de 6 a 120 horas, en particular 24 a 96 horas. En una realización, el pH está entre 3,5-5, en particular entre 3,8 y 4,3.

Medio de fermentación

65 [0043] "Medios de fermentación" o "medio de fermentación" se refieren al entorno en el que se lleva a cabo la fermentación. El medio de fermentación incluye el sustrato de fermentación, es decir, la fuente de carbohidratos que es metabolizada por el organismo fermentador. De acuerdo con la invención, el medio de fermentación

puede comprender nutrientes y estimuladores de crecimiento para los organismos de fermentación. Los estimuladores de nutrientes y crecimiento son ampliamente utilizados en la técnica de la fermentación e incluyen fuentes de nitrógeno, como el amoníaco; urea, vitaminas y minerales, o combinaciones de los mismos.

5 Organismos de fermentación

10 [0044] El término "organismo de fermentación" se refiere a cualquier organismo, incluidos organismos bacterianos y fúngicos, especialmente levadura, adecuado para su uso en un proceso de fermentación y capaz de crear el producto de fermentación deseado. Los organismos de fermentación especialmente adecuados son capaces de fermentar, es decir, convertir azúcares, como glucosa o maltosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado, por ejemplo, el etanol. Los ejemplos de organismos fermentadores incluyen organismos fúngicos, como la levadura. La levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces* spp., en particular, *Saccharomyces cerevisiae*.

15 [0045] Las concentraciones adecuadas del organismo de fermentación viable durante la fermentación, como en SSF, son bien conocidas en la técnica o pueden ser determinadas fácilmente por los expertos en la materia. En una realización, el organismo fermentador, tal como levadura fermentadora de etanol (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*) se agrega al medio de fermentación para que la cuenta del organismo de fermentación viable, p. ej., la levadura, por ml de medio de fermentación esté en el rango de 10^5 a 10^{12} , preferiblemente de 10^7 a 10^{10} , especialmente alrededor de 5×10^7 .

20 [0046] Los ejemplos de levadura comercialmente disponible incluyen, por ejemplo, levadura RED STAR™ y ETHANOL RED™ (disponible en Fermentis/Lesaffre, EE. UU.), FALI (disponible en levadura de Fleischmann, EE. UU.), Levadura fresca SUPERSTART y THERMOSACC™ (disponible en Ethanol Technology, WI) , EE. UU.), BIOFERM AFT y XR (disponible en NABC - North American Bioproducts Corporation, GA, EE. UU.), GERT STRAND (disponible en Gert Strand AB, Suecia) y FERMIOL (disponible en DSM Specialties).

Materiales que contienen almidón

30 [0047] De acuerdo con la presente invención se puede usar cualquier material adecuado que contenga almidón. El material de partida se selecciona generalmente basándose en producto de fermentación deseado. Los ejemplos de materiales que contienen almidón, adecuados para su uso en un proceso de la invención, incluyen granos enteros, maíz, trigo, cebada, centeno, mijo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, frijoles o batatas, o mezclas de los mismos o almidones derivados de ellos, o cereales. También se contemplan los tipos cerosos y no cerosos de maíz y cebada. En una realización preferida, el material que contiene almidón, usado para la producción de etanol según la invención, es maíz o trigo.

Productos de fermentación

40 [0048] El término "producto de fermentación" se refiere a un producto creado por un proceso que incluye una etapa de fermentación usando un organismo de fermentación. Los productos de fermentación contemplados según la invención incluyen alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, butanol; polioles tales como glicerol, sorbitol e inositol); ácidos orgánicos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido succínico, ácido glucónico); cetonas (por ejemplo, acetona); aminoácidos (por ejemplo, ácido glutámico); gases (p. ej., H_2 y CO_2); antibióticos (por ejemplo, penicilina y tetraciclina); enzimas vitaminas (p. ej., riboflavina, B_{12} , betacaroteno); y hormonas. En una realización preferida, el producto de fermentación es etanol, por ejemplo, etanol combustible; etanol potable, es decir, bebidas espirituosas neutras potables; o etanol industrial o productos utilizados en la industria del consumo de alcohol (por ejemplo, cerveza y vino), industria láctea (por ejemplo, productos lácteos fermentados), industria del cuero e industria del tabaco. Los tipos de cerveza preferidos comprenden ales, cerveza negra, porter, lager, amargas, licores de malta, happoushu, cerveza con alto contenido de alcohol, cerveza con bajo contenido de alcohol, cerveza con bajo contenido de calorías o cerveza light. Preferiblemente, los procesos de la invención se usan para producir un alcohol, p. ej., etanol. El producto de fermentación, como el etanol, obtenido de acuerdo con la invención, puede usarse como combustible, que típicamente se mezcla con gasolina. Sin embargo, en el caso del etanol, también puede usarse como etanol potable.

Recuperación

60 [0049] Después de la fermentación, o SSF, el producto de fermentación puede separarse del medio de fermentación. La suspensión se puede destilar para extraer el producto de fermentación deseado (por ejemplo, etanol). Alternativamente, el producto de fermentación deseado puede extraerse del medio de fermentación mediante técnicas de microfiltración o filtración por membrana. El producto de fermentación también puede recuperarse mediante separación u otro método bien conocido en la técnica.

65 Alfa-amilasa presente y/o añadida durante la licuefacción

[0050] Según la invención, una alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* que tiene una doble delección de las posiciones I181 + G182 o R179 + G180 usando la SEC ID N.º: 1 para la numeración está presente y/o se agrega durante la licuefacción junto con una proteasa termoestable tal como se define en la reivindicación 1, una enzima generadora de fuentes de carbohidratos opcional, en particular una glucoamilasa termoestable, y/o una pululanasa opcional.

[0051] Las preferidas son las alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus*, que tienen una doble delección correspondiente a una supresión de las posiciones 181 y 182 y además comprenden una sustitución N193F (también denominada I181* + G182* + N193F) en comparación con la secuencia de aminoácidos de la BSG alfa-amilasa de tipo salvaje establecida en la SEC ID N.º: 1 en el presente documento. La alfa-amilasa bacteriana utilizada en un proceso de la invención y definida en la reivindicación 1 también puede ser una variante S242 de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* de la SEC ID N.º: 1 en el presente documento.

[0052] En una realización, la variante es una variante S242A, E o Q, preferiblemente una variante S242Q, de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* definida en la reivindicación 1 (usando la SEC ID N.º: 1 en el presente documento para la numeración).

[0053] En una realización, la variante es una variante de posición E188, preferiblemente una variante E188P, de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* definida en la reivindicación 1 (usando la SEC ID N.º: 1 en el presente documento para la numeración).

[0054] En una realización, la alfa-amilasa bacteriana usada de acuerdo con el proceso de la invención puede ser una alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* truncada según se define en la reivindicación 1 con alrededor de 491 aminoácidos de longitud, por ejemplo, de 480 a 495 aminoácidos de longitud.

Alfa-amilasa termoestable

[0055] De acuerdo con la invención, la alfa-amilasa utilizada en un proceso de la invención puede ser una alfa-amilasa termoestable según se define en la reivindicación 1 que tiene un T $\frac{1}{2}$ (min) a pH 4,5, 85 °C, CaCl $_2$ 0,12 mM de al menos 10.

[0056] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T $\frac{1}{2}$ (min) a pH 4,5, 85 °C, CaCl $_2$ 0,12 mM, de al menos 15.

[0057] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T $\frac{1}{2}$ (min) a pH 4,5, 85 °C, CaCl $_2$ 0,12 mM, de al menos 20.

[0058] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T $\frac{1}{2}$ (min) a pH 4,5, 85 °C, CaCl $_2$ 0,12 mM, de al menos 25.

[0059] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T $\frac{1}{2}$ (min) a pH 4,5, 85 °C, CaCl $_2$ 0,12 mM, de al menos 30.

[0060] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T $\frac{1}{2}$ (min) a pH 4,5, 85 °C, CaCl $_2$ 0,12 mM, de al menos 40.

[0061] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T $\frac{1}{2}$ (min) a pH 4,5, 85 °C, CaCl $_2$ 0,12 mM, de al menos 50.

[0062] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T $\frac{1}{2}$ (min) a pH 4,5, 85 °C, CaCl $_2$ 0,12 mM, de al menos 60.

[0063] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T $\frac{1}{2}$ (min) a pH 4,5, 85 °C, CaCl $_2$ 0,12 mM, entre 10-70.

[0064] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T $\frac{1}{2}$ (min) a pH 4,5, 85 °C, CaCl $_2$ 0,12 mM, entre 15-70.

[0065] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T $\frac{1}{2}$ (min) a pH 4,5, 85 °C, CaCl $_2$ 0,12 mM, entre 20-70.

[0066] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T $\frac{1}{2}$ (min) a pH 4,5, 85 °C, CaCl $_2$ 0,12 mM, entre 25-70.

[0067] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T $\frac{1}{2}$ (min) a pH 4,5, 85 °C, CaCl $_2$ 0,12 mM, entre 30-70.

ES 2 749 652 T3

[0068] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T_{1/2} (min) a pH 4,5, 85 °C, CaCl₂ 0,12 mM, entre 40-70.

5 [0069] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T_{1/2} (min) a pH 4,5, 85 °C, CaCl₂ 0,12 mM, entre 50-70.

[0070] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T_{1/2} (min) a pH 4,5, 85 °C, CaCl₂ 0,12 mM, entre 60-70.

10 [0071] En una realización de la invención, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa bacteriana derivada de *Bacillus stearothermophilus* según se describe como SEC ID N.º: 1 en el presente documento con R179 y G180 eliminados o con I181 y G182 eliminados, con mutaciones en la siguiente lista de mutaciones.

15 [0072] En realizaciones preferidas, las alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus* tienen doble delección I181 + G182 y sustitución opcional N193F, además de mutaciones seleccionadas de la siguiente lista:

-V59A + Q89R + G112D + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S;
-V59A + Q89R + E129V + K177L + R179E + H208Y + K220P + N224L + Q254S;
-V59A + Q89R + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S + D269E + D281N;
-V59A + Q89R + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S + I270L;
-V59A + Q89R + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S + H274K;
-V59A + Q89R + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S + Y276F;
-V59A + E129V + R157Y + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S;
-V59A + E129V + K177L + R179E + H208Y + K220P + N224L + S242Q + Q254S;
-59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S;
-V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + H274K;
-V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + Y276F;
-V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + D281N;
-V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + M284T;
-V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + G416V;
-V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S;
-V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S + M284T;
-A91L + M96I + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S;
-E129V + K177L + R179E;
-E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S;
-E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + Y276F + L427M;
-E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + M284T;
-E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + N376* + I377*;
-E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S;
-E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S + M284T;
-E129V + K177L + R179E + S242Q;
-E129V + K177L + R179V + K220P + N224L + S242Q + Q254S;
-K220P + N224L + S242Q + Q254S;
-M284V;
-V59A + Q89R + E129V + K177L + R179E + Q254S + M284V.
-V59A + E129V + K177L + R179E + Q254S + M284V;

20 [0073] En una realización preferida, la alfa-amilasa se selecciona del grupo de variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*:

- I181* + G182* + N193F + E129V + K177L + R179E;
- I181* + G182* + N193F + V59A + Q89R + E129V + K177L + R179E + H208Y + K220P + N224L + Q254S;
- I181* + G182* + N193F + V59A + Q89R + E129V + K177L + R179E + Q254S + M284V;
- 25 • I181* + G182* + N193F + V59A + E129V + K177L + R179E + Q254S + M284V; y
- I181* + G182* + N193F + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S (usando la SEC ID N.º: 1 en el presente documento para la numeración).

30 [0074] Debe entenderse que cuando se hace referencia a la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* y variantes de las mismas se producen normalmente en forma truncada. En particular, el truncamiento puede ser de modo que la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada como SEC ID N.º: 1 en el presente documento, o variantes de la misma, se truncan en el terminal C y típicamente tengan alrededor de 491 aminoácidos de longitud, por ejemplo, 480-495 aminoácidos de longitud.

Proteasa presente y/o añadida durante la licuefacción

- 5 [0075] De acuerdo con la invención, la proteasa termoestable presente y/o añadida durante la licuefacción tiene un valor de termoestabilidad de más del 50 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C y además tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N.º: 13 o tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con ella. Dicha proteasa puede derivarse de una cepa de la bacteria *Pyrococcus*, por ejemplo, una cepa de *Pyrococcus furiosus* (pfu proteasa)
- 10 [0076] En una realización, la proteasa es una que se muestra como la SEC ID N.º: 1 en la patente EE. UU. n.º 6.358.726-B1 (Takara Shuzo Company), la SEC ID N.º: 13 en el presente documento o la SEQ ID NO: 29 en el presente documento.
- 15 [0077] La proteasa termoestable utilizada en un proceso de la invención tiene un valor de termoestabilidad de más del 50 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C y además tiene al menos un 80 % de identidad, por ejemplo, al menos un 85 %, por ejemplo, al menos un 90 %, por ejemplo, al menos un 95 %, por ejemplo, al menos un 96 %, por ejemplo, al menos un 97 %, por ejemplo, al menos un 98 %, por ejemplo, al menos un 99 % de identidad con la SEC ID N.º: 13 del presente documento. La proteasa de *Pyrococcus furiosus* se puede comprar en Takara Bio, Japón.
- 20 [0078] La proteasa de *Pyrococcus furiosus* es una proteasa termoestable según la invención. Se descubrió que el producto comercial proteasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu S) tenía una termoestabilidad del 110 % (80 °C/70 °C) y 103 % (90 °C/70 °C) a un pH 4,5 determinado tal como se describe en el ejemplo 2 de este documento.
- 25 [0079] En una realización, la proteasa tiene una termoestabilidad de más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, más del 90 %, más del 100 %, por ejemplo, más del 105 %, por ejemplo, más del 110 %, por ejemplo, más del 115 %, por ejemplo, más del 120 % determinada como actividad relativa a 80 °C/70 °C.
- 30 [0080] La determinación de la "actividad relativa" y la "actividad restante" se realiza como se describe en el ejemplo 2.

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

- 35 [0081] Según la invención, una enzima generadora de fuentes de carbohidratos, en particular una glucoamilasa, preferiblemente una glucoamilasa termoestable, puede estar presente y/o añadirse opcionalmente durante la licuefacción junto con la alfa-amilasa y la proteasa termoestable definidas en la reivindicación 1. Como se mencionó anteriormente, una pululanasa también puede estar presente y/o agregarse opcionalmente durante el paso de licuefacción i).
- 40 [0082] El término "enzima generadora de fuentes de carbohidratos" incluye cualquier enzima que genere azúcares fermentables. Una enzima generadora de fuentes de carbohidratos es capaz de producir un carbohidrato que puede ser utilizado como fuente de energía por el organismo u organismos de fermentación en cuestión, por ejemplo, cuando se usa en un proceso de la invención para producir un producto de fermentación, por ejemplo, etanol. Los carbohidratos generados pueden convertirse directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado, preferiblemente etanol. Según la invención, se puede usar una mezcla de enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos. Ejemplos específicos incluyen glucoamilasa (que son generadores de glucosa), beta-amilasa y amilasa maltogénica (que son generadores de maltosa).
- 45 [0083] En una realización preferida, la enzima generadora de fuentes de carbohidratos es termoestable. La enzima generadora de fuentes de carbohidratos, en particular la glucoamilasa termoestable, se puede agregar junto con o por separado de la alfa-amilasa y la proteasa termoestables.
- 50 [0084] En una realización, la enzima generadora de fuentes de carbohidratos, preferiblemente una glucoamilasa termoestable, tiene una estabilidad térmica de actividad relativa a 85 °C de al menos el 20 %, al menos el 30 %, preferiblemente de al menos el 35 % determinada como se describe en el ejemplo 4 (estabilidad térmica).
- 55 [0085] En una realización, la enzima generadora de fuentes de carbohidratos es una glucoamilasa que tiene un pH óptimo de actividad relativa a pH 5,0 de al menos el 90 %, preferiblemente de al menos el 95 %, preferiblemente de al menos el 97 %, por ejemplo, el 100 % determinado como se describe en el ejemplo 4 (pH óptimo).
- 60 [0086] En una realización, la enzima generadora de fuentes de carbohidratos es una glucoamilasa que tiene una estabilidad de pH a pH 5,0 de al menos el 80 %, de al menos el 85 %, de al menos el 90 % determinada como se describe en el ejemplo 4 (estabilidad de pH).
- 65

- 5 [0087] En una realización específica y preferida, la enzima generadora de fuentes de carbohidratos es una glucoamilasa termoestable, preferiblemente de origen fúngico, preferiblemente un hongo filamentoso, tal como de una cepa del género *Penicillium*, especialmente una cepa de *Penicillium oxalicum*, en particular la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* descrita como la SEC ID N.º: 2 en PCT/CN10/071753 publicada como WO 2011/127802 y mostrada en las SEC ID N.º: 9 o 14 en el presente documento.
- 10 [0088] En una realización, la glucoamilasa termoestable tiene al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, más preferiblemente al menos un 90 %, más preferiblemente al menos un 91 %, más preferiblemente al menos un 92 %, incluso más preferiblemente al menos un 93 %, lo más preferible al menos un 94 %, e incluso lo más preferible al menos un 95 %, tal como incluso al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 % de identidad con el polipéptido maduro que se muestra en la SEC ID N.º : 2 en WO 2011/127802 o las SEC ID N.º: 9 o 14 en el presente documento.
- 15 [0089] En una realización preferida, la enzima generadora de fuentes de carbohidratos es una variante de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* descrita como la SEC ID N.º: 2 en WO 2011/127802 y mostrada en las SEC ID N.º: 9 y 14 en el presente documento, que tiene una sustitución K79V (usando la secuencia madura mostrada en la SEC ID N.º: 14 para la numeración). La variante de glucoamilasa K79V ha reducido la sensibilidad a la degradación de la proteasa en relación con la progenitora como se describe en el documento solicitud EE. UU. n.º 61/531.189 o PCT/US12/053779.
- 20 [0090] En una realización, la enzima generadora de fuentes de carbohidratos, en particular la glucoamilasa termoestable, se deriva de *Penicillium oxalicum*.
- 25 [0091] En una realización, la glucoamilasa termoestable es una variante de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* descrita como la SEC ID N.º: 2 en WO 2011/127802 y mostrada en las SEC ID N.º: 9 y 14 en el presente documento. En una realización preferida, la glucoamilasa de *penicillium oxalicum* es la descrita como la SEC ID N.º: 2 en WO 2011/127802 y mostrada en las SEC ID N.º: 9 y 14 en el presente documento que tiene Val (V) en la posición 79 (usando SEC ID N.º: 14 para la numeración).
- 30 [0092] Las variantes de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* contempladas se describen en la solicitud PCT pendiente # PCT/EP12/070127.
- [0093] En una realización, estas variantes tienen una sensibilidad reducida a la degradación de la proteasa.
- 35 [0094] En una realización, estas variantes tienen termoestabilidad mejorada en comparación con la progenitora.
- 40 [0095] Más específicamente, en una realización, la glucoamilasa tiene una sustitución K79V (usando la SEC ID N.º: 14 para la numeración), correspondiente a la variante PE001, y además comprende al menos una de las siguientes sustituciones o combinaciones de sustituciones:
- 45 T65A; o
Q327F; o
E501V; o
Y504T; o
Y504*; o
- 50 T65A + Q327F; o
T65A + E501V; o
T65A + Y504T; o
T65A + Y504*; o
- 55 Q327F + E501V; o
Q327F + Y504T; o
Q327F + Y504*; o
E501V + Y504T; o
E501V + Y504*; o
- 60 T65A + Q327F + E501V; o
T65A + Q327F + Y504T; o
T65A + E501V + Y504T; o
Q327F + E501V + Y504T; o
T65A + Q327F + Y504*; o
- 65 T65A + E501V + Y504*; o
Q327F + E501V + Y504*; o
T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
T65A + Q327F + E501V + Y504*; o
E501V + Y504T; o
T65A + K161S; o
T65A + Q405T; o
T65A + Q327W; o

ES 2 749 652 T3

- T65A + Q327F; o
T65A + Q327Y; o
P11F + T65A + Q327F; o
5 R1K + D3W + K5Q + G7V + N8S + T10K + P11S + T65A + Q327F; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F; o
P11F + D26C + K33C + T65A + Q327F; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327W + E501V + Y504T; o
R1E + D3N + P4G + G6R + G7A + N8A + T10D + P11D + T65A + Q327F; o
10 P11F + T65A + Q327W; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P11F + T65A + Q327W + E501V + Y504T; o
T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
T65A + S105P + Q327W; o
15 T65A + S105P + Q327F; o
T65A + Q327W + S364P; o
T65A + Q327F + S364P; o
T65A + S103N + Q327F; o
P2N + P4S + P11F + K34Y + T65A + Q327F; o
20 P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + D445N + V447S; o
P2N + P4S + P11F + T65A + 1172V + Q327F; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + N502*; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + N502T + P563S + K571E; o
P2N + P4S + P11F + R31S + K33V + T65A + Q327F + N564D + K571S; o
25 P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + S377T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + V325T + Q327W; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + D445N + V447S + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + 1172V + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + S377T + E501V + Y504T; o
30 P2N + P4S + P11F + D26N + K34Y + T65A + Q327F; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + 1375A + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + K218A + K221D + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + S103N + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + T10D + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + F12Y + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
35 K5A + P11F + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + T10E + E18N + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + T10E + E18N + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + T568N; o
40 P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + K524T + G526A; o
P2N + P4S + P11F + K34Y + T65A + Q327F + D445N + V447S + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + R31S + K33V + T65A + Q327F + D445N + V447S + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + D26N + K34Y + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + F80* + Q327F + E501V + Y504T; o
45 P2N + P4S + P11F + T65A + K112S + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + T516P + K524T + G526A; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + E501V + N502T + Y504*; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + S103N + Q327F + E501V + Y504T; o
50 K5A + P11F + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + T516P + K524T + G526A; o
P2N + P4S + P11F + T65A + V79A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + V79G + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + V791 + Q327F + E501V + Y504T; o
55 P2N + P4S + P11F + T65A + V79L + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + V79S + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + L72V + Q327F + E501V + Y504T; o
S255N + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + E74N + V79K + Q327F + E501V + Y504T; o
60 P2N + P4S + P11F + T65A + G220N + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Y245N + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q253N + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + D279N + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + S359N + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + D370N + E501V + Y504T; o
65 P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + V460S + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + V460T + P468T + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + T463N + E501V + Y504T; o

P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + S465N + E501V + Y504T; o
 P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + T477N + E501V + Y504T.

5 [0096] En una realización preferida, la variante de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* tiene una sustitución K79V (usando la SEC ID N.º: 14 para la numeración), correspondiente a la variante PE001, y además comprende una de las siguientes mutaciones:

10 P11F + T65A + Q327F; o
 P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F; o
 P11F + D26C + K33C + T65A + Q327F; o
 P2N + P4S + P11F + T65A + Q327W + E501V + Y504T; o
 P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
 P11F + T65A + Q327W + E501V + Y504T.

15 [0097] La enzima generadora de fuentes de carbohidratos, en particular, se puede agregar en cantidades de 0,1 a 100 microgramos EP/g, por ejemplo, 0,5-50 microgramos EP/g, por ejemplo, 1-25 microgramos EP/g, por ejemplo, 2-12 microgramos EP/g DS.

20 Pululanasa presente y/o añadida durante la licuefacción

[0098] Opcionalmente, una pululanasa puede estar presente y/o añadirse durante la etapa de licuefacción i) junto con una alfa-amilasa y una proteasa termoestable, como se define en la reivindicación 1, y/o una enzima generadora de fuentes de carbohidratos. Tal como se ha mencionado anteriormente, una enzima generadora de fuentes de carbohidratos, preferiblemente una glucoamilasa termoestable, también puede estar presente y/o agregarse durante la etapa de licuefacción i).

[0099] La pululanasa puede estar presente y/o añadirse durante la etapa de licuefacción i) y/o la etapa de sacarificación ii) o la sacarificación y fermentación simultáneas.

30 [0100] Las pululanastas (E.C. 3.2.1.41, pululan 6-glucano-hidrolasa), son enzimas desramificantes caracterizadas por su capacidad de hidrolizar los enlaces alfa-1,6-glucosídicos en, por ejemplo, amilopectina y pululano.

[0101] Las pululanastas contempladas de acuerdo con la presente invención incluyen las pululanastas de *Bacillus amyloclaviformis* descritas en la patente EE. UU. n.º 4.560.651, la pululanasa descrita como la SEC ID N.º: 2 en WO 01/151620, el *Bacillus deramificans* descrito como la SEC ID N.º: 4 en WO 01/151620 (incorporado en el presente documento por referencia), y la pululanasa de *Bacillus acidopullulyticus* descrita como la SEC ID N.º: 6 en WO 01/151620 y también descrita en FEMS Mic. Let. (1994) 115, 97-106.

40 [0102] Las pululanastas adicionales contempladas según la presente invención incluyen las pululanastas de *Pyrococcus woesei*, específicamente de *Pyrococcus woesei* DSM n.º 3773 descritas en WO92/02614.

[0103] En una realización, la pululanasa es una pululanasa de la familia GH57. En una realización, la pululanasa incluye un dominio X47 tal como se describe en EE. UU. 61/289.040 publicado como WO 2011/087836. Más específicamente, la pululanasa puede derivarse de una cepa del género *Thermococcus*, incluyendo *Thermococcus litoralis* y *Thermococcus hydrothermalis*, por ejemplo, la pululanasa de *Thermococcus hydrothermalis* mostrada en la SEC ID N.º: 11 truncada en el sitio X4 justo después del dominio X47 (es decir, los aminoácidos 1-782 en las SEC ID N.º: 11 y 12 en el presente documento). La pululanasa también puede ser un híbrido de las pululanastas de *Thermococcus litoralis* y *Thermococcus hydrothermalis* o una enzima híbrida de *T. hydrothermalis/T. litoralis* con sitio de truncamiento X4 descrito en EE. UU. 61/289.040 publicado como WO 2011/087836 y descrito en la SEC ID N.º: 12 en el presente documento.

[0104] En otra realización, la pululanasa es tal que comprende un dominio X46 descrito en WO 2011/076123 (Novozymes)

55 [0105] La pululanasa puede agregarse según la invención en una cantidad eficaz que incluye la cantidad preferida de aproximadamente 0,0001-10 mg de proteína enzimática por gramo de DS, preferiblemente 0,0001-0,10 mg de proteína enzimática por gramo de DS, más preferiblemente 0,0001-0,010 mg de proteína enzimática por gramo de DS. La actividad de pululanasa se puede determinar como NPUN. Un ensayo para la determinación de NPUN se describe en la sección "Materiales y métodos" más adelante.

60 [0106] Los productos de pululanasa disponibles comercialmente adecuados incluyen PROMOZYME D, PROMOZYME™ D2 (Novozymes A/S, Dinamarca), OPTIMAX L-300 (DuPont-Genencor, EE. UU.) y AMANO 8 (Amano, Japón).

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

[0107] De acuerdo con la invención, una enzima generadora de fuentes de carbohidratos, preferiblemente una glucoamilasa, puede estar presente y/o añadirse durante la sacarificación y/o la fermentación.

- 5 [0108] En una realización preferida, la enzima generadora de fuentes de carbohidratos es una glucoamilasa, de origen fúngico, preferiblemente de una cepa de *Aspergillus*, preferiblemente *A. niger*, *A. awamori* o *A. oryzae*; o una cepa de *Trichoderma* preferiblemente *T. reesei*; o una cepa de *Talaromyces* preferiblemente *T. emersonii*,

Glucoamilasa

10

[0109] De acuerdo con la invención, la glucoamilasa presente y/o añadida durante la sacarificación y/o la fermentación puede derivarse de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, de un microorganismo o una planta. Las glucoamilasas preferidas son de origen fúngico o bacteriano, seleccionadas del grupo que consiste en glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular glucoamilasas de *Aspergillus niger* G1 o G2 (Boel et al. (1984), EMBO J. 3 (5), págs. 1097-1102), o sus variantes, como las descritas en WO 92/00381, WO 00/04136 y WO 01/04273 (de Novozymes, Dinamarca); la glucoamilasa de *A. awamori* descrita en WO 84/02921, la glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* (Agric. Biol. Chem. (1991), 55 (4), págs. 941-949), o variantes o fragmentos de las mismas. Otras variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* incluyen variantes con estabilidad térmica mejorada: G137A y G139A (Chen et al. (1996), Prot. Eng. 9, 499-505); D257E y D293E/Q (Chen et al. (1995), Prot. Eng. 8, 575-582); N182 (Chen et al. (1994), Biochem. J. 301, 275-281); enlaces disulfuro, A246C (Fierobe et al. (1996), Biochemistry, 35, 8698-8704; e introducción de residuos Pro en las posiciones A435 y S436 (Li et al. (1997), Protein Eng. 10, 1199-1204.

15

20

25

[0110] Otras glucoamilasas incluyen glucoamilasa de *Athelia rolfsii* (anteriormente designado *Corticium rolfsii*) (ver patente EE. UU. n.º 4.727.026 y (Nagasaka et al. (1998) Purification and properties of the raw-starch-degrading glucoamylases from *Corticium rolfsii*, Appl Microbiol Biotechnol 50: 323-330), glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular derivadas de *Talaromyces emersonii* (WO 99/28448), *Talaromyces leycettanus* (patente EE. UU. n.º Re. 32,153), *Talaromyces duponti*, *Talaromyces thermophilus* (patente EE. UU. n.º 4.587.215). En una realización preferida, la glucoamilasa usada durante la sacarificación y/o la fermentación es la glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* descrita en WO 99/28448.

30

[0111] Las glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. Thermoamylolyticum* (EP 135,138) y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831).

35

[0112] Las glucoamilasas fúngicas contempladas incluyen *Trametes cingulata*, *Pachykytospora papyracea* y *Leucopaxillus giganteus* todas descritas en WO 2006/069289; o *Peniophora rufomarginata* descrita en WO2007/124285; o una mezcla de las mismas. Además, la glucoamilasa híbrida se contempla de acuerdo con la invención. Los ejemplos incluyen las glucoamilasas híbridas descritas en WO 2005/045018. Los ejemplos específicos incluyen la glucoamilasa híbrida descrita en las tablas 1 y 4 del ejemplo 1.

40

[0113] En una realización, la glucoamilasa se deriva de una cepa del género *Pycnoporus*, en particular una cepa de *Pycnoporus* tal como se describe en WO 2011/066576 (SEC ID N.º 2, 4 o 6), por ejemplo, la SEC ID N.º: 28 en el presente documento, o de una cepa del género *Gloeophyllum*, por ejemplo, una cepa de *Gloeophyllum sepiarium* o *Gloeophyllum trabeum*, en particular una cepa de *Gloeophyllum* como la descrita en WO 2011/068803 (SEC ID N.º: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 16). En una realización preferida, la glucoamilasa es la SEC ID N.º: 2 en WO 2011/068803 o la SEC ID N.º: 26 en el presente documento. En una realización preferida, la glucoamilasa es la SEC ID N.º: 27 en el presente documento. En una realización, la glucoamilasa se deriva de una cepa del género *Nigrofores*, en particular una cepa de *Nigrofores sp.* descrita en WO 2012/064351 (SEC ID N.º: 2). También se contemplan las glucoamilasas que exhiben una alta identidad con cualquiera de las glucoamilasas mencionadas anteriormente, es decir, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o incluso un 100 % de identidad con cualquiera de las partes maduras de las secuencias enzimáticas mencionadas anteriormente, por ejemplo, con cualquiera de las SEC ID N.º: 26, 27, 28 o 29 en el presente documento, preferiblemente la SEC ID N.º: 26 en el presente documento.

50

55

[0114] Las glucoamilasas pueden añadirse en una realización a la sacarificación y/o fermentación en una cantidad de 0,0001-20 AGU/g de DS, preferiblemente 0,001-10 AGU/g de DS, especialmente entre 0,01-5 AGU/g de DS, por ejemplo, 0,1-2 AGU/g de DS.

60

[0115] En una realización, la glucoamilasa se agrega como una mezcla que comprende además una alfa-amilasa. En una realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa fúngica, especialmente una alfa-amilasa fúngica ácida. La alfa-amilasa es típicamente una actividad secundaria.

65

[0116] En una realización, la glucoamilasa es una mezcla que comprende la glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* descrita en WO 99/28448 como la SEC ID N.º: 7 y la glucoamilasa de *Trametes cingulata* descrita en WO 06/069289.

5 [0117] En una realización, la glucoamilasa es una mezcla que comprende la glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* descrita en WO 99/28448, la glucoamilasa de *Trametes cingulata* descrita en WO 06/69289 y la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con un enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y un SBD descrita como V039 en la tabla 5 en WO 2006/069290.

10 [0118] En una realización, la glucoamilasa es una mezcla que comprende la glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* descrita en WO 99/28448, la glucoamilasa de *Trametes cingulata* descrita en WO 06/69289 y la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con un enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y un SBD descrita como V039 en la tabla 5 en WO 2006/069290.

15 [0119] En una realización, la glucoamilasa es una mezcla que comprende la glucoamilasa de *Gloeophyllum sepiarium* mostrada como la SEC ID N.º: 2 en WO 2011/068803 y un *Rhizomucor pusillus* con un enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y un dominio de unión al almidón (SBD), descrito como la SEC ID N.º: 3 en WO 2013/006756 con las siguientes sustituciones: G128D + D143N.

20 [0120] En una realización, la alfa-amilasa puede derivarse de una cepa del género *Rhizomucor* preferiblemente una cepa *Rhizomucor pusillus*, como la que se muestra en SEC ID N.º: 3 en WO2013/006756 o el género *Meripilus*, preferiblemente una cepa de *Meripilus giganteus*.

[0121] En una realización preferida, la alfa-amilasa se deriva de un *Rhizomucor pusillus* con un enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y un dominio de unión a almidón (SBD), descrito como V039 en la tabla 5 en WO 2006/069290.

25 [0122] En una realización, la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* o la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con un enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y un dominio de unión al almidón (SBD) tiene al menos una de las siguientes sustituciones o combinaciones de sustituciones: D165M; Y141W; Y141R; K136F; K192R; P224A; P224R; S123H+Y141W; G20S +Y141W; A76G + Y141W; G128D + Y141W; G128D + D143N; P219C + Y141W; N142D + D143N; Y141W + K192R; Y141W + D143N; Y141W + N383R; Y141W + P219C + A265C; Y141W + N142D + D143N; Y141W + K192R V410A; G128D + Y141W + D143N; Y141W + D143N + P219C; Y141W + D143N + K192R; G128D + D143N + K192R; Y141W + D143N + K192R + P219C; G128D + Y141W + D143N + K192R; o G128D + Y141W + D143N + K192R + P219C (usando la SEC ID N.º: 3 en WO 2013/006756 para numeración). En una realización preferida, la mezcla de glucoamilasa comprende la glucoamilasa de *Gloeophyllum sepiarium* (por ejemplo, la SEC ID N.º: 2 in WO 2011/068803) y la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus*

30

35

40 [0123] En una realización preferida, la mezcla de glucoamilasa comprende la glucoamilasa de *Gloeophyllum sepiarium* mostrada como la SEC ID N.º: 2 en WO 2011/068803 y un *Rhizomucor pusillus* con un enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y un dominio de unión al almidón (SBD), descrito como la SEC ID N.º: 3 en WO 2013/006756 con las siguientes sustituciones: G128D + D143N

45 [0124] Las composiciones disponibles comercialmente que comprenden glucoamilasa incluyen AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER, SAN™ EXTRA L, SPIRIZYME™ PLUS, SPIRIZYME™ FUEL, SPIRIZYME™ B4U, SPIRIZYME™ ULTRA, SPIRIZYME™ EXCEL, SPIRIZYME ACHIEVE y AMG™ E (de Novozymes A/S); OPTIDEX™ 300, GC480, GC417 (de DuPont-Genencor); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME™ G900, G-ZYME™ y G990 ZR (de DuPont-Genencor).

Amilasa maltogénica

50 [0125] La enzima generadora de fuentes de carbohidratos presente y/o añadida durante la sacarificación y/o la fermentación también puede ser una alfa-amilasa maltogénica. Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucano 1,4-alfa-maltohidrolasa, E.C. 3.2.1.133) es capaz de hidrolizar amilosa y amilopectina para maltosa en la configuración alfa. Una amilasa maltogénica de la cepa NCIB 11837 de *Bacillus stearothermophilus* está disponible comercialmente en Novozymes A/S. Las alfa-amilasas maltogénicas se describen en las patentes EE. UU. n.º 4.598.048, 4.604.355 y 6.162.628. La amilasa maltogénica puede añadirse en una realización preferida en una cantidad de 0,05-5 mg de proteína total/g de DS o 0,05-5 MANU/g de DS.

55

Composición celulolítica presente y/o añadida durante la sacarificación y/o la fermentación

60 [0126] Según la invención, una composición celulolítica derivada de *Trichoderma reesei* está presente durante la fermentación o la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF).

[0127] La composición celulolítica puede comprender una beta-glucosidasa, una celobiohidrolasa y una endoglucanasa.

[0128] Se pueden encontrar ejemplos de composición celulolítica adecuada en WO 2008/151079 y la solicitud de patente pendiente PCT/US12/052163 publicada como WO 2013/028928.

5 [0129] En una realización, la composición celulolítica derivada de *Trichoderma reesei* comprende una beta-glucosidasa, preferiblemente una derivada de una cepa del género *Aspergillus*, como *Aspergillus oryzae*, por ejemplo, la descrita en WO 2002/095014 o la proteína de fusión que tiene actividad beta-glucosidasa descrita en WO 2008/057637, o *Aspergillus fumigatus*, como la descrita en WO 2005/047499 o en la SEC ID N.º: 22 en el presente documento o una variante de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* descrita en WO
10 2012/044915 (Novozymes), por ejemplo, una con las siguientes sustituciones F100D, S283G, N456E, F512Y; o una cepa del género *Penicillium*, por ejemplo, una cepa de *Penicillium brasilianum* descrita en WO 2007/019442 o una cepa del género *Trichoderma*, por ejemplo, una cepa de *Trichoderma reesei*.

15 [0130] En una realización, la composición celulolítica derivada de *Trichoderma reesei* comprende un polipéptido GH61 que tiene actividad potenciadora celulolítica como, por ejemplo, una derivada del género *Thermoascus*, por ejemplo, una cepa de *Thermoascus aurantiacus*, como la descrita en WO 2005/074656 como SEC ID N.º: 2; o una derivada del género *Thielavia*, por ejemplo, una cepa de *Thielavia terrestris*, como la descrita en WO 2005/074647 como SEC ID N.º: 7 y SEC ID N.º: 8; o uno derivado de una cepa de *Aspergillus*, por ejemplo, una cepa de *Aspergillus fumigatus*, como la descrita en WO 2010/138754 como SEC ID N.º: 1 y SEC ID N.º: 2; o una
20 derivada de una cepa de *Penicillium*, por ejemplo, una cepa de *Penicillium emersonii*, como la descrita en WO 2011/041397 o en la SEC ID N.º: 23 en el presente documento.

25 [0131] En una realización, la composición celulolítica derivada de *Trichoderma reesei* comprende una celobiohidrolasa I (CBH I), como, por ejemplo, una derivada de una cepa del género *Aspergillus*, por ejemplo, una cepa de *Aspergillus fumigatus*, tal como la Cel7a CBHI descrita en la SEC ID N.º: 2 en WO 2011/057140 o la SEC ID N.º: 24 en el presente documento, o una cepa del género *Trichoderma*, por ejemplo, una cepa de *Trichoderma reesei*.

30 [0132] En una realización, la composición celulolítica derivada de *Trichoderma reesei* comprende una celobiohidrolasa II (CBH II), tal como una derivada de una cepa del género *Aspergillus*, por ejemplo, una cepa de *Aspergillus fumigatus* o la SEC ID N.º: 25 en el presente documento; o una cepa del género *Trichoderma*, por ejemplo, *Trichoderma reesei* o una cepa del género *Thielavia*, por ejemplo, una cepa de *Thielavia terrestris*, como la celobiohidrolasa II CEL6A de *Thielavia terrestris*.

35 [0133] En una realización, la composición celulolítica derivada de *Trichoderma reesei* comprende un polipéptido GH61 que tiene actividad potenciadora celulolítica y una beta-glucosidasa.

40 [0134] En una realización, la composición celulolítica derivada de *Trichoderma reesei* comprende un polipéptido GH61 que tiene actividad potenciadora celulolítica, una beta-glucosidasa y una CBH I.

[0135] En una realización, la composición celulolítica derivada de *Trichoderma reesei* comprende un polipéptido GH61 que tiene actividad potenciadora celulolítica, una beta-glucosidasa, una CBH I y una CBH II.

45 [0136] En una realización, la composición celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además un polipéptido GH61A de *Thermoascus aurantiacus* con actividad potenciadora celulolítica (SEC ID N.º: 2 en WO 2005/074656), y una proteína de fusión beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (WO 2008/057637).

50 [0137] En una realización, la composición celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además un polipéptido GH61A de *Thermoascus aurantiacus* con actividad potenciadora celulolítica (SEC ID N.º: 2 en WO 2005/074656) y beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (SEC ID N.º: 2 de WO 2005/047499) o la SEC ID N.º: 22 en el presente documento.

55 [0138] En una realización, la composición celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei* que comprende además un polipéptido GH61A de *Penicillium emersonii* con actividad potenciadora celulolítica descrito en WO 2011/041397 y beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (SEC ID N.º: 2 de WO 2005/047499) o la SEC ID N.º: 22 en el presente documento o una variante de la misma con las siguientes sustituciones F100D, S283G, N456E, F512Y

60 [0139] En una realización preferida, la composición celulolítica derivada de *Trichoderma reesei* comprende uno o varios de los siguientes componentes:

- (i) una celobiohidrolasa I de *Aspergillus fumigatus*;
- (ii) una celobiohidrolasa II de *Aspergillus fumigatus*;
- 65 (iii) una beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* o una variante de la misma; y

(iv) un polipéptido GH61 de *Penicillium* sp. con actividad potenciadora celulolítica; u homólogos de los mismos.

[0140] En una realización preferida, la composición celulolítica se deriva de *Trichoderma reesei* que comprende el polipéptido GH61A con actividad potenciadora celulolítica derivada de una cepa de *Penicillium emersonii* (SEC ID N.º: 2 en WO 2011/041397 o SEC ID N.º: 23 en el presente documento) y beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (SEC ID N.º: 2 en WO 2005/047499 SEC ID N.º: 22 en el presente documento) variante F100D, S283G, N456E, F512Y) descrita en WO 2012/044915; Cel7A CBH1 de *Aspergillus fumigatus* descrita como la SEC ID N.º: 6 en WO2011/057140 (SEC ID N.º: 24 en el presente documento) y CBH II de *Aspergillus fumigatus* descrita como la SEC ID N.º: 18 en WO 2011/057140 (SEC ID N.º: 25 en el presente documento).

[0141] En una realización, la composición celulolítica derivada de *Trichoderma reesei* se dosifica de 0,0001-3 mg EP/g de DS, preferiblemente, 0,0005-2 mg EP/g de DS, preferiblemente 0,001-1 mg/g de DS, más preferiblemente 0,005-0,5 mg EP/g de DS y aún más preferiblemente 0,01-0,1 mg EP/g de DS.

Materiales y métodos

Materiales:

[0142] Alfa-amilasa A (AAA): Alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones I181* + G182* + N193F truncadas a 491 aminoácidos (SEC ID N.º: 1)

[0143] Alfa-amilasa 1407 (AA1407): Alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones I181* + G182* + N193F + V59A + Q89R + E129V + K177L + R179E + H208Y + K220P + N224L + Q254S truncadas a 491 aminoácidos (SEC ID N.º: 1)

[0144] Alfa-amilasa 369 (AA369): Alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones: I181* + G182* + N193F + V59A + Q89R + E129V + K177L + R179E + Q254S + M284V truncada a 491 aminoácidos (SEC ID N.º: 1);

[0145] Proteasa 196: Metaloproteasa derivada de *Thermoascus aurantiacus* CGMCC n.º 0670 descrito como los aminoácidos 1-177 en la SEC ID N.º: 3 en el presente documento y los aminoácidos 1-177 de la SEC ID N.º: 2 en WO 2003/048353 con las siguientes mutaciones: A27K + D79L + Y82F + S87G + D104P + A112P + A126V + D142L.

[0146] Proteasa Pfu: Proteasa derivada de *Pyrococcus furiosus* comprada en Takara Bio (Japón) como proteasa Pfu S (actividad 10,5 mg/ml) y también se muestra en la SEC ID N.º: 13 en el presente documento.

[0147] Proteasa Pfu2: Proteasa derivada de *Pyrococcus furiosus* mostrada en la SEC ID N.º: 29 en el presente documento

[0148] Glucoamilasa PO: Parte madura de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* descrita como SEC ID N.º: 2 en PCT/CN10/071753 publicada como WO 2011/127802 y mostrada en las SEC ID N.º: 9 en el presente documento.

[0149] Glucoamilasa PE001: Variante de la glucoamilasa *Penicillium oxalicum*, que tiene una sustitución K79V (usando la secuencia madura mostrada en la SEC ID N.º: 14 para la numeración).

[0150] Glucoamilasa 493 (GA493): Variante de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* variante PE001 que además tiene las siguientes sustituciones: P11F + T65A + Q327F (usando la SEC ID N.º: 14 para la numeración).

[0151] Glucoamilasa 498 (GA498): Variante de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* variante PE001 que además tiene las siguientes sustituciones: P2N + P4F + P11F + T65A + Q327F (usando la SEC ID N.º: 14 para la numeración).

[0152] Glucoamilasa BL: Mezcla de la glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* descrita en WO 99/28448 como la SEC ID N.º: 7 y la glucoamilasa de *Trametes cingulata* descrita en WO 06/069289 en una proporción de aproximadamente 9: 1.

[0153] Glucoamilasa BL2: Mezcla que comprende la glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* descrita en WO 99/28448, la glucoamilasa de *Trametes cingulata* descrita en WO 06/69289 y la alfa-amilasa de *Rhizomucor pusillus* con un enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y un SBD descrita como V039 en la tabla 5 en WO 2006/069290 como actividades secundarias (proporción aproximadamente 65: 15: 1).

[0154] Glucoamilasa BL3: Mezcla que comprende la glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* descrita en WO 99/28448, la glucoamilasa de *Trametes cingulata* descrita en WO 06/69289 y la *alfa-amilasa de Rhizomucor pusillus* con un enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y un SBD descrita como V039 en la tabla 5 en WO 2006/069290 como actividades secundarias (proporción aproximadamente 21: 5: 1).

5

[0155] Glucoamilasa BL4: mezcla que comprende la glucoamilasa de *Talaromyces emersonii* descrita en WO 99/28448, la glucoamilasa de *Trametes cingulata* descrita en WO 06/69289 y la *alfa-amilasa de Rhizomucor pusillus* con un enlazador de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y un SBD descrita como V039 en la tabla 5 en WO 2006/069290 con las siguientes sustituciones: G128D + D143N (relación de actividad AGU: AGU FAU (F): aprox. 30: 7: 1).

10

[0156] Composición celulolítica A (CCA): Composición de celulasa de *Trichoderma reesei* vendida como CELLUCLAST 1.5 L (Novozymes A/S, Dinamarca)

15

[0157] Composición celulolítica B (CCB): Composición celulolítica derivada de *Trichoderma reesei* que comprende el polipéptido GH61A con actividad potenciadora celulolítica derivada de una cepa de *Penicillium emersonii* (SEC ID N.º: 2 en WO 2011/041397 o SEC ID N.º: 23 en el presente documento) y beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (SEC ID N.º: 2 en WO 2005/047499 SEC ID N.º: 22 en el presente documento) variante F100D, S283G, N456E, F512Y) descrita en WO 2012/044915; Cel7A CBH1 de *Aspergillus fumigatus* descrita como la SEC ID N.º: 6 en WO2011/057140 (SEC ID N.º: 24 en el presente documento) y CBH II de *Aspergillus fumigatus* descrita como la SEC ID N.º: 18 en WO 2011/057140 (SEC ID N.º: 25 en el presente documento).

20

[0158] Levadura: RED STAR ETHANOL RED™ disponible en Red Star/Lesaffre, EE. UU.

25

[0159] Sustrato de los ejemplos 18 y 19: El maíz molido y el backset se obtuvieron de una planta comercial en Estados Unidos.

Métodos

30

[0160] Identidad: La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad".

35

[0161] Para los fines de la presente invención, el grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos, así como el grado de identidad entre dos secuencias de nucleótidos, puede determinarse mediante el programa "alinear", que es una alineación de Needleman-Wunsch (es decir, una alineación global) . El programa se utiliza para la alineación de polipéptidos, así como de secuencias de nucleótidos. La matriz de puntuación predeterminada BLOSUM50 se usa para la alineación de polipéptidos, y la matriz de identidad predeterminada se usa para la alineación de nucleótidos. La penalización por el primer residuo de un gap es -12 para polipéptidos y -16 para nucleótidos. Las penalizaciones por residuos adicionales de un gap son -2 para polipéptidos y -4 para nucleótidos.

40

[0162] "Alinear" forma parte del paquete FASTA versión v20u6 (ver W. R. Pearson y D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85: 2444-2448 y W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA", Methods in Enzymology 183: 63-98) Las alineaciones de proteínas FASTA utilizan el algoritmo Smith-Waterman sin limitación en el tamaño de gap (ver "Smith-Waterman algorithm", T. F. Smith y M. S. Waterman (1981) J. Mol. Biol. 147: 195-197).

45

Ensayos de proteasas

50

Ensayo de AZCL-caseína

[0163] Una solución del 0,2 % del sustrato azul AZCL-caseína se suspende en tampón Bórax/NaH₂PO₄ pH 9 mientras se agita. La solución se distribuye mientras se agita en una placa de microtitulación (100 µl en cada pocillo), se agregan 30 µl de muestra de enzima y las placas se incuban en un Eppendorf Thermomixer durante 30 minutos a 45 °C y 600 rpm. La muestra de enzima desnaturalizada (100 °C en ebullición durante 20 minutos) se usa como blanco. Después de la incubación, la reacción se detiene transfiriendo la placa de microtitulación en hielo y la solución coloreada se separa del sólido mediante centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos a 4 °C. Se transfieren 60 µl de sobrenadante a una placa de microtitulación y se mide la absorbancia a 595 nm utilizando un lector de microplacas BioRad.

60

Ensayo de pNA

[0164] La muestra que contiene 50 µl de proteasa se agrega a una placa de microtitulación y el ensayo se inicia mediante la adición de 100 µl de sustrato de pNA 1 mM (5 mg disueltos en 100 µl de DMSO y luego diluidos

65

Condiciones estándar/condiciones de reacción:

Sustrato:	Almidón soluble, aprox. 0,17 g/l
Tampón:	Citrato, aprox. 0,03 M
Yodo (I ₂):	0,03 g/l
CaCl ₂ :	1,85 mM
pH:	2,50 ± 0,05
Temperatura de incubación:	40° C
Tiempo de reacción:	23 segundos
Longitud de onda:	590 Nm
Concentración de enzimas:	0,025 AFAU/ml
Rango de trabajo de la enzima:	0,01-0,04 AFAU/ml

[0171] Una carpeta [EB-SM-0259.02 /01](#) que describe este método analítico con más detalle está disponible previa solicitud en Novozymes A/S, Dinamarca.

5

Actividad de alfa-amilasa (KNU)

[0172] La actividad de alfa-amilasa puede determinarse usando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición del almidón de patata modificado por la enzima, seguida de la mezcla de muestras de la solución de almidón/enzima con una solución de yodo. Inicialmente, se forma un color azul negrozco, pero durante la descomposición del almidón, el color azul se debilita y gradualmente se convierte en un marrón rojizo, que se compara con un estándar de vidrio coloreado.

10

[0173] Una unidad de alfa amilasa de Kilo Novo (KNU) se define como la cantidad de enzima que, en condiciones estándar (es decir, a 37 °C +/- 0,05; Ca²⁺ 0,0003 M; y pH 5,6) dextriniza 5260 mg sustancia seca de almidón Merck Amylum soluble.

15

[0174] Una carpeta [EB-SM-0009.02 /01](#) que describe este método analítico con más detalle está disponible previa solicitud en Novozymes A/S, Dinamarca.

20

Determinación de FAU (F)

[0175] FAU (F) Unidades de Alfa-amilasa Fúngica (Fungamyl) se mide en relación con un estándar de enzima de una fuerza declarada.

25

Condiciones de reacción	
Temperatura	37° C
pH	7,15
Longitud de onda	405 Nm
Tiempo de reacción	5 min
Tiempo de medición	2 min

[0176] Una carpeta (EB-SM-0216.02) que describe este método estándar con más detalle está disponible a petición en Novozymes A/S, Dinamarca.

30

Determinación de la actividad de pululanasa (NPUN)

[0177] La actividad de endo-pululanasa en NPUN se mide en relación con un estándar de pululanasa Novozymes. Una unidad de pululanasa (NPUN) se define como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de glucosa por minuto en condiciones estándar (0,7 % de pululano rojo (Megazyme), pH 5, 40 °C, 20 minutos). La actividad se mide en NPUN/ml utilizando pululano rojo.

35

[0178] 1 ml de muestra diluida o estándar se incuba a 40 °C durante 2 minutos. Se añaden y mezclan 0,5 ml de pululano rojo al 2 %, KCl 0,5 M, ácido cítrico 50 mM, pH 5. Los tubos se incuban a 40 °C durante 20 minutos y se detienen mediante la adición de 2,5 ml de etanol al 80 %. Los tubos se dejan reposar a temperatura ambiente durante 10-60 minutos y, a continuación, se centrifugan durante 10 minutos a 4000 rpm. La OD de los sobrenadantes se mide luego a 510 nm y la actividad se calcula utilizando una curva estándar.

40

[0179] La presente invención se describe con más detalle en los siguientes ejemplos que se ofrecen para ilustrar la presente invención, pero de ninguna manera pretenden limitar el alcance de la invención en la forma reivindicada.

45

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Estabilidad de las variantes de alfa-amilasa

- 5 [0180] La estabilidad de una alfa-amilasa de referencia (alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones I181* + G182* + N193F truncadas a 491 aminoácidos (SEC ID n.º: 1 numeración)) y sus variantes de alfa-amilasa se determinó incubando la alfa-amilasa de referencia y las variantes a pH 4,5 y 5,5 y temperaturas de 75 °C y 85 °C con CaCl₂ 0,12 mM y, a continuación, determinando la actividad residual utilizando el sustrato EnzChek® (kit de ensayo de amilasa EnzChek® Ultra, E33651, Molecular Probes).
- 10 [0181] Las muestras de enzimas purificadas se diluyeron hasta concentraciones de trabajo de 0,5 y 1 o 5 y 10 ppm (microgramos/ml) en tampón de dilución enzimática (acetato 10 mM, Triton X100 al 0,01 %, CaCl₂ 0,12 mM, pH 5,0). Se transfirió una muestra de enzima de veinte microlitros a una PCR de MTP de 48 pocillos y un tampón de estabilidad de 180 microlitros (acetato 150 mM, MES 150 mM, Triton X100 al 0,01 %, CaCl₂ 0,12 mM, pH 4,5 o 5,5) a cada pozo y se mezclaron. El ensayo se realizó usando dos concentraciones de enzima por duplicado.
- 15 Antes de la incubación a 75 °C u 85 °C, se extrajeron 20 microlitros y se almacenaron en hielo como muestras de control. La incubación se realizó en una máquina de PCR a 75 °C y 85 °C. Después de la incubación, las muestras se diluyeron hasta 15 ng/ml en tampón de actividad residual (acetato 100 mM, Triton X100 al 0,01 %, CaCl₂ 0,12 mM, pH 5,5) y 25 microlitros de enzima diluida se transfirieron a un MTP de 384 negro. La actividad residual se determinó usando el sustrato EnzChek agregando 25 microlitros de solución de sustrato (100 microgramos/ml) a cada pocillo. La fluorescencia se determinó cada minuto durante 15 minutos usando un filtro de excitación a 485-P nm y un filtro de emisión a 555 nm (el lector de fluorescencia es Polarstar, BMG). La actividad residual se normalizó a las muestras de control para cada configuración.
- 20 [0182] Suponiendo que el tiempo de vida media de desintegración logarítmica (T_{1/2} (min)) se calculó utilizando la ecuación: T_{1/2} (min) = T (min) * LN (0,5)/LN (%RA/100), donde T es el tiempo de incubación del ensayo en minutos, y %RA es el % de actividad residual determinada en el ensayo.
- 25 [0183] Usando esta configuración de ensayo, se determinó la semivida para la alfa-amilasa de referencia y su variante, como se muestra en la tabla 1.
- 30

Tabla 1

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

ES 2 749 652 T3

V59A + E129V + K177L + R179E + H208Y + K220P + N224L + S242Q + Q254S			
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S	>180	49	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S+ H274K	>180	53	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S+ Y276F	>180	57	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S+ D281N	>180	37	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S+ M284T	>180	51	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S+ G416V	>180	45	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S	143	21	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S+ M284T	>180	22	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones A91 L + M961 + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S	>180	38	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179E	57	11	402
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S	174	44	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + Y276F + L427M	>180	49	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S+ M284T	>180	49	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + N376* + I377*	177	36	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S	94	13	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S + M284T	129	24	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179E + S242Q	148	30	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179V	78	9	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179V + K220P + N224L + S242Q + Q254S	178	31	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones K220P + N224L + S242Q + Q254S	66	17	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones K220P + N224L + Q254S	30	6	159
Alfa-amilasa A de referencia con la sustitución M284T	35	7	278
Alfa-amilasa A de referencia con la sustitución M284V	59	13	ND

ND no determinado

[0184] Los resultados demuestran que las variantes de alfa-amilasa tienen una semivida y una estabilidad significativamente mayores que la alfa-amilasa de referencia.

5 Ejemplo 2

Preparación de variantes de proteasa y prueba de termoestabilidad

Cepas y plásmidos

10

[0185] Se usó *E. coli* DH12S (disponible en Gibco BRL) para el rescate del plásmido de levadura. El pJTP000 es un vector lanzadera de *S. cerevisiae* y *E. coli* bajo el control del promotor TPI, construido a partir del pJC039 descrito en WO 01/92502, en el que se ha insertado el gen de proteasa M35 de *Thermoascus aurantiacus* (WO 03048353).

15

[0186] Células competentes de *Saccharomyces cerevisiae* YNG318: se usó MATa Dpep4 [cir +] ura3-52, leu2-D2, his4-539 para la expresión de variantes de proteasa. Se describe en J. Biol. Chem 272 (15), págs. 9720-9727, 1997.

20

Medios y sustratos

[0187] Solución basal 10X: Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (DIFCO) 66,8 g/l, succinato 100 g/l, NaOH 60 g/l.

25

[0188] Glucosa SC: 20 % de glucosa (es decir, una concentración final del 2 % = 2 g/100 ml) 100 ml/l, 5 % de treonina 4 ml/l, 1 % de triptófano 10 ml/l, 20 % de casaminoácidos 25 ml/l, solución basal 10 X 100 ml/l. La solución se esteriliza usando un filtro de un tamaño de poro de 0,20 micrómetros. Agar (2 %) y H₂O (aprox. 761 ml) se esterilizan conjuntamente en autoclave, y la solución de glucosa SC esterilizada por separado se agrega a la solución de agar.

30

[0189] YPD: 20 g/l de peptona Bacto, 10 g/l de extracto de levadura, 100 ml/l de glucosa al 20 %.

[0190] YPD + Zn: YPD + ZnSO₄ 0,25 mM

35

[0191] Solución PEG/LiAc: 50 ml de PEG4000 al 40 %, 1 ml de acetato de litio 5 M.

placa de microtitulación de zeína de 96 pocillos:

40

[0192] Cada pocillo contiene 200 µl del 0,05-0,1 % de zeína (Sigma), ZnSO₄ 0,25 mM y 1 % de agar en tampón de acetato de sodio 20 mM, pH 4,5.

Manipulaciones de ADN

45

[0193] A menos que se indique lo contrario, las manipulaciones y transformaciones de ADN se realizaron utilizando métodos estándar de biología molecular tal como se describe en Sambrook y col. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, lab. Cold Spring Harbor. Cold Spring Harbor, Nueva York; Ausubel, F. M. et al. (eds.) "Current protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R. y Cutting, S. M. (Eds.).

50

Transformación de levadura

55

[0194] La transformación de levadura se realizó utilizando el método de acetato de litio. Se mezclan 0,5 µl de vector (digerido mediante endonucleasas de restricción) y 1 µl de fragmentos de PCR. La mezcla de ADN, 100 µl de células competentes YNG318 y 10 µl de ADN portador YEAST MAKER (Clontech) se agrega a un tubo de polipropileno de 12 ml (Falcon 2059). Agregar 0,6 ml de solución de PEG/LiAc y mezclar suavemente. Incubar durante 30 minutos a 30 °C y 200 rpm, luego durante 30 minutos a 42 °C (choque térmico). Transferir a un tubo Eppendorf y centrifugar durante 5 segundos. Eliminar el sobrenadante y disolver en 3 ml de YPD. Incubar la suspensión celular durante 45 minutos a 200 rpm a 30 °C. Verter la suspensión en placas de glucosa SC e incubar a 30 °C durante 3 días para cultivar colonias. El ADN total de levadura se extrae con el kit Miniprep de plásmido de levadura Zymoprep (ZYMO research).

60

Secuenciación de ADN

65

[0195] La transformación de *E. coli* para la secuenciación del ADN se llevó a cabo mediante electroporación (BIO-RAD Gene Pulser). Los plásmidos de ADN se prepararon mediante un método alcalino (Molecular Cloning,

Cold Spring Harbor) o con el kit de plásmido de Qiagen®. Los fragmentos de ADN se recuperaron del gel de agarosa con el kit de extracción de gel de Qiagen. La PCR se realizó usando un PTC-200 DNA Engine. El analizador genético ABI PRISM 310 se utilizó para determinar todas las secuencias de ADN.

5 Construcción del vector de expresión de proteasa

[0196] El gen de la proteasa M35 de *Thermoascus* se amplificó con el par de cebadores Prot F (SEC ID N.º: 4) y Prot R (SEC ID N.º: 5). Los fragmentos de PCR resultantes se introdujeron en *S. cerevisiae* YNG318 junto con el vector pJC039 (descrito en WO 2001/92502) digeridos con enzimas de restricción para eliminar el gen de la cutinasa de *Humicola insolens*.

[0197] El plásmido en clones de levadura en las placas de glucosa SC se recuperó para confirmar la secuencia interna y se denominó pJTP001.

15 Construcción de la biblioteca de levadura y variantes dirigidas

[0198] La biblioteca de levadura y las variantes dirigidas se construyeron mediante el método SOE PCR (Empalme por extensión de solapamiento, ver "PCR: A practical approach", p. 207-209, Oxford University press, eds. McPherson, Quirke, Taylor), seguido de recombinación de levadura *in vivo*

Cebadores generales para amplificación y secuenciación.

[0199] Los cebadores AM34 (SEC ID N.º: 5) y AM35 (SEC ID N.º: 6) se usaron para hacer fragmentos de ADN que contenían fragmentos mutados por el método SOE junto con cebadores degenerados (AM34 + cebador inverso y AM35 + cebador directo) o simplemente para amplificar un gen de proteasa completo (AM34 + AM35).

Sistema de reacción de PCR:	Condiciones:
48,5 µl de H ₂ O	1 94 °C 2 min
2 Perlas PURE Taq Ready-To-Go de PCR (Amersham Biosciences)	2 94 °C 30 segundos
0,5 µl X 2 100 pmol/µl de cebadores	3 55 °C 30 segundos
0,5 µl plantilla ADN	4 72 °C 90 segundos
	2-4 25 ciclos
	5 72 °C 10 min

[0200] Los fragmentos de ADN se recuperaron del gel de agarosa con el kit de extracción de gel de Qiagen. Los fragmentos purificados resultantes se mezclaron con la digestión del vector. La solución mixta se introdujo en *Saccharomyces cerevisiae* para construir bibliotecas o variantes dirigidas mediante recombinación *in vivo*

Ensayo de actividad relativa

[0201] Los clones de levadura en glucosa SC se inocularon en un pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos que contenía medio YPD + Zn y se cultivaron a 28 °C durante 3 días. Los sobrenadantes del cultivo se aplicaron a una placa de microtitulación de zeína de 96 pocillos y se incubaron a al menos 2 temperaturas (por ejemplo, 60 °C y 65 °C, 70 °C y 75 °C, 70 °C y 80 °C) durante más de 4 horas o toda la noche. La turbidez de la zeína en la placa se midió como A630 y la actividad relativa (temperaturas más altas/más bajas) se determinó como un indicador de la mejora de la termoactividad. Se seleccionaron los clones con mayor actividad relativa que la variante progenitora y se determinó la secuencia.

Ensayo de actividad restante

[0202] Los clones de levadura en glucosa SC se inocularon en un pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos y se cultivaron a 28 °C durante 3 días. La actividad de la proteasa se midió a 65 °C usando azocaseína (Megazyme) después de incubar el sobrenadante de cultivo en tampón de acetato de sodio 20 mM, pH 4,5, durante 10 minutos a una temperatura determinada (80 °C u 84 °C con 4 °C como referencia) para determinar la actividad restante. Se seleccionaron los clones con mayor actividad restante que la variante progenitora y se determinó la secuencia.

Ensayo de azocaseína

[0203] Se mezclaron 20 µl de muestras con 150 µl de solución de sustrato (4 ml de azocaseína al 12,5 % en etanol en 96 ml de acetato sódico 20 mM, pH 4,5, que contiene 0,01% de Triton-100 y ZnSO₄ 0,25 mM) y se incubaron durante 4 horas o más.

[0204] Después de agregar 20 µl/pocillo de solución de ácido tricloroacético (TCA) al 100 %, la placa se centrifugó y se pipetearon 100 µl de sobrenadantes para medir A440.

Expresión de las variantes de proteasa en *Aspergillus oryzae*

[0205] Los constructos que comprenden los genes variantes de la proteasa se usaron para construir vectores de expresión para *Aspergillus*. Los vectores de expresión de *Aspergillus* consisten en un casete de expresión basado en el promotor de amilasa II neutral de *Aspergillus niger* fusionado con la secuencia líder no traducida de triosa fosfato isomerasa (Pna2/tpi) de *Aspergillus nidulans* y el terminador de amiloglucosidasa (Tamg) de *Aspergillus niger*. También estaba presente en el plásmido el marcador selectivo amdS de *Aspergillus nidulans* que permite el crecimiento de acetamida como única fuente de nitrógeno. Los plásmidos de expresión para las variantes de proteasa se transformaron en *Aspergillus* como se describe en Lassen et al. (2001), Appl. Environ. Microbiol 67, 4701-4707. Para cada uno de los constructos, se aislaron, se purificaron y se cultivaron 10-20 cepas en matraces de agitación.

Purificación de variantes expresadas

15 [0206]

1. Ajustar a 4,0 el pH de la muestra de fermentación filtrada de 0,22 µm.
2. Poner la muestra en un baño de hielo con agitación magnética. Añadir (NH₄)₂SO₄ en pequeñas alícuotas (correspondientes a aproximadamente (NH₄)₂SO₄ 2,0-2,2 M sin tener en cuenta el aumento de volumen al agregar el compuesto).
3. Después de la adición final de (NH₄)₂SO₄, incubar la muestra en el baño de hielo con agitación magnética suave durante un mínimo de 45 min.
4. Centrifugación: centrifuga refrigerada de alta velocidad Hitachi himac CR20G equipada con cabezal de rotor R20A2, 5 °C, 20 000 rpm, 30 min.
5. Disolver el precipitado formado en 200 ml de acetato de Na 50 mM pH 4,0.
6. Filtrar la muestra por succión al vacío utilizando una membrana PES PLUS de 0,22 µm (IWAKI).
7. Desalinizar/intercambiar tampón de la muestra a acetato de Na 50 mM pH 4,0 usando ultrafiltración (Vivacell 250 de Vivascience equipado con membrana MWCO PES de 5 kDa) durante la noche en una habitación fría. Diluir la muestra retenida hasta 200 ml usando acetato de Na 50 mM pH 4,0. La conductividad de la muestra es preferiblemente inferior a 5 mS/cm.
8. Cargar la muestra en una columna de intercambio catiónico equilibrada con acetato de Na 50 mM pH 4,0. Lavar la muestra no unida de la columna usando 3 volúmenes de columna de tampón de unión (acetato de Na 50 mM pH 4,0), y eluir la muestra usando un gradiente lineal, 0-100 % de tampón de elución (acetato de Na 50 mM + NaCl 1 M pH 4,0) en 10 volúmenes de columna.
9. Las fracciones recogidas se analizan mediante un ensayo de endoproteasa (véase más adelante) y, a continuación, SDS-PAGE estándar (condiciones reductoras) en fracciones seleccionadas. Las fracciones se agrupan sobre la base del ensayo de endoproteasa y SDS-PAGE.

Ensayo de endoproteasa

40 [0207]

1. Comprimido Protazyme OL/5 ml de acetato de Na 250 mM pH 5,0 se disuelve mediante agitación magnética (sustrato: comprimido Protazyme AK de endoproteasa de Megazyme - cat. # PRAK 11/08).
2. Con agitación, se transfieren 250 µl de solución de sustrato a un tubo Eppendorf de 1,5 ml.
3. Se añaden 25 µl de muestra a cada tubo (el blanco es el tampón de muestra).
4. Los tubos se incuban en un termomezclador con agitación (1000 rpm) a 50 °C durante 15 minutos.
5. Se agregan 250 µl de NaOH 1 M a cada tubo y, a continuación, se agita en vórtice.
6. Centrifugación durante 3 min. a 16 100 × G y 25 °C.
7. Se transfieren 200 µl del sobrenadante a un MTP y se registra la absorbancia a 590 nm.

Resultados

55 [0208]

Tabla 2. Actividad relativa de las variantes de proteasa. La numeración de la(s) sustitución(es) comienza desde el extremo N-terminal del péptido maduro en los aminoácidos 1 a 177 de la SEC ID N.º: 2.		
Variante	Sustitución(es)	Actividad relativa 65 °C/60 °C
TS	ninguna	31 %
JTP004	S87P	45 %
JTP005	A112P	43 %
JTP008	R2P	71 %
JTP009	D79K	69 %
JTP010	D79L	75 %
JTP011	D79M	73 %

ES 2 749 652 T3

JTP012	D79L/S87P	86 %
JTP013	D79L/S87P/A112P	90 %
JTP014	D79L/S87P/A112P	88 %
JTP016	A73C	52 %
JTP019	A126V	69 %
JTP021	M152R	59 %

Tabla 3. Actividad relativa de las variantes de proteasa. La numeración de la(s) sustitución(es) comienza desde el extremo N-terminal del péptido maduro en los aminoácidos 1 a 177 de la SEC ID N.º: 2.

Variante	Sustitución(es) y/o eliminación(es)	Actividad relativa		
		70 °C/65 °C	75 °C/65 °C	75 °C/70 °C
TS	ninguna	59 %	17 %	
JTP036	D79L/S87P/D142L	73 %	73 %	
JTP040	T54R/D79L/S87P		71 %	
JTP042	Q53K/D79L/S87P/1173V		108 %	
JTP043	Q53R/D79L/S87P		80 %	
JTP045	S41R/D79L/S87P		82 %	
JTP046	D79L/S87P/Q158W		96 %	
JTP047	D79L/S87P/S157K		85 %	
JTP048	D79L/S87P/D104R		88 %	
JTP050	D79L/S87P/A112P/D142L		88 %	
JTP051	D79L/S87P/A112P/D142L			102 %
JTP052	D79L/S87P/A112P/D142L/S157K			111 %
JTP053	S41R/D79L/S87P/A112P/D142L/S157K			113 %
JTP054	ΔS5/D79L/S87P			92 %
JTP055	ΔG8/D79L/S87P			95 %
JTP059	C6R/D79L/S87P			92 %
JTP061	T46R/D79L/S87P			111 %
JTP063	S49R/D79L/S87P			94 %
JTP064	D79L/S87P/N88R			92 %
JTP068	D79L/S87P/T114P			99 %
JTP069	D79L/S87P/S115R			103 %
JTP071	D79L/S87P/T116V			105 %
JTP072	N26R/D79L/S87P		92 %	
JTP077	A27K/D79L/S87P/A112P/D142L		106 %	
JTP078	A27V/D79L/S87P/A112P/D142L		100 %	
JTP079	A27G/D79L/S87P/A112P/D142L		104 %	

Tabla 4. Actividad relativa de las variantes de proteasa. La numeración de la(s) sustitución(es) comienza desde el extremo N-terminal del péptido maduro en los aminoácidos 1 a 177 de la SEC ID N.º: 2.

Variante	Sustitución(es) y/o eliminación(es)	Actividad relativa 75 °C/65 °C	Actividad restante	
			80 °C	84 °C
JTP082	ΔS5/D79L/S87P/A112P/D142L	129 %		53 %
JTP083	T46R/D79L/S87P/A112P/D142L	126 %		
JTP088	Y43F/D79L/S87P/A112P/D142L	119 %		
JTP090	D79L/S87P/A112P/T124L/D142L	141 %		
JTP091	D79L/S87P/A112P/T124V/D142L	154 %	43 %	
JTP092	ΔS5/N26R/D79L/S87P/A112P/D142L			60 %
JTP095	N26R/T46R/D79L/S87P/A112P/D142L			62 %
JTP096	T46R/D79L/S87P/T116V/D142L			67 %
JTP099	D79L/P81R/S87P/A112P/D142L			80 %
JTP101	A27K/D79L/S87P/A112P/T124V/D142L		81 %	
JTP116	D79L/Y82F/S87P/A112P/T124V/D142L		59 %	
JTP117	D79L/Y82F/S87P/A112P/T124V/D142L		94 %	
JTP127	D79L/S87P/A112P/T124V/A126V/D1		53 %	

42L			
-----	--	--	--

Tabla.5 Actividad relativa de las variantes de proteasa. La numeración de la(s) sustitución(es) comienza desde el extremo N-terminal del péptido maduro en los aminoácidos 1 a 177 de la SEC ID N.º: 2.				
Variante	Sustituciones	Actividad relativa		
		75 °C/70 °C	80 °C/70 °C	85 °C/70 °C
JTP050	D79L S87P A112P D142L	55 %	23 %	9 %
JTP134	D79L Y82F S87P A112P D142L		40 %	
JTP135	S38T D79L S87P A112P A126V D142L		62 %	
JTP136	D79L Y82F S87P A112P A126V D142L		59 %	
JTP137	A27K D79L S87P A112P A126V D142L		54 %	
JTP140	D79L S87P N98C A112P G135C D142L	81 %		
JTP141	D79L S87P A112P D142L T141C M161C	68 %		
JTP143	S36P D79L S87P A112P D142L	69 %		
JTP144	A37P D79L S87P A112P D142L	57 %		
JTP145	S49P D79L S87P A112P D142L	82 %	59 %	
JTP146	S50P D79L S87P A112P D142L	83 %	63 %	
JTP148	D79L S87P D104P A112P D142L	76 %	64 %	
JTP161	D79L Y82F S87G A112P D142L		30 %	12 %
JTP180	S70V D79L Y82F S87G Y97W A112P D142L		52 %	
JTP181	D79L Y82F S87G Y97W D104P A112P D142L		45 %	
JTP187	S70V D79L Y82F S87G A112P D142L		45 %	
JTP188	D79L Y82F S87G D104P A112P D142L		43 %	
JTP189	D79L Y82F S87G A112P A126V D142L		46 %	
JTP193	Y82F S87G S70V D79L D104P A112P D142L			15 %
JTP194	Y82F S87G D79L D104P A112P A126V D142L			22 %
JTP196	A27K D79L Y82F S87G D104P A112P A126V D142L			18 %

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

Ejemplo 3

5

Perfil de temperatura de variantes seleccionadas usando enzimas purificadas

[0209] Las variantes seleccionadas que muestran una buena estabilidad térmica se purificaron y las enzimas purificadas se usaron en un ensayo de zeína-BCA como se describe a continuación. La actividad restante de proteasa se determinó a 60 °C después de la incubación de la enzima a temperaturas elevadas durante 60 minutos tal como se indica.

10

Ensayo de zeína-BCA:

[0210] El ensayo de zeína-BCA se realizó para detectar la cuantificación de proteínas solubles liberadas de zeína

15

por las variantes de proteasas a varias temperaturas.

Protocolo:

5 [0211]

- 1) Mezclar 10 ul de soluciones enzimáticas de 10 ug/ml y 100 ul de solución de zeína al 0,025 % en una placa de microtitulación (MTP).
- 2) Incubar a varias temperaturas durante 60 minutos.
- 10 3) Añadir 10 ul de solución de ácido tricloroacético (TCA) al 100 %.
- 4) Centrifugar MTP a 3500 rpm durante 5 minutos.
- 5) Llevar 15 ul a un nuevo MTP que contenga 100 ul de solución de ensayo de BCA (Pierce n.º cat: 23225, kit de ensayo de proteínas BCA).
- 15 6) Incubar durante 30 minutos a 60 °C.
- 7) Medir A562.

[0212] Los resultados se muestran en la tabla 6. Todas las variantes ensayadas mostraron una estabilidad térmica mejorada en comparación con la proteasa ts.

20

Tabla 6. Ensayo de zeína-BCA

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

Ejemplo 4

Caracterización de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*

25

[0213] La glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se describe en la SEC ID N.º: 9 del presente documento.

Sustrato. Sustrato: almidón soluble (Sigma S-9765) del 1 % en agua desionizada

Tampón de reacción: tampón de acetato 0,1 M a pH 5,3

30

Kit de determinación de concentración de glucosa: kit de ensayo de glucosa Wako (LabAssay glucose, WAKO, n.º cat 298-65701).

Condición de reacción. Se mezclaron 20 µl de almidón soluble y 50 µl tampón acetato a pH 5,3. Se añadieron 30 µl de solución enzimática (50 µg de proteína enzimática/ml) a un volumen final de 100 µl seguido de incubación a 37 °C durante 15 min.

35

[0214] La concentración de glucosa se determinó mediante kits Wako.

[0215] Todo el trabajo se realizó en paralelo.

40

Temperatura óptima. Para evaluar la temperatura óptima de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* el ensayo de "condición de reacción" descrito anteriormente se realizó a 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90 y 95 °C. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Tabla 7 Temperatura óptima

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

45

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

Estabilidad térmica Para evaluar la estabilidad térmica de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*, el ensayo de la condición de reacción se modificó en que la solución enzimática y el tampón de acetato se preincubaron durante 15 minutos a 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90 y 95 °C. Después de la incubación, se añadieron 20 µl de almidón a la solución y el ensayo se realizó tal como se ha descrito anteriormente.

50

[0216] Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8 Estabilidad térmica

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

[0217] De los resultados se puede ver que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* es estable hasta 70 °C después de la preincubación durante 15 minutos, ya que mantiene más del 80 % de actividad.

5 pH óptimo. Para evaluar el pH óptimo de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* el ensayo de la condición de reacción descrito anteriormente se realizó a pH 2,0, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 y 11,0. En lugar de usar el tampón de acetato descrito en el ensayo de la condición de reacción, se usó el siguiente tampón de ácido succínico 100 mM, HEPES, CHES, CAPSO, CaCl₂ 1 mM, KCl 150 mM, Triton X-100 al 0,01 %, pH ajustado a 2,0, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 u 11,0 con HCl o NaOH.

10 [0218] Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9 pH óptimo

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

15 [0219] De los resultados se puede ver que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en las condiciones dadas tiene la mayor actividad a pH 5,0. La glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* es activa en un amplio rango de pH, ya que mantiene más del 50 % de actividad de pH 2 a 7.

20 Estabilidad de pH. Para evaluar la estabilidad térmica de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*, el ensayo de la condición de reacción se modificó en que la solución enzimática (50 microgramos/ml) se preincubó durante 20 horas en tampones con pH 2,0, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 9,0, 10,0 y 11,0 usando los tampones descritos bajo pH óptimo. Después de la preincubación, se agregaron 20 µl de almidón soluble hasta un volumen final de 100 µl a la solución y el ensayo se realizó tal como se ha descrito anteriormente.

[0220] Los resultados se muestran en la tabla 10.

25 Tabla 10 estabilidad de pH

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

[0221] De los resultados se puede ver que la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*, es estable desde pH 3 hasta pH 7 después de la preincubación durante 20 horas y disminuye su actividad a pH 8.

30 Ejemplo 5

Termoestabilidad de la proteasa Pfu.

35 [0222] La termoestabilidad de la proteasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu S) comprada en Takara Bio Inc, (Japón) se probó utilizando los mismos métodos que en el ejemplo 2. Se encontró que la termoestabilidad (actividad relativa) era del 110 % a (80 °C/70 °C) y del 103 % (90 °C/70 °C) a pH 4,5.

Ejemplo 6

40 Clonación del gen de glucoamilasa de la cepa de *Penicillium oxalicum*

Preparación de la cepa de ADNc de *Penicillium oxalicum*.

45 [0223] El ADNc se sintetizó siguiendo las instrucciones del sistema de amplificación rápida de extremos de ADNc 3' (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE. UU.).

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

50 [0224] El gen de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se clonó usando el cebador oligonucleotídico que se muestra a continuación, diseñado para amplificar el gen de glucoamilasa desde el extremo 5'.

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

55 [0225] El gen de longitud completa se amplificó por PCR con cebador sentido y AUAP (suministrado por el sistema de amplificación rápida de extremos de ADNc 3') usando Platinum HIFI Taq DNA polymerase (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, EE. UU.). La reacción de amplificación estaba compuesta por 5 µl de tampón 10x de PCR, 2 µl de MgCl₂ 25 mM, 1 µl de dNTP 10 mM, 1 µl de cebador sentido 10 µM, 1 µl de AUAP 10 µM, 2 µl del ADNc de la primera cadena, 0,5 µl de Taq HIFI y 37,5 µl de agua desionizada. El programa de PCR fue: 94 °C, 3 minutos; 10 ciclos de 94 °C durante 40 segundos, 60 °C 40 segundos con 1 °C de disminución por ciclo, 68 °C durante 2 minutos; 25 ciclos de 94 °C durante 40 segundos, 50 °C durante 40 segundos, 68 °C durante 2

minutos; extensión final a 68 °C durante 10 minutos.

[0226] El fragmento de PCR obtenido se clonó en el vector pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, EE. UU.) Utilizando un sistema de vectores pGEM-T (Promega Corporation, Madison, WI, EE. UU.) para generar el plásmido AMG 1. El gen de glucoamilasa insertado en el plásmido AMG 1 confirmó la secuenciación de la cepa *E. coli* TOP10 que contiene el plásmido AMG 1 (designado NN059173), se depositó en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) el 23 de noviembre de 2009, y se le asignó el número de acceso DSM 23123.

10 Ejemplo 7

Expresión de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* clonada

[0227] El gen de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se volvió a clonar del plásmido AMG 1 en un vector de expresión de *Aspergillus* mediante PCR usando dos cebadores de clonación F y R que se muestran a continuación, diseñados basándose en la secuencia conocida y se agregaron marcadores para la clonación directa mediante la estrategia IN-FUSION™.

Cebador F: 5' ACACAACGGGGATCCACCATGCGTCTCACTCTATTATC (SEC ID N.º: 16)

Cebador R: 5' AGATCTCGAGAAGCTTAAACTGCCACACGTCGTTGG (SEC ID N.º: 17)

[0228] Se realizó una reacción de PCR con el plásmido AMG 1 para amplificar el gen de longitud completa. La reacción de PCR estaba compuesta por 40 µg de ADN del plásmido AMG 1, 1 µl de cada cebador (100 µM); 12,5 µl de 2X Extensor Hi-Fidelity master mix (Extensor Hi-Fidelity master mix, ABgene, Reino Unido) y 9,5 µl de agua de calidad PCR. La reacción de PCR se realizó utilizando una máquina de PCR DYAD (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE. UU.) programada durante 2 minutos a 94 °C seguida de 25 ciclos de 94 °C durante 15 segundos, 50 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto; y luego 10 minutos a 72 °C.

[0229] Los productos de reacción se aislaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,0 % usando tampón 1 x TAE donde se separó del gel una banda de producto de PCR de aproximadamente 1,9 kb y se purificó usando un kit de purificación de banda de gel y ADN de PCR GFX® (GE Healthcare, Reino Unido) según a las instrucciones del fabricante. Se clonó ADN correspondiente al gen de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* en un vector de expresión de *Aspergillus* linealizado con *Bam*HI y *Hind*III, utilizando un kit de clonación de PCR en seco IN-FUSION™ (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La construcción del vector linealizado se realiza como se describe en el documento WO 2005/042735 A1.

[0230] Se usó un volumen de 2 µl de la mezcla de ligadura para transformar 25 µl de células de *E. coli* Fusion Blue (incluidas en el kit de clonación de PCR en seco IN-FUSION™). Después de un choque térmico a 42 °C durante 45 segundos, y enfriando en hielo, se añadieron 250 µl de medio SOC, y las células se incubaron a 37 °C a 225 rpm durante 90 minutos antes de ser sembradas en placas de agar LB que contenían 50 µg de ampicilina por ml, y cultivadas durante la noche a 37 °C. Las colonias seleccionadas se inocularon en 3 ml de medio LB suplementado con 50 µg de ampicilina por ml y se incubaron a 37 °C a 225 rpm durante la noche. El ADN plasmídico de las colonias seleccionadas se purificó usando Mini JETSTAR (Genomed, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuencia del gen de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se verificó mediante secuenciación de Sanger antes de la expresión heteróloga. Se seleccionó uno de los plásmidos para expresión adicional, y se denominó XYZ XYZ1471-4.

[0231] Se prepararon protoplastos de *Aspergillus niger* MBin118 como se describe en WO 95/02043. Se mezclaron cien µl de suspensión de protoplastos con 2,5 µg del plásmido XYZ1471-4 y se añadieron y mezclaron suavemente 250 microlitros de PEG 4000 al 60 % (Applichem) (polietilenglicol, peso molecular 4000), CaCl₂ 10 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos y los protoplastos se mezclaron con agarosa al 6 % de bajo punto de fusión (Biowhittaker Molecular Applications) en placas de sacarosa COVE (Cove, 1996, Biochim. Biophys Acta 133: 51-56) (1 M) suplementadas con acetamida 10 mM y CsCl 15 mM y agregadas como capa superior en placas de sacarosa de COVE (1 M) suplementadas con acetamida 10 mM y CsCl 15 mM para la selección de transformantes (4 ml de agar superior por placa). Después de la incubación durante 5 días a 37 °C, se recogieron esporas de dieciséis transformantes y se sembraron en 750 µl YP-2 % de medio de Maltosa en placas MT de 96 pocillos. Después de 5 días de cultivo estacionario a 30 °C, se analizaron 10 µl del caldo de cultivo de cada pocillo en un gel SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio), Griton XT Precast gel (BioRad, CA, EE. UU.) para identificar los mejores transformantes basándose en la capacidad de producir gran cantidad de glucoamilasa. Se identificó un transformante seleccionado en la placa de transformación original y se conservó como esporas en materia prima de glicerol al 20 % y se almacenó congelado (-80 °C).

[0232] Cultivo. El transformante seleccionado se inoculó en 100 ml de medio MLC y se cultivó a 30 °C durante 2 días en matraces de agitación de 500 ml en un agitador rotatorio. Se inocularon 3 ml del caldo de cultivo en 100 ml de medio M410 y se cultivaron a 30 °C durante 3 días. El caldo de cultivo se centrifugó y el sobrenadante se

filtró usando filtros de membrana de 0,2 µm.

[0233] Gel de afinidad de alfa-ciclodextrina. Se suspendieron diez gramos de polvo de Sepharose 6B (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Reino Unido) activada con epoxi y se lavaron con agua destilada en un filtro de vidrio sinterizado. El gel se suspendió en solución de acoplamiento (100 ml de 12,5 mg/ml de alfa-ciclodextrina, NaOH 0,5 M) y se incubó a temperatura ambiente durante un día con agitación suave. El gel se lavó con agua destilada en un filtro de vidrio sinterizado, se suspendió en 100 ml de etanolamina 1 M, pH 10, y se incubó a 50 °C durante 4 horas para el bloqueo. El gel se lavó varias veces usando Tris-HCl 50 mM, pH 8 y NaOAc 50 mM, pH 4,0 alternativamente. El gel se envasó finalmente en una columna de 35-40 ml usando tampón de equilibrio (NaOAc 50 mM, NaCl 150 mM, pH 4,5).

[0234] Purificación de glucoamilasa del caldo de cultivo. El caldo de cultivo de fermentación de *A. niger* MBin118 que contenía el gen de la glucoamilasa se filtró a través de un filtro PES de 0,22 µm y se aplicó en una columna de gel de afinidad de alfa-ciclodextrina previamente equilibrada en NaOAc 50 mM, NaCl 150 mM, pH 4,5. El material no unido se retiró de la columna lavando con tampón de equilibrado y la glucoamilasa se eluyó usando el mismo tampón que contenía beta-ciclodextrina 10 mM en 3 volúmenes de columna.

[0235] Se comprobó la actividad de glucoamilasa del eluyente para ver si la glucoamilasa se había unido al gel de afinidad de alfa-ciclodextrina. La muestra de glucoamilasa purificada se dializó luego contra NaOAc 20 mM, pH 5,0. Finalmente, se comprobó la pureza mediante SDS-PAGE y solo se encontró una banda individual.

Ejemplo 8

Construcción y expresión de una variante dirigida de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*

[0236] Se realizaron dos reacciones de PCR con el plásmido XYZ1471-4, descrito en el ejemplo 7, usando los cebadores K79V F y K79V R que se muestran a continuación, que fueron diseñados para sustituir la lisina K en la posición 79 de la secuencia madura a valina (V) y los cebadores F-NP003940 y R-NP003940 mostrados a continuación, que se diseñaron basándose en la secuencia conocida y se agregaron marcadores para la clonación directa mediante la estrategia IN-FUSION™.

Cebador K79V F 18mer GCAGTCTTTCCAATTGAC (SEC ID N.º: 18)
 Cebador K79V R 18mer AATTGGAAAGACTGCCCCG (SEC ID N.º: 19)
 Cebador F-NP003940: 5' ACACAACCTGGGGATCCACCATGCGTCTCACTCTATTATC (SEC ID N.º: 20)
 Cebador R-NP003940: 5' AGATCTCGAGAAGCTTAAACTGCCACACGTCGTTGG (SEC ID N.º: 21)

[0237] La PCR se realizó utilizando un motor de ADN PTC-200 en las condiciones que se describen a continuación.

Sistema de reacción de PCR:	Condiciones:		
48,5 µl H ₂ O	1	94 °C	2 min
	2	94 °C	30 s
2 perlas de PCR TaRe Ready-To-Go (Amersham Biosciences)	3	55 °C	30 s
	4	72 °C	90 s
0,5 µl X 2100 pmol/µl Cebadores (K79V F + Cebador R-NP003940, K79V R + Cebador F-NP003940)	2-4	25 ciclos	
0,5 µl plantilla ADN	5	72 °C	10 min

[0238] Los fragmentos de ADN se recuperaron del gel de agarosa mediante el kit de extracción de gel de Qiagen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los dos fragmentos purificados resultantes se clonaron en un vector de expresión de *Aspergillus* linealizado con *Bam*HI y *Hind*III, utilizando un kit de clonación de PCR en seco IN-FUSION™ (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La construcción del vector linealizado se realiza como se describe en WO 2005/042735 A1.

[0239] La mezcla de ligadura se usó para transformar células de *E. coli* DH5α (TOYOBO). Las colonias seleccionadas se inocularon en 3 ml de medio LB suplementado con 50 µg de ampicilina por ml y se incubaron a 37 °C a 225 rpm durante la noche. El ADN plasmídico de las colonias seleccionadas se purificó usando el mini kit de plásmido Qiagen (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuencia del gen variante dirigida de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se comprobó antes de la expresión heteróloga y se seleccionó uno de los plásmidos para expresión adicional, y se denominó pPoPE001.

[0240] Se prepararon protoplastos de *Aspergillus niger* MBin118 como se describe en WO 95/02043. Se mezclaron cien µl de suspensión de protoplastos con 2,5 µg del plásmido pPoPE001 y se añadieron y mezclaron suavemente 250 microlitros de PEG 4000 al 60 % (Applichem) (polietilenglicol, peso molecular 4000), CaCl₂ 10 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. La mezcla se incubó a 37 °C durante 30 minutos y los protoplastos se mezclaron

con agarosa L al 1 % (gen Nippon) en sacarosa de COVE (Cove, 1996, Biochim. Biophys Acta 133: 51-56) (1 M) suplementada con acetamida 10 mM y CsCl 15 mM y añadida como capa superior en placas de sacarosa de COVE (1 M) suplementadas con acetamida 10 mM y CsCl 15 mM para la selección de transformantes (4 ml de agar superior por placa). Después de la incubación durante 5 días a 37 °C, se recogieron esporas de dieciséis transformantes y se sembraron en 750 µl YP-2 % de medio de Maltosa en placas MT de 96 pocillos. Después de 5 días de cultivo estacionario a 30 °C, se analizaron 10 µl del caldo de cultivo de cada pocillo en un gel SDS-PAGE para identificar los mejores transformantes en función de la capacidad de producir una gran cantidad de glucoamilasa.

10 **Ejemplo 9**

Purificación de la variante dirigida de Po AMG PE001

15 [0241] El transformante seleccionado de la variante y la cepa que expresa la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* de tipo salvaje descrita en el ejemplo 6 se cultivó en 100 ml de medio YP- 2% de maltosa y el cultivo se filtró a través de un filtro PES de 0,22 µm, y se aplicó en una columna de gel de afinidad de alfa-ciclodextrina previamente equilibrada en NaOAc 50 mM, NaCl 150 mM, tampón pH 4,5. Los materiales no unidos se retiraron de la columna lavando con tampón de equilibrado y la glucoamilasa se eluyó usando el mismo tampón que contenía beta-ciclodextrina 10 mM en 3 volúmenes de columna.

20 [0242] Se comprobó la actividad de glucoamilasa del eluyente para ver si la glucoamilasa se había unido al gel de afinidad de alfa-ciclodextrina. Las muestras de glucoamilasa purificadas se dializaron luego contra NaOAc 20 mM, pH 5,0.

25 **Ejemplo 10**

Caracterización de la estabilidad de la proteasa PE001

30 [0243] Se mezclaron 40 µl de soluciones enzimáticas (1 mg/ml) en tampón de acetato de sodio 50 mM, pH 4,5, con 1/10 de volumen de soluciones de proteasa de 1 mg/ml como la aspergillopepsina I descrita en Biochem J. 1975 Apr; 147 (1): 45-53, o el producto comercialmente disponible en Sigma y aorsin descrito en Ichishima, Biochemical journal [0264-6021] año: 2003 vol: 371 (2) pg: 541 e incubado a 4 o 32 °C durante la noche. Como experimento de control, H₂O se añadió a la muestra en lugar de proteasas. Las muestras se cargaron en SDS-PAGE para ver si las proteasas dividen las glucoamilasas.

35 [0244] En SDS-PAGE, PE001 solo mostró una banda correspondiente a la molécula intacta, mientras que la glucoamilasa de tipo salvaje fue degradada por las proteasas y mostró una banda de menor tamaño molecular a 60 kCa.

40 TABLA 11 El resultado de SDS-PAGE después del tratamiento con proteasa

Proteasa	Glucoamilasa de tipo salvaje				PE001				Control
	aspergillopepsina I		aorsin		aspergillopepsina I		aorsin		
Temperatura de incubación (°C)	4	32	4	32	4	32	4	32	4
glucoamilasa intacta (aprox. 70 kDa)	100 %	90 %	40 %	10 %	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
glucoamilasa dividida (aprox. 60 kDa)	ND	10 %	60 %	90 %	ND	ND	ND	ND	ND

N.D.: no detectado.

Ejemplo 11

Menos escisión durante el cultivo

45 [0245] El transformante de *Aspergillus* de la variante y la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* de tipo salvaje se cultivó en placas MT de 6 pocillos que contenían un medio YP- 2% de maltosa diluida 4X suplementado con tampón de acetato de sodio 10 mM, pH 4,5, a 32 °C durante 1 semana.

50 [0246] Los sobrenadantes de cultivo se cargaron en SDS-PAGE.

TABLA 12 El resultado de SDS-PAGE de los sobrenadantes de cultivo

	Glucoamilasa de tipo salvaje	PE001
glucoamilasa intacta (aprox. 70 kDa)	90 %	100 %

glucoamilasa dividida (aprox. 60 kDa)	10 %	ND
N.D.: no detectado.		

[0247] La glucoamilasa de tipo salvaje fue dividida por las proteasas del huésped durante la fermentación, mientras que la variante produjo solo una molécula intacta.

5 Ejemplo 12

Actividad de glucoamilasa de la variante en comparación con la progenitora

10 [0248] La actividad de la glucoamilasa medida como AGU como se ha descrito anteriormente se comprobó para controlar las enzimas purificadas de tipo salvaje de *Penicillium oxalicum* y la variante de glucoamilasa.

15 [0249] La unidad de glucoamilasa (AGU) se definió como la cantidad de enzima que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto en condiciones estándar (37 °C, pH 4,3, sustrato: maltosa 100 mM, tampón: acetato 0,1 M, tiempo de reacción 6 minutos).

Tabla 13

Actividad específica relativa	AGU/mg
<i>Penicillium oxalicum</i> ts	100 %
<i>Penicillium oxalicum</i> PE001 (SEC ID N.º: 14 + sustitución K79V)	102 %

Ejemplo 13

20 Purificación de variantes de glucoamilasa que tienen termoestabilidad incrementada

25 [0250] Las variantes que muestran una mayor termoestabilidad pueden construirse y expresarse de manera similar al procedimiento descrito en el ejemplo 8. Todas las variantes se derivaron de la PE001. Después de la expresión en medio YPM, las variantes que comprenden las sustituciones T65A o Q327F se micropurificaron de la siguiente manera:

30 El micelio se eliminó por filtración a través de un filtro de 0,22 µm. Se agregaron 50 µl de material de columna (alfa-ciclodextrina acoplada al medio de agarosa activado por divinilsulfona Mini-Leak según las recomendaciones del fabricante) a los pocillos de una placa de filtro (Whatman, Unifilter 800 µl, 25-30 µm MBPP). El material de la columna se equilibró con tampón de unión (acetato de sodio 200 mM, pH 4,5) añadiendo dos veces 200 µl de tampón, agitando intensamente durante 10 min (Heidolph, Titramax 101, 1000 rpm) y eliminando el tampón mediante vacío (Whatman, UniVac 3). Posteriormente, se añadieron 400 µl de sobrenadante de cultivo y 100 µl de tampón de unión y la placa se incubó 30 minutos con agitación intensa. El material no unido se eliminó por vacío y se repitió el paso de unión. Normalmente se utilizaron 4 pozos por variante. Luego se realizaron tres pasos de lavado añadiendo 200 µl de tampón de concentración iónica decreciente (acetato de sodio 50/10/5 mM, pH 4,5), agitando durante 15 minutos y eliminando el tampón mediante vacío. La elución del AMG unido se logró añadiendo dos veces 100 µl de tampón de elución (acetato de sodio 250 mM, alfa-ciclodextrina al 0,1 %, pH 6,0), agitando durante 15 minutos y recogiendo el material eluido en una placa de microtitulación mediante vacío. Los eluidos agrupados se concentraron y el tampón se cambió a acetato de sodio 50 mM pH 4,5 usando unidades de filtro centrífugo con un corte de 10 kDa (Millipore Microcon Ultracel YM-10). Las muestras micropurificadas se almacenaron a -18 °C hasta la prueba de termoestabilidad.

Ejemplo 14

45 Análisis de despliegue térmico de proteínas (TSA, ensayo de cambio térmico).

50 [0251] El despliegue térmico de proteínas de las variantes T65A y Q327F se monitorizó utilizando Sypro Orange (In-Vitrogen, S-6650) y se realizó utilizando un instrumento de PCR en tiempo real (Applied Biosystems; Step-One-Plus).

55 [0252] En una placa de 96 pocillos, se mezcló una muestra micropurificada de 25 microlitros en acetato 50 mM pH4,5 a aprox. 100 microgramos/ml (5: 1) con Sypro Orange (concentración resultante = 5X; solución madre del proveedor = 5000X). La placa se selló con un sello óptico de PCR. El instrumento de PCR se ajustó a una velocidad de exploración de 76 °C p. h., comenzando a 25 °C y terminando a 96 °C.

[0253] El despliegue térmico de proteínas de la variante E501V + Y504T se monitorizó usando Sypro Orange (In-Vitrogen, S-6650) y se realizó con un instrumento de PCR en tiempo real (Applied Biosystems; Step-One-Plus).

60 [0254] En una placa de 96 pocillos, se mezcló una muestra purificada de 15 microlitros en acetato 50 mM pH4,5 a aprox. 50 microgramos/ml (1: 1) con Sypro Orange (concentración resultante = 5X; solución madre del proveedor = 5000X) con o sin 200 ppm de Acarbosa (Sigma A8980). La placa se selló con un sello óptico de

PCR. El instrumento de PCR se ajustó a una velocidad de exploración de 76 °C p. h., comenzando a 25 °C y terminando a 96 °C.

5 [0255] La fluorescencia se monitorizó cada 20 segundos usando luz LED azul incorporada para la excitación y filtro ROX (610 nm, emisión).

[0256] Los valores de T_m se calcularon como el valor máximo de la primera derivada (dF/dK) (ref .: Gregory et al.; J Biomol Screen 2009 14: 700.)

10

Tabla 14a.

Muestra	T _m (Grad. Celsius) +/- 0,4
PO-AMG (PE001)	80,3
Variante Q327F	82,3
Variante T65A	81,9

Tabla 14b.

Muestra	T _m (Grad. Celsius) +/- 0,4	
Acarbosa:	-	+
PO-AMG (PE001)	79,5	86,9
Variante E501V Y504T	79,5	95,2

Ejemplo 15

15

Análisis de termoestabilidad por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

20 [0257] Las variantes específicas del sitio adicionales que tienen sustituciones y/o deleciones en posiciones específicas se construyeron básicamente como se describe en el ejemplo 8 y se purificaron como se describe en el ejemplo 11.

25 [0258] La termoestabilidad de las variantes derivadas de Po-AMG PE001 purificadas se determinó a pH 4,0 o 4,8 (acetato de sodio 50 mM) mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un calorímetro de barrido diferencial con capilar VP (MicroCal Inc., Piscataway, NJ, EE. UU.) . La temperatura de desnaturalización térmica, T_d (°C), se tomó como la parte superior del pico de desnaturalización (pico endotérmico principal) en los termogramas (C_p vs. T) obtenidos después de calentar las soluciones enzimáticas en tampones seleccionados (acetato de sodio 50 mM, pH 4,0 o 4,8) a una velocidad de calentamiento programada constante de 200 K/h.

30 [0259] Las soluciones de muestra y de referencia (aproximadamente 0,3 ml) se cargaron en el calorímetro (referencia: tampón sin enzima) desde las condiciones de almacenamiento a 10 °C y se preequilibraron térmicamente durante 10 minutos a 20 °C antes del escaneo de DSC desde 20 °C hasta 110 °C. Las temperaturas de desnaturalización se determinaron con una precisión de aproximadamente +/- 1 °C.

35 [0260] Las variantes aisladas y los datos de DSC se describen en la tabla 15 a continuación.

Tabla 15.

Nombre Po-AMG	Mutaciones	DSC T _d (°C) @ pH 4,0	DSC T _d (°C) @ pH 4,8
PE001 (SEC ID N.º: 14 + K79V)		82,1	83,4
GA167	E501V Y504T	82,1	
GA481	T65A K161S	84,1	86,0
GA487	T65A Q405T	83,2	
GA490	T65A Q327W	87,3	
GA491	T65A Q327F	87,7	
GA492	T65A Q327Y	87,3	
GA493	P11F T65A Q327F	87,8	88,5
GA497	R1K D3W K5Q G7V N8S T10K P11S T65A Q327F	87,8	88,0
GA498	P2N P4S P11F T65A Q327F	88,3	88,4
GA003	P11F D26C K33C T65A Q327F	83,3	84,0
GA009	P2N P4S P11F T65A Q327W E501V Y504T	88,8	
GA002	R1E D3N P4G G6R G7A N8A T10D P11D T65A Q327F	87,5	88,2
GA005	P11F T65A Q327W	87,4	88,0
GA008	P2N P4S P11F T65A Q327F E501V Y504T	89,4	90,2

ES 2 749 652 T3

GA010	P11F T65A Q327W E501V Y504T	89,7
GA507	T65A Q327F E501V Y504T	89,3
GA513	T65A S105P Q327W	87,0
GA514	T65A S105P Q327F	87,4
GA515	T65A Q327W S364P	87,8
GA516	T65A Q327F S364P	88,0
GA517	T65A S103N Q327F	88,9
GA022	P2N P4S P11F K34Y T65A Q327F	89,7
GA023	P2N P4S P11F T65A Q327F D445N V447S	89,9
GA032	P2N P4S P11F T65A I172V Q327F	88,7
GA049	P2N P4S P11F T65A Q327F N502*	88,4
GA055	P2N P4S P11F T65A Q327F N502T P563S K571E	88,0
GA057	P2N P4S P11F R31S K33V T65A Q327F N564D K571S	89,5
GA058	P2N P4S P11F T65A Q327F S377T	88,6
GA064	P2N P4S P11F T65A V325T Q327W	88,0
GA068	P2N P4S P11F T65A Q327F D445N V447S E501V Y504T	90,2
GA069	P2N P4S P11F T65A I172V Q327F E501V Y504T	90,2
GA073	P2N P4S P11F T65A Q327F S377T E501V Y504T	90,1
GA074	P2N P4S P11F D26N K34Y T65A Q327F	89,1
GA076	P2N P4S P11F T65A Q327F I375A E501V Y504T	90,2
GA079	P2N P4S P11F T65A K218A K221D Q327F E501V Y504T	90,9
GA085	P2N P4S P11F T65A S103N Q327F E501V Y504T	91,3
GA086	P2N P4S T10D T65A Q327F E501V Y504T	90,4
GA088	P2N P4S F12Y T65A Q327F E501V Y504T	90,4
GA097	K5A P11F T65A Q327F E501V Y504T	90,0
GA101	P2N P4S T10E E18N T65A Q327F E501V Y504T	89,9
GA102	P2N T10E E18N T65A Q327F E501V Y504T	89,8
GA084	P2N P4S P11F T65A Q327F E501V Y504T T568N	90,5
GA108	P2N P4S P11F T65A Q327F E501V Y504T K524T G526A	88,6
GA126	P2N P4S P11F K34Y T65A Q327F D445N V447S E501V Y504T	91,8
GA129	P2N P4S P11F R31S K33V T65A Q327F D445N V447S E501V Y504T	91,7
GA087	P2N P4S P11F D26N K34Y T65A Q327F E501V Y504T	89,8
GA091	P2N P4S P11F T65A F80 * Q327F E501V Y504T	89,9
GA100	P2N P4S P11F T65A K112S Q327F E501V Y504T	89,8
GA107	P2N P4S P11F T65A Q327F E501V Y504T T516P K524T G526A	90,3
GA110	P2N P4S P11F T65A Q327F E501V N502T Y504*	90,6

Ejemplo 16

Análisis de termoestabilidad mediante prueba de estrés térmico y ensayo de pNPG

5

[Q261] Partiendo de una de las variantes de sustitución identificadas del ejemplo 15, identificadas como GA008, se probaron variantes adicionales mediante un ensayo de estrés térmico en el que se analizó la actividad de glucoamilasa (AMG) del sobrenadante de cultivos de crecimiento después de un choque térmico a 83 °C durante 5 minutos.

[0262] Después del choque térmico, se midió la actividad residual de la variante, así como de una muestra sin estrés.

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

[0263] El ensayo de actividad de pNPG de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* es un ensayo de punto final espectrométrico en el que las muestras se dividen en dos y se miden con estrés térmico y sin estrés térmico. La salida de datos es, por lo tanto, una medida de la actividad residual en las muestras con estrés.

10

Crecimiento:

[0264] Se añadió una placa de microtitulación esterilizada (MTP) a cada pocillo 200 µl de medio de crecimiento enriquecido (FT X-14 sin Dowfax). Las cepas de interés se inocularon por triplicado directamente de las reservas congeladas hasta la MTP. El punto de referencia se inoculó en 20 pozos. Los pocillos no inoculados con medio se usaron como blancos de ensayo. El MTP se colocó en una caja de plástico que contenía tejido húmedo para evitar la evaporación desde los pocillos durante la incubación. La caja de plástico se colocó a 34 °C durante 4 días.

15

20 Ensayo:

[0265] Se transfirieron 50 µl de sobrenadante a 50 µl de NaAc 0,5 M a pH 4,8 para obtener el pH de muestra correcto.

25

[0266] La dilución de 50 µl se transfirió a una placa de PCR y se sometió a estrés térmico a 83 °C durante 5 minutos en una máquina de PCR. La mitad restante de la dilución se mantuvo a temperatura ambiente.

[0267] Se transfirieron 20 µl de muestras con estrés y sin estrés a una MTP estándar. Se añadieron 20 µl de sustrato pNPG para comenzar la reacción. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora.

30

[0268] La reacción se detuvo y el color se desarrolló mediante la adición de 50 µl de Na₂CO₃ 0,5 M. El color amarillo se midió en un lector de placas (Molecular Devices) a 405 nm.
Tampones:

35

[0269]

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

40

[0270] Sustrato, pNPG 6 mM:
15 mg de 4-nitrofenil D-glucopiranosido en 10 ml 0,25 NaAc pH 4,8

[0271] Solución de parada/desarrollo:
Na₂CO₃ 0,5 M

45

Tratamiento de datos:

[0272] En Excel, los datos brutos de Abs405 de muestras con estrés y sin estrés se restaron en blanco con sus respectivos espacios en blanco. La actividad residual (% act. res. = (Abs_{sin estrés} - (Abs_{sin estrés} - Abs_{con estrés}))/Abs_{sin estrés} * 100 %) se calculó y trazó en relación con el punto de referencia, Po-amg0008.

50

Tabla 16

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

Tabla 17

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

Ejemplo 17

5

Prueba de actividad de glucoamilasa de variantes termoestables según a la invención

[0273] Todas las variantes descritas anteriormente mostradas en las tablas 15, 16 y 17 se han comprobado para obtener la actividad de glucoamilasa en sobrenadantes de cultivo usando el ensayo de pNPG descrito en el ejemplo 16.

10

Ejemplo 18

15

Producción de etanol utilizando alfa-amilasa A (AAA), proteasa 196 y glucoamilasa 493 (GA493) para la licuefacción y glucoamilasa BL3 (BL3) y composición celulolítica A (CCA) para la fermentación

Licuefacción (Labomat)

20

[0274] Cada licuefacción recibió maíz molido (86,3 % DS), backset (7,2% DS) y agua corriente con un objetivo de peso total de 150 g con un 32,50 % de sólidos secos (DS). El backset se mezcló al 30 % p/p del peso total de la suspensión. El pH inicial de la suspensión era de 5,2 y, por lo tanto, no se ajustó antes de la licuefacción. Todas las enzimas se agregaron de acuerdo con la siguiente tabla.

	Alfa-amilasa A	Proteasa 196	Glucoamilasa GA493
Maceración #1	0,02 % p/p maíz tal cual	ninguna	ninguna
Maceración #2	0,02 % p/p maíz tal cual	0,001 JTPU/g DS	6 mcg/g DS

25

[0275] La licuefacción tuvo lugar en un Labomat usando las siguientes condiciones: 5 °C/min. Incremento, incremento de 17 minutos, tiempo de retención de 103 minutos a 85 °C, 40 rpm para todo el ciclo, recipientes de acero inoxidable de 200 ml. Después de la licuefacción, todos los recipientes se enfriaron en un baño de hielo y se prepararon para la fermentación según el protocolo que se detalla a continuación en SSF.

30

Sacarificación y fermentación simultáneas (SSF)

35

[0276] Dos maceraciones anteriores se ajustaron a pH 5,0 con hidróxido de sodio al 50 % p/p o ácido sulfúrico al 40 % v/v. Se aplicó penicilina a cada maceración hasta una concentración total de 3 ppm, y se añadió urea a cada maceración como fuente de nitrógeno hasta una concentración final de 1000 ppm. Los tubos se prepararon con maceraciones dividiendo en alícuotas aproximadamente 4,5 g de maceración por tubo de ensayo perforado previamente de 15 ml para permitir la liberación CO₂. Se dosificaron la glucoamilasa Spirizyme Excel de Novozymes y la celulasa Celluclast en los tubos de acuerdo con la siguiente tabla:

Tratamiento #	Maceración	Glucoamilasa	Dosis AMG AGU/g DS	Composición celulolítica (CC)	Dosis de celulasa mg EP/g DS
1	Maceración #1	BL3	0,60	-	-
2	Maceración #1	BL3	0,60	A	0,10
3	Maceración #2	BL3	0,60	-	-
4	Maceración #2	BL3	0,60	A	0,10

[0277] Se añadió agua destilada a cada tubo en el volumen apropiado para mantener los sólidos a la misma concentración en todos los tubos. Todos los tratamientos se realizaron en cinco réplicas. Después de la dosificación de la enzima, cada tubo recibió 100 µl de levadura rehidratada. La levadura rehidratada se preparó mezclando 5,5 g de Fermentis RED STAR en 100 ml de agua corriente e incubando a 32 °C durante aproximadamente 30 minutos. Todos los tubos se agitaron y luego se incubaron en un baño de agua a 32 °C durante 52 horas en el proceso de SSF.

[0278] El muestreo de fermentación tuvo lugar después de 52 horas de fermentación. Cada muestra se desactivó con 50 µl de H₂SO₄ al 40 % v/v, agitando, centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos y filtrando a través de un filtro Whatman PP de 0,45 µm. Todas las muestras se analizaron mediante HPLC.

Resultados:

[0279]

Tratamiento	Etanol (g/l)	Dev. est.	CV
AAA + BL3	124,48	0,0257	0,21 %
AAA + BL3 + CCA	125,21	0,0358	0,29 %
AAA + Proteasa196 + GA493 + BL3	125,16	0,0317	0,25 %
AAA + Proteasa196 + GA493 + BL3 + CCA	125,43	0,0495	0,39 %

[0280] Con la adición de la composición celulolítica A (CCA) en el proceso de SSF, hubo un aumento de rendimiento del etanol de 0,73 g/l de la maceración de maíz licuado por alfa-amilasa A (AAA). Al añadir proteasa196 y glucoamilasa 493 (GA493) junto con alfa-amilasa A en la licuefacción, y añadiendo la composición Celulolítica A (CCA) en SSF, el rendimiento total del etanol aumentó en 1 g/l.

Ejemplo 19

Producción de etanol utilizando alfa-amilasa A o alfa-amilasa AA369, proteasa Pfu2 y glucoamilasa 498 (GA498) para la licuefacción, y glucoamilasa BL4 con composición celulolítica A o B (CCA o CCB) para la fermentación

Licuefacción (Labomat)

[0281] Cada licuefacción recibió maíz molido (86,3 % DS), backset (7,2% DS) y agua corriente con un objetivo de peso total de 375 g con un 32,50 % de sólidos secos (DS). El backset se mezcló al 30 % p/p del peso total de la suspensión. El pH inicial de la suspensión se ajustó antes de la licuefacción. Todas las enzimas se agregaron de acuerdo con la siguiente tabla.

	Aamilasa y dosis	Proteasa y dosis	Glucoamilasa y dosis
Maceración #1 pH 5,8	LSCDS 0,024 % p/p maíz tal cual	ninguna	ninguna
Maceración #2 pH 5,2	AA369 2,14 µg/g DS	PFU2 0,0385 µg/g DS	GA498 4,5 µg/g DS

[0282] La licuefacción tuvo lugar en un Labomat usando las siguientes condiciones: en recipientes de acero inoxidable de 200 ml, aumentar la temperatura en 5 °C/min hasta 80 °C; mantener 2 min, luego 2 °C/min hasta 85 °C; mantener a 85 °C durante 103 min. Después de la licuefacción, todas las maceraciones se almacenaron congeladas hasta que se prepararon para la fermentación según el protocolo que se detalla a continuación en SSF.

Sacarificación y fermentación simultáneas (SSF)

[0283] Cada maceración anterior se ajustó a pH 5,0 con hidróxido de sodio al 50 % p/p o ácido sulfúrico al 40 % v/v. Se aplicó penicilina a cada maceración hasta una concentración total de 3 ppm, y se añadió urea a cada maceración como fuente de nitrógeno hasta una concentración final de 800 ppm. El contenido de sólidos de ambas maceraciones se ajustó al 30 % mediante la adición de agua. Los tubos se prepararon con maceraciones dividiendo en alícuotas aproximadamente 4,5 g de maceración por tubo de ensayo perforado previamente de 15 ml para permitir la liberación CO₂. La glucoamilasa BL4 y las composiciones celulolíticas CCA o CCB se dosificaron en los tubos de acuerdo con la siguiente tabla:

Tratamiento #	Maceración	Glucoamilasa	Dosis AMG AGU/g DS	Composición celulolítica (CC)	Dosis de celulosa mg EP/g DS
---------------	------------	--------------	--------------------	-------------------------------	------------------------------

ES 2 749 652 T3

1	Maceración #1	BL4	0,60	ninguna	0
2	Maceración #1	BL4	0,60	CCB	0,05
3	Maceración #1	BL4	0,60	CCB	0,15
4	Maceración #1	BL4	0,60	CCB	0,3
5	Maceración #1	BL4	0,60	CCA	0,05
6	Maceración #1	BL4	0,60	CCA	0,15
7	Maceración #1	BL4	0,60	CCA	0,3
8	Maceración #2	BL4	0,60	ninguna	0
9	Maceración #2	BL4	0,60	CCB	0,05
10	Maceración #2	BL4	0,60	CCB	0,15
11	Maceración #2	BL4	0,60	CCB	0,3
12	Maceración #2	BL4	0,60	CCA	0,05
13	Maceración #2	BL4	0,60	CCA	0,15
14	Maceración #2	BL4	0,60	CCA	0,3

5 [0284] Se añadió agua destilada a cada tubo en el volumen apropiado para mantener los sólidos a la misma concentración en todos los tubos. Todos los tratamientos se realizaron en cinco réplicas. Después de la dosificación de la enzima, cada tubo recibió 100 µl de levadura rehidratada. La levadura rehidratada se preparó mezclando 5,5 g de Fermentis RED STAR en 100 ml de agua corriente y se incubó a 32 °C durante aproximadamente 30 minutos. Todos los tubos se agitaron y luego se incubaron en un baño de agua a 32 °C durante 51 horas en el proceso de SSF.

10 [0285] El muestreo de fermentación tuvo lugar después de 51 horas de fermentación. Cada muestra se desactivó con 50 µl de H₂SO₄ al 40 % v/v, agitando, centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos y filtrando a través de un filtro Whatman PP de 0,45 µm. Todas las muestras se analizaron mediante HPLC.

Resultados:

15 [0286]

Tratamiento	Etanol (g/l)	Dev. est.	CV
AAA + BL4	114,99	0,67	0,58 %
AAA + BL4 + CCB 0,05	116,08	0,87	0,75 %
AAA + BL4 + CCB 0,15	117,17	0,86	0,73 %
AAA + BL4 + CCB 0,3	117,61	0,92	0,78 %
AAA + BL4 + CCA 0,05	115,53	0,76	0,65 %
AAA + BL4 + CCA 0,15	115,46	0,92	0,79 %
AAA + BL4 + CCA 0,3	115,84	0,79	0,68 %
AA369 + GA498 + Pfu2 + BL4	115,51	0,68	0,59 %
AA369 + GA498 + Pfu2 + BL4 + CCB 0,05	116,70	0,64	0,55 %
AA369 + GA498 + Pfu2 + BL4 + CCB 0,15	117,31	0,86	0,73 %
AA369 + GA498 + Pfu2 + BL4 + CCB 0,3	118,74	0,72	0,61 %
AA369 + GA498 + Pfu2 + BL4 + CCA 0,05	116,90	0,36	0,31 %
AA369 + GA498 + Pfu2 + BL4 + CCA 0,15	117,38	0,88	0,75 %
AA369 + GA498 + Pfu2 + BL4 + CCA 0,3	116,99	0,27	0,23 %

20 [0287] Con la adición de la composición celulolítica A (CCA) en el proceso de SSF, hubo un aumento del rendimiento del etanol de hasta un 0,74 % en comparación con la maceración de maíz licuado por la alfa-amilasa A (AAA) sin composición celulolítica añadida en la fermentación. Con la composición celulolítica B (CCB) en la misma maceración, hubo un aumento del rendimiento del etanol de hasta el 2,28 %.

[0288] Al añadir proteasa Pfu2 y glucoamilasa 498 (GA498) junto con alfa-amilasa 369 en la licuefacción, y añadiendo la composición Celulolítica A (CCA) en SSF, el rendimiento total del etanol aumentó hasta en un 1,62 % en comparación con la misma maceración sin agregar la composición celulolítica. Con la composición celulolítica B (CCB) en la misma maceración, hubo un aumento del rendimiento del etanol de hasta el 2,80 %.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0289]

10 <110> Novozymes A/S
 Deinhammer, Randy
 Craig, Joyce
 Matsui, Tomoko
 15 Takagi, Shinobu
 Clark, Suzanne
 Matthews, John
 Hjulmand, Anne Glud
 Soong, Chee-Leong
 20 Kang, Zhengfang

<120> Procesos para producir productos de fermentación

<130> 12572-WO-PCT

25 <160> 29

<170> versión de PatentIn 3.5

30 <210> 1
 <211> 515
 <212> PRT
 <213> Bacillus stearothermophilus

35 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(515)

40 <400> 1

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

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

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

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

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

Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala Gly Met

ES 2 749 652 T3

					85						90					95
5	Gln	Val	Tyr	Ala	Asp	Val	Val	Phe	Asp	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp	Gly
				100					105					110		
10	Thr	Glu	Trp	Val	Asp	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Ser	Asp	Arg	Asn	Gln
			115					120					125			
15	Glu	Ile	Ser	Gly	Thr	Tyr	Gln	Ile	Gln	Ala	Trp	Thr	Lys	Phe	Asp	Phe
		130					135					140				
20	Pro	Gly	Arg	Gly	Asn	Thr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp	Tyr	His
	145					150					155					160
25	Phe	Asp	Gly	Val	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Arg	Ile	Tyr
					165					170					175	
30	Lys	Phe	Arg	Gly	Ile	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Asp	Thr	Glu
				180					185					190		
35	Asn	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Leu	Asp	Met	Asp	His
			195					200					205			
40	Pro	Glu	Val	Val	Thr	Glu	Leu	Lys	Asn	Trp	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Asn
		210					215					220				
45	Thr	Thr	Asn	Ile	Asp	Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys
	225					230					235				240	
50	Phe	Ser	Phe	Phe	Pro	Asp	Trp	Leu	Ser	Tyr	Val	Arg	Ser	Gln	Thr	Gly
					245					250					255	
55	Lys	Pro	Leu	Phe	Thr	Val	Gly	Glu	Tyr	Trp	Ser	Tyr	Asp	Ile	Asn	Lys
				260					265					270		
60	Leu	His	Asn	Tyr	Ile	Thr	Lys	Thr	Asn	Gly	Thr	Met	Ser	Leu	Phe	Asp
			275				280						285			
65	Ala	Pro	Leu	His	Asn	Lys	Phe	Tyr	Thr	Ala	Ser	Lys	Ser	Gly	Gly	Ala
		290					295					300				
70	Phe	Asp	Met	Arg	Thr	Leu	Met	Thr	Asn	Thr	Leu	Met	Lys	Asp	Gln	Pro
	305					310					315				320	
75	Thr	Leu	Ala	Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Thr	Glu	Pro	Gly	Gln
					325					330					335	

ES 2 749 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Trp Pro
515

50 <210> 2
<211> 1068
<212> ADN
<213> Thermoascus aurantiacus

55 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(1065)

60 <220>

ES 2 749 652 T3

```

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

<220>
5 <221> misc_feature
<222> (58)..(534)

<220>
10 <221> mat_peptide
<222> (535)..(1068)

<400> 2
atg cgg ctc gtt gct tcc cta acg gcc ttg gtg gcc ttg tcc gta 45
Met Arg Leu Val Ala Ser Leu Thr Ala Leu Val Ala Leu Ser Val
15 -175 -170 -165

cct gtc ttt ccc gct gct gtc aac gtg aag cgt gct tcg tcc tac 90
Pro Val Phe Pro Ala Ala Val Asn Val Lys Arg Ala Ser Ser Tyr
20 -160 -155 -150

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

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

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

cgc gat ggg tct gaa gtg cag ttc gag ggc att ttg agc cgc tac aaa 273
Arg Asp Gly Ser Glu Val Gln Phe Glu Gly Ile Leu Ser Arg Tyr Lys
35 -100 -95 -90

tcg act ggc ctc tct cgt gac gcc ttt act tat ctg gct ccc gga gag 321
Ser Thr Gly Leu Ser Arg Asp Ala Phe Thr Tyr Leu Ala Pro Gly Glu
40 -85 -80 -75

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

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

gct aac agc act gat att gcc ggc tac atc tca tac tcg tct aat gtg 465
Ala Asn Ser Thr Asp Ile Ala Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Ser Asn Val
50 -35 -30 -25

ttg acc att gat gtc gat ggc gcc gct gct gcc act gtc tcc aag gca 513
Leu Thr Ile Asp Val Asp Gly Ala Ala Ala Thr Val Ser Lys Ala
55 -20 -15 -10

atc act cct ttg gac cgc cgc act agg atc agt tcc tgc tcc ggc agc 561
Ile Thr Pro Leu Asp Arg Arg Thr Arg Ile Ser Ser Cys Ser Gly Ser
60 -5 -1 1 5

aga cag agc gct ctt act acg gct ctc aga aac gct gct tct ctt gcc 609

```

ES 2 749 652 T3

	Arg	Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Thr	Ala	Leu	Arg	Asn	Ala	Ala	Ser	Leu	Ala	
	10					15					20					25	
5	aac	gca	gct	gcc	gac	gcg	gct	cag	tct	gga	tca	gct	tca	aag	ttc	agc	657
	Asn	Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Gln	Ser	Gly	Ser	Ala	Ser	Lys	Phe	Ser	
					30					35					40		
10	gag	tac	ttc	aag	act	act	tct	agc	tct	acc	cgc	cag	acc	gtg	gct	gcg	705
	Glu	Tyr	Phe	Lys	Thr	Thr	Ser	Ser	Ser	Thr	Arg	Gln	Thr	Val	Ala	Ala	
				45						50				55			
15	cgt	ctt	cgg	gct	gtt	gcg	cgg	gag	gca	tct	tcg	tct	tct	tcg	gga	gcc	753
	Arg	Leu	Arg	Ala	Val	Ala	Arg	Glu	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	
			60					65					70				
20	acc	acg	tac	tac	tgc	gac	gat	ccc	tac	ggc	tac	tgt	tcc	tcc	aac	gtc	801
	Thr	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Asp	Asp	Pro	Tyr	Gly	Tyr	Cys	Ser	Ser	Asn	Val	
		75					80					85					
25	ctg	gct	tac	acc	ctg	cct	tca	tac	aac	ata	atc	gcc	aac	tgt	gac	att	849
	Leu	Ala	Tyr	Thr	Leu	Pro	Ser	Tyr	Asn	Ile	Ile	Ala	Asn	Cys	Asp	Ile	
		90				95					100					105	
30	ttc	tat	act	tac	ctg	ccg	gct	ctg	acc	agt	acc	tgt	cac	gct	cag	gat	897
	Phe	Tyr	Thr	Tyr	Leu	Pro	Ala	Leu	Thr	Ser	Thr	Cys	His	Ala	Gln	Asp	
					110					115					120		
35	caa	gcg	acc	act	gcc	ctt	cac	gag	ttc	acc	cat	gcg	cct	ggc	gtc	tac	945
	Gln	Ala	Thr	Thr	Ala	Leu	His	Glu	Phe	Thr	His	Ala	Pro	Gly	Val	Tyr	
				125					130					135			
40	agc	cct	ggc	acg	gac	gac	ctg	gcg	tat	ggc	tac	cag	gct	gcg	atg	ggc	993
	Ser	Pro	Gly	Thr	Asp	Asp	Leu	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Gln	Ala	Ala	Met	Gly	
			140					145					150				
45	ctc	agc	agc	agc	cag	gct	gtc	atg	aac	gct	gac	acc	tac	gct	ctc	tat	1041
	Leu	Ser	Ser	Ser	Gln	Ala	Val	Met	Asn	Ala	Asp	Thr	Tyr	Ala	Leu	Tyr	
		155					160					165					
50	gcg	aat	gcc	ata	tac	ctt	ggt	tgc	taa								1068
	Ala	Asn	Ala	Ile	Tyr	Leu	Gly	Cys									
		170				175											
55	<210>	3															
	<211>	355															
	<212>	PRT															
	<213>	Thermoascus aurantiacus															
60	<400>	3															
	Met	Arg	Leu	Val	Ala	Ser	Leu	Thr	Ala	Leu	Val	Ala	Leu	Ser	Val		
				-175					-170					-165			
65	Pro	Val	Phe	Pro	Ala	Ala	Val	Asn	Val	Lys	Arg	Ala	Ser	Ser	Tyr		
				-160					-155					-150			
70	Leu	Glu	Ile	Thr	Leu	Ser	Gln	Val	Ser	Asn	Thr	Leu	Ile	Lys	Ala		
				-145					-140					-135			

ES 2 749 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 749 652 T3

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

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

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

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

Ala Asn Ala Ile Tyr Leu Gly Cys
 170 175

20

<210> 4
 <211> 49
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética

30 <400> 4
 aacgacggta cccggggatc ggatccatgc ggctcgttgc ttcctaac 49

<210> 5
 35 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 40 <223> Construcción Artificial

<400> 5
 ctaattacat gatgcggccc ttaattaatt agcaaccaag gtatatgg 48

45

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

50

<220>
 <223> Construcción Artificial

<400> 6
 55 taggagttta gtgaacttgc 20

<210> 7
 <211> 18
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

ES 2 749 652 T3

```

<220>
<223>  Construcción Artificial

5  <400>  7
    ttcgagcgtc ccaaaacc                                     18

<210>  8
10  <211>  1851
    <212>  ADN
    <213>  Penicillium oxalicum

15  <220>
    <221>  CDS
    <222>  (1)..(1851)

<400>  8
20  atg cgt ctc act cta tta tca ggt gta gcc ggc gtt ctc tgc gca gga                                     48
    Met Arg Leu Thr Leu Leu Ser Gly Val Ala Gly Val Leu Cys Ala Gly
    1          5          10          15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 749 652 T3

	165		170		175	
5	ata tcc cat ggt cag aaa tcg gat gtg tca cag gtc atg tgg ccg att Ile Ser His Gly Gln Lys Ser Asp Val Ser Gln Val Met Trp Pro Ile 180 185 190					576
10	att gcc aat gat cta gca tat gtt ggt caa tac tgg aat aat acc gga Ile Ala Asn Asp Leu Ala Tyr Val Gly Gln Tyr Trp Asn Asn Thr Gly 195 200 205					624
15	ttt gac ctg tgg gaa gag gtg gat ggg tca agc ttt ttc acg att gcg Phe Asp Leu Trp Glu Glu Val Asp Gly Ser Ser Phe Phe Thr Ile Ala 210 215 220					672
20	gtc cag cac cga gcc ctt gtt gaa ggc tcg caa ctg gcg aaa aag ctc Val Gln His Arg Ala Leu Val Glu Gly Ser Gln Leu Ala Lys Lys Leu 225 230 235 240					720
25	ggc aag tcc tgc gat gcc tgt gat tct cag cct ccc cag ata ttg tgt Gly Lys Ser Cys Asp Ala Cys Asp Ser Gln Pro Pro Gln Ile Leu Cys 245 250 255					768
30	ttc ctg cag agt ttc tgg aac gga aag tac atc acc tcc aac atc aac Phe Leu Gln Ser Phe Trp Asn Gly Lys Tyr Ile Thr Ser Asn Ile Asn 260 265 270					816
35	acg caa gca agc cgc tct ggt atc gac ctg gac tct gtc ctg gga agc Thr Gln Ala Ser Arg Ser Gly Ile Asp Leu Asp Ser Val Leu Gly Ser 275 280 285					864
40	att cat acc ttt gat ccc gaa gca gcc tgt gac gat gca act ttc cag Ile His Thr Phe Asp Pro Glu Ala Ala Cys Asp Asp Ala Thr Phe Gln 290 295 300					912
45	cct tgt tct gcc cgc gct ctg gcg aac cac aag gtc tat gtg gat tcc Pro Cys Ser Ala Arg Ala Leu Ala Asn His Lys Val Tyr Val Asp Ser 305 310 315 320					960
50	ttc cgc tct atc tac aag att aat gcg ggt ctt gca gag gga tcg gct Phe Arg Ser Ile Tyr Lys Ile Asn Ala Gly Leu Ala Glu Gly Ser Ala 325 330 335					1008
55	gcc aac gtt ggc cgc tac ccc gag gat gtt tac caa gga ggc aat cca Ala Asn Val Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Val Tyr Gln Gly Gly Asn Pro 340 345 350					1056
60	tgg tat ctc gcc acc cta ggc gca tct gaa ttg ctt tac gac gcc ttg Trp Tyr Leu Ala Thr Leu Gly Ala Ser Glu Leu Leu Tyr Asp Ala Leu 355 360 365					1104
65	tac cag tgg gac aga ctt ggc aaa ctt gaa gtc tcg gag acc tcg ttg Tyr Gln Trp Asp Arg Leu Gly Lys Leu Glu Val Ser Glu Thr Ser Leu 370 375 380					1152
70	tca ttc ttc aaa gac ttt gac gcg acc gtg aaa att ggc tcg tac tcg Ser Phe Phe Lys Asp Phe Asp Ala Thr Val Lys Ile Gly Ser Tyr Ser 385 390 395 400					1200
75	agg aac agc aag acc tac aag aaa ttg acc cag tcc atc aag tcg tac Arg Asn Ser Lys Thr Tyr Lys Lys Leu Thr Gln Ser Ile Lys Ser Tyr 405 410 415					1248

ES 2 749 652 T3

	gcg gac ggg ttc atc cag tta gtg cag cag tac act cct tct aat gga	1296
	Ala Asp Gly Phe Ile Gln Leu Val Gln Gln Tyr Thr Pro Ser Asn Gly	
	420 425 430	
5	tct ctg gcc gag caa tac gat cgc aat acg gct gct cct ctc tct gca	1344
	Ser Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Arg Asn Thr Ala Ala Pro Leu Ser Ala	
	435 440 445	
10	aac gat ctg act tgg tca ttt gcc tct ttc ttg acg gct acg caa cgc	1392
	Asn Asp Leu Thr Trp Ser Phe Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Gln Arg	
	450 455 460	
15	cgc gat gcc gtg gtt cct ccc tcc tgg ggc gca aag tcg gca aac aaa	1440
	Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Ser Trp Gly Ala Lys Ser Ala Asn Lys	
	465 470 475 480	
20	gtc cca acc act tgt tca gcc tcc cct gtt gtg ggt act tat aag gcg	1488
	Val Pro Thr Thr Cys Ser Ala Ser Pro Val Val Gly Thr Tyr Lys Ala	
	485 490 495	
25	ccc acg gca act ttc tca tcc aag act aag tgc gtc ccc gct aaa gat	1536
	Pro Thr Ala Thr Phe Ser Ser Lys Thr Lys Cys Val Pro Ala Lys Asp	
	500 505 510	
30	att gtg cct atc acg ttc tac ctg att gag aac act tac tat gga gag	1584
	Ile Val Pro Ile Thr Phe Tyr Leu Ile Glu Asn Thr Tyr Tyr Gly Glu	
	515 520 525	
35	aac gtc ttc atg agt ggc aac att act gcg ctg ggt aac tgg gac gcc	1632
	Asn Val Phe Met Ser Gly Asn Ile Thr Ala Leu Gly Asn Trp Asp Ala	
	530 535 540	
40	aag aaa ggc ttc cca ctc acc gca aac ctc tac acg caa gat caa aac	1680
	Lys Lys Gly Phe Pro Leu Thr Ala Asn Leu Tyr Thr Gln Asp Gln Asn	
	545 550 555 560	
45	ttg tgg ttc gcc agt gtc gag ttc atc cca gca ggc aca ccc ttt gag	1728
	Leu Trp Phe Ala Ser Val Glu Phe Ile Pro Ala Gly Thr Pro Phe Glu	
	565 570 575	
50	tac aag tac tac aag gtc gag ccc aat ggc gat att act tgg gag aag	1776
	Tyr Lys Tyr Tyr Lys Val Glu Pro Asn Gly Asp Ile Thr Trp Glu Lys	
	580 585 590	
55	ggt ccc aac cgg gtg ttc gtc gct ccc acg gga tgc cca gtt cag cct	1824
	Gly Pro Asn Arg Val Phe Val Ala Pro Thr Gly Cys Pro Val Gln Pro	
	595 600 605	
60	cac tcc aac gac gtg tgg cag ttt tga	1851
	His Ser Asn Asp Val Trp Gln Phe	
	610 615	
55	<210> 9	
	<211> 616	
	<212> PRT	
	<213> Penicillium oxalicum	
60	<400> 9	

ES 2 749 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys Ser Cys Asp Ala Cys Asp Ser Gln Pro Pro Gln Ile Leu Cys

ES 2 749 652 T3

				245						250							255
5	Phe	Leu	Gln	Ser	Phe	Trp	Asn	Gly	Lys	Tyr	Ile	Thr	Ser	Asn	Ile	Asn	
				260					265					270			
10	Thr	Gln	Ala	Ser	Arg	Ser	Gly	Ile	Asp	Leu	Asp	Ser	Val	Leu	Gly	Ser	
			275					280					285				
15	Ile	His	Thr	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Ala	Cys	Asp	Asp	Ala	Thr	Phe	Gln	
		290					295					300					
20	Pro	Cys	Ser	Ala	Arg	Ala	Leu	Ala	Asn	His	Lys	Val	Tyr	Val	Asp	Ser	
	305					310					315					320	
25	Phe	Arg	Ser	Ile	Tyr	Lys	Ile	Asn	Ala	Gly	Leu	Ala	Glu	Gly	Ser	Ala	
				325						330					335		
30	Ala	Asn	Val	Gly	Arg	Tyr	Pro	Glu	Asp	Val	Tyr	Gln	Gly	Gly	Asn	Pro	
				340					345					350			
35	Trp	Tyr	Leu	Ala	Thr	Leu	Gly	Ala	Ser	Glu	Leu	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu	
			355				360						365				
40	Tyr	Gln	Trp	Asp	Arg	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Leu	
		370					375					380					
45	Ser	Phe	Phe	Lys	Asp	Phe	Asp	Ala	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Ser	Tyr	Ser	
	385					390					395					400	
50	Arg	Asn	Ser	Lys	Thr	Tyr	Lys	Lys	Leu	Thr	Gln	Ser	Ile	Lys	Ser	Tyr	
				405						410					415		
55	Ala	Asp	Gly	Phe	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Gln	Tyr	Thr	Pro	Ser	Asn	Gly	
				420					425					430			
60	Ser	Leu	Ala	Glu	Gln	Tyr	Asp	Arg	Asn	Thr	Ala	Ala	Pro	Leu	Ser	Ala	
			435					440					445				
65	Asn	Asp	Leu	Thr	Trp	Ser	Phe	Ala	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Thr	Gln	Arg	
		450					455					460					
70	Arg	Asp	Ala	Val	Val	Pro	Pro	Ser	Trp	Gly	Ala	Lys	Ser	Ala	Asn	Lys	
	465					470					475					480	
75	Val	Pro	Thr	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Pro	Val	Val	Gly	Thr	Tyr	Lys	Ala	
					485					490					495		

ES 2 749 652 T3

5 Pro Thr Ala Thr Phe Ser Ser Lys Thr Lys Cys Val Pro Ala Lys Asp
 500 505 510
 Ile Val Pro Ile Thr Phe Tyr Leu Ile Glu Asn Thr Tyr Tyr Gly Glu
 515 520 525
 10 Asn Val Phe Met Ser Gly Asn Ile Thr Ala Leu Gly Asn Trp Asp Ala
 530 535 540
 15 Lys Lys Gly Phe Pro Leu Thr Ala Asn Leu Tyr Thr Gln Asp Gln Asn
 545 550 555 560
 20 Leu Trp Phe Ala Ser Val Glu Phe Ile Pro Ala Gly Thr Pro Phe Glu
 565 570 575
 25 Tyr Lys Tyr Tyr Lys Val Glu Pro Asn Gly Asp Ile Thr Trp Glu Lys
 580 585 590
 30 Gly Pro Asn Arg Val Phe Val Ala Pro Thr Gly Cys Pro Val Gln Pro
 595 600 605
 35 His Ser Asn Asp Val Trp Gln Phe
 610 615
 40 <210> 10
 <211> 4014
 <212> ADN
 <213> Thermococcus hydrothermalis
 45 <220>
 <221> misc_signal
 <222> (1)..(81)
 50 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (82)..(4014)
 <400> 10
 55 atg agg cgg gtg gtt gcc ctc ttc att gca att ttg atg ctt gga agc 48
 Met Arg Arg Val Val Ala Leu Phe Ile Ala Ile Leu Met Leu Gly Ser
 -25 -20 -15
 60 atc gtt gga gcg aac gtt aag agc gtt ggc gcg gcg gag ccg aag ccg 96
 Ile Val Gly Ala Asn Val Lys Ser Val Gly Ala Ala Glu Pro Lys Pro
 -10 -5 -1 1 5

ES 2 749 652 T3

	ctc aac gtc ata ata gtc tgg cac cag cac cag ccc tac tac tac gac	144
	Leu Asn Val Ile Ile Val Trp His Gln His Gln Pro Tyr Tyr Tyr Asp	
	10 15 20	
5	cct gtc cag gac gtc tac acc agg ccc tgg gtc agg ctc cac gcg gcg	192
	Pro Val Gln Asp Val Tyr Thr Arg Pro Trp Val Arg Leu His Ala Ala	
	25 30 35	
10	aac aac tac tgg aag atg gcc cac tac ctg agc cag tac ccg gag gtt	240
	Asn Asn Tyr Trp Lys Met Ala His Tyr Leu Ser Gln Tyr Pro Glu Val	
	40 45 50	
15	cac gcc acc att gac ctc tcg ggt tcg ctg ata gcc cag ctt gcc gac	288
	His Ala Thr Ile Asp Leu Ser Gly Ser Leu Ile Ala Gln Leu Ala Asp	
	55 60 65	
20	tac atg aac ggc aag aag gac acc tac cag ata atc acc gag aag ata	336
	Tyr Met Asn Gly Lys Lys Asp Thr Tyr Gln Ile Ile Thr Glu Lys Ile	
	70 75 80 85	
25	gcc aac ggg gaa ccc ctc acc gtc gac gag aag tgg ttc atg ctc cag	384
	Ala Asn Gly Glu Pro Leu Thr Val Asp Glu Lys Trp Phe Met Leu Gln	
	90 95 100	
30	gca ccg gga ggg ttc ttc gac aac acc atc ccc tgg aac ggt gaa ccg	432
	Ala Pro Gly Gly Phe Phe Asp Asn Thr Ile Pro Trp Asn Gly Glu Pro	
	105 110 115	
35	ata acc gac ccc aac ggc aac ccg ata agg gac ttc tgg gac cgc tac	480
	Ile Thr Asp Pro Asn Gly Asn Pro Ile Arg Asp Phe Trp Asp Arg Tyr	
	120 125 130	
40	acg gag ctg aag aac aag atg ctc agc gca aag gcc aag tac gca aac	528
	Thr Glu Leu Lys Asn Lys Met Leu Ser Ala Lys Ala Lys Tyr Ala Asn	
	135 140 145	
45	ttc gtg act gag agc cag aag gtc gct gtg acg aac gag ttc aca gag	576
	Phe Val Thr Glu Ser Gln Lys Val Ala Val Thr Asn Glu Phe Thr Glu	
	150 155 160 165	
50	cag gac tac ata gac cta gcg gtt ctc ttc aat ctc gct tgg att gac	624
	Gln Asp Tyr Ile Asp Leu Ala Val Leu Phe Asn Leu Ala Trp Ile Asp	
	170 175 180	
55	tac aat tac atc acg agc acg ccg gag ttc aag gcc ctc tac gac aag	672
	Tyr Asn Tyr Ile Thr Ser Thr Pro Glu Phe Lys Ala Leu Tyr Asp Lys	
	185 190 195	
60	gtt gac gag ggc ggc tat aca agg gcg gac gtc aaa acc gtt ctc gac	720
	Val Asp Glu Gly Gly Tyr Thr Arg Ala Asp Val Lys Thr Val Leu Asp	
	200 205 210	
65	gcc cag atc tgg ctt ctc aac cac acc ttc gag gag cac gag aag ata	768
	Ala Gln Ile Trp Leu Leu Asn His Thr Phe Glu Glu His Glu Lys Ile	
	215 220 225	
70	aac ctc ctc ctc gga aac ggc aac gtc gag gtc acg gtc gtt ccc tac	816
	Asn Leu Leu Leu Gly Asn Gly Asn Val Glu Val Thr Val Val Pro Tyr	
	230 235 240 245	
75	gcc cac ccg ata ggc ccg ata ctc aac gac ttc ggc tgg gac agc gac	864

ES 2 749 652 T3

	Ala	His	Pro	Ile	Gly	Pro	Ile	Leu	Asn	Asp	Phe	Gly	Trp	Asp	Ser	Asp	
					250					255					260		
5	ttc	aac	gac	cag	gtc	aag	aag	gcc	gac	gaa	ctg	tac	aag	ccg	tac	ctc	912
	Phe	Asn	Asp	Gln	Val	Lys	Lys	Ala	Asp	Glu	Leu	Tyr	Lys	Pro	Tyr	Leu	
				265				270						275			
10	ggc	ggc	ggc	acc	gcg	ggt	cca	aaa	ggc	gga	tgg	gcg	gct	gag	agc	gcc	960
	Gly	Gly	Gly	Thr	Ala	Val	Pro	Lys	Gly	Gly	Trp	Ala	Ala	Glu	Ser	Ala	
			280					285					290				
15	ctc	aac	gac	aaa	act	ctg	gag	atc	ctc	gcc	gag	aac	ggc	tgg	gag	tgg	1008
	Leu	Asn	Asp	Lys	Thr	Leu	Glu	Ile	Leu	Ala	Glu	Asn	Gly	Trp	Glu	Trp	
		295					300					305					
20	gtc	atg	acc	gac	cag	atg	ggt	ctc	gga	aag	ctc	ggc	att	gag	gga	acc	1056
	Val	Met	Thr	Asp	Gln	Met	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Gly	Ile	Glu	Gly	Thr	
		310				315					320					325	
25	gag	gag	aac	tac	cac	aag	ccc	tgg	gtg	gcc	gag	ttc	aac	gga	aag	aag	1104
	Val	Glu	Asn	Tyr	His	Lys	Pro	Trp	Val	Ala	Glu	Phe	Asn	Gly	Lys	Lys	
				330						335				340			
30	ata	tac	ctc	ttc	cca	aga	aat	cac	gat	cta	agt	gac	aga	ggt	ggc	ttt	1152
	Ile	Tyr	Leu	Phe	Pro	Arg	Asn	His	Asp	Leu	Ser	Asp	Arg	Val	Gly	Phe	
				345					350					355			
35	acc	tac	agc	gga	atg	aac	cag	cag	cag	gcc	ggt	gag	gac	ttc	gtc	aac	1200
	Thr	Tyr	Ser	Gly	Met	Asn	Gln	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Asp	Phe	Val	Asn	
			360					365					370				
40	gag	ctc	ctc	aag	ctc	cag	aag	cag	aac	tac	gat	ggc	tcg	ctg	ggt	tac	1248
	Glu	Leu	Leu	Lys	Leu	Gln	Lys	Gln	Asn	Tyr	Asp	Gly	Ser	Leu	Val	Tyr	
		375					380					385					
45	gtg	gtc	acg	ctc	gac	ggc	gag	aac	ccc	gtg	gag	aac	tac	ccc	tac	gac	1296
	Val	Val	Thr	Leu	Asp	Gly	Glu	Asn	Pro	Val	Glu	Asn	Tyr	Pro	Tyr	Asp	
					395				400							405	
50	ggg	gag	ctc	ttc	ctc	acc	gaa	ctc	tac	aag	aag	ctg	acc	gaa	ctc	cag	1344
	Gly	Glu	Leu	Phe	Leu	Thr	Glu	Leu	Tyr	Lys	Lys	Leu	Thr	Glu	Leu	Gln	
				410						415				420			
55	gag	cag	ggt	ctc	ata	aga	acc	ctc	acc	ccg	agc	gag	tac	atc	cag	ctc	1392
	Glu	Gln	Gly	Leu	Ile	Arg	Thr	Leu	Thr	Pro	Ser	Glu	Tyr	Ile	Gln	Leu	
				425				430						435			
60	tac	ggc	gac	aag	gcc	aac	aag	ctc	aca	cct	cgg	atg	atg	gag	cgc	ctt	1440
	Tyr	Gly	Asp	Lys	Ala	Asn	Lys	Leu	Thr	Pro	Arg	Met	Met	Glu	Arg	Leu	
			440					445						450			
65	gac	ctc	acc	gga	gac	aac	ggt	aac	gcc	ctc	ctc	aag	gcc	cag	agc	ctc	1488
	Asp	Leu	Thr	Gly	Asp	Asn	Val	Asn	Ala	Leu	Leu	Lys	Ala	Gln	Ser	Leu	
			455				460					465					
70	ggc	gaa	ctc	tac	gac	atg	acc	ggc	ggt	aag	gag	gag	atg	cag	tgg	ccc	1536
	Gly	Glu	Leu	Tyr	Asp	Met	Thr	Gly	Val	Lys	Glu	Glu	Met	Gln	Trp	Pro	
					475						480					485	
75	gag	agc	agc	tgg	ata	gac	gga	acc	ctc	tcc	acg	tgg	ata	ggc	gag	ccc	1584
	Glu	Ser	Ser	Trp	Ile	Asp	Gly	Thr	Leu	Ser	Thr	Trp	Ile	Gly	Glu	Pro	

ES 2 749 652 T3

	490	495	500	
5	cag gag aac tac ggc tgg tac tgg ctc tac atg gcc agg aag gcc ctt Gln Glu Asn Tyr Gly Trp Tyr Trp Leu Tyr Met Ala Arg Lys Ala Leu 505 510 515			1632
10	atg gag aac aag gat aaa atg agc cag gcg gac tgg gag aag gcc tac Met Glu Asn Lys Asp Lys Met Ser Gln Ala Asp Trp Glu Lys Ala Tyr 520 525 530			1680
15	gag tac ctg ctc cgc gcc gag gca agc gac tgg ttc tgg tgg tac gga Glu Tyr Leu Leu Arg Ala Glu Ala Ser Asp Trp Phe Trp Trp Tyr Gly 535 540 545			1728
20	agc gac cag gac agc ggc cag gac tac acc ttc gac cgc tac ctg aag Ser Asp Gln Asp Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Asp Arg Tyr Leu Lys 550 555 560 565			1776
25	acc tac ctc tac gag atg tac aag ctg gca gga gtc gag ccg ccg agc Thr Tyr Leu Tyr Glu Met Tyr Lys Leu Ala Gly Val Glu Pro Pro Ser 570 575 580			1824
30	tac ctc ttc ggc aac tac ttc ccg gac gga gag ccc tac acc acg agg Tyr Leu Phe Gly Asn Tyr Phe Pro Asp Gly Glu Pro Tyr Thr Thr Arg 585 590 595			1872
35	ggc ctg gtc gga ctc aag gac ggc gag atg aag aac ttc tcc agc atg Gly Leu Val Gly Leu Lys Asp Gly Glu Met Lys Asn Phe Ser Ser Met 600 605 610			1920
40	tcc ccg ctg gca aag ggc gtg agc gtc tat ttc gac ggc gag ggg ata Ser Pro Leu Ala Lys Gly Val Ser Val Tyr Phe Asp Gly Glu Gly Ile 615 620 625			1968
45	cac ttc ata gtg aaa ggg aac ctg gac agg ttc gag gtg agc atc tgg His Phe Ile Val Lys Gly Asn Leu Asp Arg Phe Glu Val Ser Ile Trp 630 635 640 645			2016
50	gag aag gat gag cgc gtt ggc aac acg ttc acc cgc ctc caa gag aag Glu Lys Asp Glu Arg Val Gly Asn Thr Phe Thr Arg Leu Gln Glu Lys 650 655 660			2064
55	ccg gac gag ttg agc tat ttc atg ttc cca ttc tca agg gac agc gtt Pro Asp Glu Leu Ser Tyr Phe Met Phe Pro Phe Ser Arg Asp Ser Val 665 670 675			2112
60	ggt ctc ctc ata acc aag cac gtc gtg tac gag aac gga aag gcc gag Gly Leu Leu Ile Thr Lys His Val Val Tyr Glu Asn Gly Lys Ala Glu 680 685 690			2160
65	ata tac ggc gcc acc gac tac gag aag agc gag aag ctt ggg gaa gcc Ile Tyr Gly Ala Thr Asp Tyr Glu Lys Ser Glu Lys Leu Gly Glu Ala 695 700 705			2208
70	acc gtc aag aac acg agc gaa gga atc gaa gtc gtc ctt ccc ttt gac Thr Val Lys Asn Thr Ser Glu Gly Ile Glu Val Val Leu Pro Phe Asp 710 715 720 725			2256
75	tac ata gaa aac ccc tcc gac ttc tac ttc gct gtc tcg acg gtc aaa Tyr Ile Glu Asn Pro Ser Asp Phe Tyr Phe Ala Val Ser Thr Val Lys 730 735 740			2304

ES 2 749 652 T3

	gat gga gac ctt gag gtg ata agc act cct gtg gag ctc aag ctc ccg	2352
	Asp Gly Asp Leu Glu Val Ile Ser Thr Pro Val Glu Leu Lys Leu Pro	
	745 750 755	
5	acc gag gtc aag gga gtc gtc ata gcc gat ata acc gac cca gaa ggc	2400
	Thr Glu Val Lys Gly Val Val Ile Ala Asp Ile Thr Asp Pro Glu Gly	
	760 765 770	
10	gac gac cat ggg ccc gga aac tac act tat ccc acg gac aag gtc ttc	2448
	Asp Asp His Gly Pro Gly Asn Tyr Thr Tyr Pro Thr Asp Lys Val Phe	
	775 780 785	
15	aag cca ggt gtt ttc gac ctc ctc cgc ttc agg atg ctc gaa cag acg	2496
	Lys Pro Gly Val Phe Asp Leu Leu Arg Phe Arg Met Leu Glu Gln Thr	
	790 795 800 805	
20	gag agc tac gtc atg gag ttc tac ttc aag gac cta ggt ggt aac ccg	2544
	Glu Ser Tyr Val Met Glu Phe Tyr Phe Lys Asp Leu Gly Gly Asn Pro	
	810 815 820	
25	tgg aac gga ccc aac ggc ttc agc ctc cag ata atc gag gtc tac ctc	2592
	Trp Asn Gly Pro Asn Gly Phe Ser Leu Gln Ile Ile Glu Val Tyr Leu	
	825 830 835	
30	gac ttc aag gac ggt gga aac agt tcg gcc att aag atg ttc ccc gac	2640
	Asp Phe Lys Asp Gly Gly Asn Ser Ser Ala Ile Lys Met Phe Pro Asp	
	840 845 850	
35	gga ccg gga gcc aac gtc aac ctc gac ccc gag cat cca tgg gac gtt	2688
	Gly Pro Gly Ala Asn Val Asn Leu Asp Pro Glu His Pro Trp Asp Val	
	855 860 865	
40	gac ttc aag gac ggt gga aac agt tcg gcc att aag atg ttc ccc gac	2736
	Ala Phe Arg Ile Ala Gly Trp Asp Tyr Gly Asn Leu Ile Ile Leu Pro	
	870 875 880 885	
45	aac gga acg gcc atc cag ggc gag atg cag att tcc gca gat ccg gtt	2784
	Asn Gly Thr Ala Ile Gln Gly Glu Met Gln Ile Ser Ala Asp Pro Val	
	890 895 900	
50	aag aac gcc ata ata gtc aag gtt cca aag aag tac atc gcc ata aac	2832
	Lys Asn Ala Ile Ile Val Lys Val Pro Lys Lys Tyr Ile Ala Ile Asn	
	905 910 915	
55	gag gac tac ggc ctc tgg gga gac gtc ctc gtc ggc tcg cag gac ggc	2880
	Glu Asp Tyr Gly Leu Trp Gly Asp Val Leu Val Gly Ser Gln Asp Gly	
	920 925 930	
60	tac ggc ccg gac aag tgg aga acg gcg gca gtg gat gcg gag cag tgg	2928
	Tyr Gly Pro Asp Lys Trp Arg Thr Ala Ala Val Asp Ala Glu Gln Trp	
	935 940 945	
65	aag ctt gga ggt gcg gac ccg cag gca gtc ata aac ggc gtg gcc ccg	2976
	Lys Leu Gly Gly Ala Asp Pro Gln Ala Val Ile Asn Gly Val Ala Pro	
	950 955 960 965	
70	cgc gtc att gat gag ctg gtt ccg cag ggc ttt gaa ccg acc cag gag	3024
	Arg Val Ile Asp Glu Leu Val Pro Gln Gly Phe Glu Pro Thr Gln Glu	
	970 975 980	

ES 2 749 652 T3

	gag cag ctg agc agc tac gat gca aac gac atg aag ctc gcc act gtc	3072
	Glu Gln Leu Ser Ser Tyr Asp Ala Asn Asp Met Lys Leu Ala Thr Val	
	985 990 995	
5	aag gcg ctg cta ctc ctc aag cag ggc atc gtt gtg acc gac ccg	3117
	Lys Ala Leu Leu Leu Leu Lys Gln Gly Ile Val Val Thr Asp Pro	
	1000 1005 1010	
10	gag gga gac gac cac ggg ccg gga acg tac acc tat ccg acg gac	3162
	Glu Gly Asp Asp His Gly Pro Gly Thr Tyr Thr Tyr Pro Thr Asp	
	1015 1020 1025	
15	aaa gtt ttc aag ccc ggt gtt ttc gac ctc ctc aag ttc aag gtg	3207
	Lys Val Phe Lys Pro Gly Val Phe Asp Leu Leu Lys Phe Lys Val	
	1030 1035 1040	
20	acc gag gga agc gac gac tgg acg ctg gag ttc cac ttc aaa gac	3252
	Thr Glu Gly Ser Asp Asp Trp Thr Leu Glu Phe His Phe Lys Asp	
	1045 1050 1055	
25	ctc ggt gga aac ccg tgg aac ggg ccg aac ggc ttc agc ctg cag	3297
	Leu Gly Gly Asn Pro Trp Asn Gly Pro Asn Gly Phe Ser Leu Gln	
	1060 1065 1070	
30	ata atc gag gta tac ttc gac ttc aag gag ggc ggg aac gtc tcg	3342
	Ile Ile Glu Val Tyr Phe Asp Phe Lys Glu Gly Gly Asn Val Ser	
	1075 1080 1085	
35	gcc att aag atg ttc ccg gat ggg ccc gga agc aac gtc cgt ctt	3387
	Ala Ile Lys Met Phe Pro Asp Gly Pro Gly Ser Asn Val Arg Leu	
	1090 1095 1100	
40	gat cca aat cac cca tgg gac ctg gcg ctt agg ata gcc ggc tgg	3432
	Asp Pro Asn His Pro Trp Asp Leu Ala Leu Arg Ile Ala Gly Trp	
	1105 1110 1115	
45	gac tac gga aac ctg ata att ctg ccc gac gga acc gcc tac caa	3477
	Asp Tyr Gly Asn Leu Ile Ile Leu Pro Asp Gly Thr Ala Tyr Gln	
	1120 1125 1130	
50	ggc gag atg cag att tcc gca gat ccg gtt aag aac gcc ata ata	3522
	Gly Glu Met Gln Ile Ser Ala Asp Pro Val Lys Asn Ala Ile Ile	
	1135 1140 1145	
55	gtc aag gtt cca aag aag tac ctg aac ata tcc gac tac gga ctc	3567
	Val Lys Val Pro Lys Lys Tyr Leu Asn Ile Ser Asp Tyr Gly Leu	
	1150 1155 1160	
60	tac acc gcc gtc atc gtg ggt tcc caa gac ggg tac ggc ccg gac	3612
	Tyr Thr Ala Val Ile Val Gly Ser Gln Asp Gly Tyr Gly Pro Asp	
	1165 1170 1175	
65	aag tgg agg ccc gtg gcc gct gag gcc gag cag tgg aag ctc gga	3657
	Lys Trp Arg Pro Val Ala Ala Glu Ala Glu Gln Trp Lys Leu Gly	
	1180 1185 1190	
70	ggc gca gac ccc cag gcg gtc ata gac aac ctc gta cca agg gtc	3702
	Gly Ala Asp Pro Gln Ala Val Ile Asp Asn Leu Val Pro Arg Val	
	1195 1200 1205	
75	gtt gat gaa ctc gtg ccg gag ggc ttc aag cca acg cag gag gag	3747

ES 2 749 652 T3

	Val Asp Glu	Leu Val Pro Glu Gly	Phe Lys Pro Thr Gln	Glu Glu	
	1210		1215	1220	
5	cag ctg agc	agc tac gac ctt gag	aag aag acc ctg gcg	acg gtg	3792
	Gln Leu Ser	Ser Tyr Asp Leu Glu	Lys Lys Thr Leu Ala	Thr Val	
	1225		1230	1235	
10	ctc atg gta	ccg ctc gtc aat ggg	act ggc ggc gag gaa	cca acg	3837
	Leu Met Val	Pro Leu Val Asn Gly	Thr Gly Gly Glu Glu	Pro Thr	
	1240		1245	1250	
15	ccg acg gag	agc cca acg gaa acg	acg aca acc aca ccc	agc gaa	3882
	Pro Thr Glu	Ser Pro Thr Glu Thr	Thr Thr Thr Thr Pro	Ser Glu	
	1255		1260	1265	
20	aca acc acc	aca act tca acg acc	acc ggc cca agc tca	acg acc	3927
	Thr Thr Thr	Thr Thr Ser Thr Thr	Thr Gly Pro Ser Ser	Thr Thr	
	1270		1275	1280	
25	acc agc aca	ccc ggc gga gga atc	tgc ggc cca ggc att	ata gcg	3972
	Thr Ser Thr	Pro Gly Gly Gly Ile	Cys Gly Pro Gly Ile	Ile Ala	
	1285		1290	1295	
30	ggc ctg gcc	ctg ata ccg ctc ctc	ctc aag agg agg aac	tga	4014
	Gly Leu Ala	Leu Ile Pro Leu Leu	Leu Lys Arg Arg Asn		
	1300		1305	1310	
35	<210> 11				
	<211> 1337				
	<212> PRT				
	<213> Thermococcus hydrothermalis				
40	<400> 11				
	Met Arg Arg	Val Val Ala Leu Phe	Ile Ala Ile Leu Met	Leu Gly Ser	
	-25		-20	-15	
45	Ile Val Gly	Ala Asn Val Lys Ser	Val Gly Ala Ala Glu	Pro Lys Pro	
	-10		-5	-1 1	5
50	Leu Asn Val	Ile Ile Val Trp His	Gln His Gln Pro Tyr	Tyr Tyr Asp	
		10	15	20	
55	Pro Val Gln	Asp Val Tyr Thr Arg	Pro Trp Val Arg Leu	His Ala Ala	
		25	30	35	
60	Asn Asn Tyr	Trp Lys Met Ala His	Tyr Leu Ser Gln Tyr	Pro Glu Val	
	40		45	50	
65	His Ala Thr	Ile Asp Leu Ser Gly	Ser Leu Ile Ala Gln	Leu Ala Asp	
	55		60	65	
70	Tyr Met Asn	Gly Lys Lys Asp Thr	Tyr Gln Ile Ile Thr	Glu Lys Ile	
	70		75	80	85

ES 2 749 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 749 652 T3

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

5
 Ile Tyr Leu Phe Pro Arg Asn His Asp Leu Ser Asp Arg Val Gly Phe
 345 350 355

10
 Thr Tyr Ser Gly Met Asn Gln Gln Gln Ala Val Glu Asp Phe Val Asn
 360 365 370

15
 Glu Leu Leu Lys Leu Gln Lys Gln Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Val Tyr
 375 380 385

20
 Val Val Thr Leu Asp Gly Glu Asn Pro Val Glu Asn Tyr Pro Tyr Asp
 390 395 400 405

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

25
 Glu Gln Gly Leu Ile Arg Thr Leu Thr Pro Ser Glu Tyr Ile Gln Leu
 425 430 435

30
 Tyr Gly Asp Lys Ala Asn Lys Leu Thr Pro Arg Met Met Glu Arg Leu
 440 445 450

35
 Asp Leu Thr Gly Asp Asn Val Asn Ala Leu Leu Lys Ala Gln Ser Leu
 455 460 465

40
 Gly Glu Leu Tyr Asp Met Thr Gly Val Lys Glu Glu Met Gln Trp Pro
 470 475 480 485

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

45
 Gln Glu Asn Tyr Gly Trp Tyr Trp Leu Tyr Met Ala Arg Lys Ala Leu
 505 510 515

50
 Met Glu Asn Lys Asp Lys Met Ser Gln Ala Asp Trp Glu Lys Ala Tyr
 520 525 530

55
 Glu Tyr Leu Leu Arg Ala Glu Ala Ser Asp Trp Phe Trp Trp Tyr Gly
 535 540 545

60
 Ser Asp Gln Asp Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Asp Arg Tyr Leu Lys
 550 555 560 565

ES 2 749 652 T3

Thr Tyr Leu Tyr Glu Met Tyr Lys Leu Ala Gly Val Glu Pro Pro Ser
 570 575 580
 5 Tyr Leu Phe Gly Asn Tyr Phe Pro Asp Gly Glu Pro Tyr Thr Thr Arg
 585 590 595
 10 Gly Leu Val Gly Leu Lys Asp Gly Glu Met Lys Asn Phe Ser Ser Met
 600 605 610
 15 Ser Pro Leu Ala Lys Gly Val Ser Val Tyr Phe Asp Gly Glu Gly Ile
 615 620 625
 20 His Phe Ile Val Lys Gly Asn Leu Asp Arg Phe Glu Val Ser Ile Trp
 630 635 640 645
 25 Glu Lys Asp Glu Arg Val Gly Asn Thr Phe Thr Arg Leu Gln Glu Lys
 650 655 660
 30 Pro Asp Glu Leu Ser Tyr Phe Met Phe Pro Phe Ser Arg Asp Ser Val
 665 670 675
 35 Gly Leu Leu Ile Thr Lys His Val Val Tyr Glu Asn Gly Lys Ala Glu
 680 685 690
 40 Ile Tyr Gly Ala Thr Asp Tyr Glu Lys Ser Glu Lys Leu Gly Glu Ala
 695 700 705
 45 Thr Val Lys Asn Thr Ser Glu Gly Ile Glu Val Val Leu Pro Phe Asp
 710 715 720 725
 50 Tyr Ile Glu Asn Pro Ser Asp Phe Tyr Phe Ala Val Ser Thr Val Lys
 730 735 740
 55 Asp Gly Asp Leu Glu Val Ile Ser Thr Pro Val Glu Leu Lys Leu Pro
 745 750 755
 60 Thr Glu Val Lys Gly Val Val Ile Ala Asp Ile Thr Asp Pro Glu Gly
 760 765 770
 65 Asp Asp His Gly Pro Gly Asn Tyr Thr Tyr Pro Thr Asp Lys Val Phe
 775 780 785
 70 Lys Pro Gly Val Phe Asp Leu Leu Arg Phe Arg Met Leu Glu Gln Thr
 790 795 800 805
 75 Glu Ser Tyr Val Met Glu Phe Tyr Phe Lys Asp Leu Gly Gly Asn Pro

ES 2 749 652 T3

				810					815					820			
5	Trp	Asn	Gly	Pro	Asn	Gly	Phe	Ser	Leu	Gln	Ile	Ile	Glu	Val	Tyr	Leu	
				825					830					835			
10	Asp	Phe	Lys	Asp	Gly	Gly	Asn	Ser	Ser	Ala	Ile	Lys	Met	Phe	Pro	Asp	
			840					845					850				
15	Gly	Pro	Gly	Ala	Asn	Val	Asn	Leu	Asp	Pro	Glu	His	Pro	Trp	Asp	Val	
		855					860					865					
20	Ala	Phe	Arg	Ile	Ala	Gly	Trp	Asp	Tyr	Gly	Asn	Leu	Ile	Ile	Leu	Pro	
	870					875					880					885	
25	Asn	Gly	Thr	Ala	Ile	Gln	Gly	Glu	Met	Gln	Ile	Ser	Ala	Asp	Pro	Val	
					890					895					900		
30	Lys	Asn	Ala	Ile	Ile	Val	Lys	Val	Pro	Lys	Lys	Tyr	Ile	Ala	Ile	Asn	
				905					910					915			
35	Glu	Asp	Tyr	Gly	Leu	Trp	Gly	Asp	Val	Leu	Val	Gly	Ser	Gln	Asp	Gly	
		920						925					930				
40	Tyr	Gly	Pro	Asp	Lys	Trp	Arg	Thr	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	Glu	Gln	Trp	
	935						940					945					
45	Lys	Leu	Gly	Gly	Ala	Asp	Pro	Gln	Ala	Val	Ile	Asn	Gly	Val	Ala	Pro	
	950					955					960					965	
50	Arg	Val	Ile	Asp	Glu	Leu	Val	Pro	Gln	Gly	Phe	Glu	Pro	Thr	Gln	Glu	
					970					975					980		
55	Glu	Gln	Leu	Ser	Ser	Tyr	Asp	Ala	Asn	Asp	Met	Lys	Leu	Ala	Thr	Val	
				985					990					995			
60	Lys	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Lys	Gln	Gly	Ile	Val	Val	Thr	Asp	Pro		
			1000					1005					1010				
65	Glu	Gly	Asp	Asp	His	Gly	Pro	Gly	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Thr	Asp		
			1015					1020					1025				
70	Lys	Val	Phe	Lys	Pro	Gly	Val	Phe	Asp	Leu	Leu	Lys	Phe	Lys	Val		
			1030					1035					1040				
75	Thr	Glu	Gly	Ser	Asp	Asp	Trp	Thr	Leu	Glu	Phe	His	Phe	Lys	Asp		
			1045					1050					1055				

ES 2 749 652 T3

5 Leu Gly Gly Asn Pro Trp Asn Gly Pro Asn Gly Phe Ser Leu Gln
 1060 1065 1070
 10 Ile Ile Glu Val Tyr Phe Asp Phe Lys Glu Gly Gly Asn Val Ser
 1075 1080 1085
 15 Ala Ile Lys Met Phe Pro Asp Gly Pro Gly Ser Asn Val Arg Leu
 1090 1095 1100
 20 Asp Pro Asn His Pro Trp Asp Leu Ala Leu Arg Ile Ala Gly Trp
 1105 1110 1115
 25 Asp Tyr Gly Asn Leu Ile Ile Leu Pro Asp Gly Thr Ala Tyr Gln
 1120 1125 1130
 30 Gly Glu Met Gln Ile Ser Ala Asp Pro Val Lys Asn Ala Ile Ile
 1135 1140 1145
 35 Val Lys Val Pro Lys Lys Tyr Leu Asn Ile Ser Asp Tyr Gly Leu
 1150 1155 1160
 40 Tyr Thr Ala Val Ile Val Gly Ser Gln Asp Gly Tyr Gly Pro Asp
 1165 1170 1175
 45 Lys Trp Arg Pro Val Ala Ala Glu Ala Glu Gln Trp Lys Leu Gly
 1180 1185 1190
 50 Gly Ala Asp Pro Gln Ala Val Ile Asp Asn Leu Val Pro Arg Val
 1195 1200 1205
 55 Val Asp Glu Leu Val Pro Glu Gly Phe Lys Pro Thr Gln Glu Glu
 1210 1215 1220
 60 Gln Leu Ser Ser Tyr Asp Leu Glu Lys Lys Thr Leu Ala Thr Val
 1225 1230 1235
 65 Leu Met Val Pro Leu Val Asn Gly Thr Gly Gly Glu Glu Pro Thr
 1240 1245 1250
 70 Pro Thr Glu Ser Pro Thr Glu Thr Thr Thr Thr Thr Pro Ser Glu
 1255 1260 1265
 75 Thr Thr Thr Thr Thr Ser Thr Thr Thr Gly Pro Ser Ser Thr Thr
 1270 1275 1280

ES 2 749 652 T3

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

5
 Gly Leu Ala Leu Ile Pro Leu Leu Leu Lys Arg Arg Asn
 1300 1305 1310

10 <210> 12
 <211> 809
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Pululanasa híbrida de Thermoccus hydrothermalis y Thermococcus
 litoralis

20 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(27)

25 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (28)..(809)
 <400> 12

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 749 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 749 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

60 Asp Asp His Gly Pro Gly Asn Tyr Thr
 775 780

<210> 13
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> Pyrococcus furiosus

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(412)
 <223> proteasa de Pyrococcus furiosus (Pfu)

ES 2 749 652 T3

<400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 749 652 T3

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

5
 Ala Leu Leu Leu Gln Ala His Pro Ser Trp Thr Pro Asp Lys Val Lys
 260 265 270

10
 Thr Ala Leu Ile Glu Thr Ala Asp Ile Val Lys Pro Asp Glu Ile Ala
 275 280 285

15
 Asp Ile Ala Tyr Gly Ala Gly Arg Val Asn Ala Tyr Lys Ala Ile Asn
 290 295 300

20
 Tyr Asp Asn Tyr Ala Lys Leu Val Phe Thr Gly Tyr Val Ala Asn Lys
 305 310 315 320

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

25
 Ala Thr Leu Tyr Trp Asp Asn Ala Asn Ser Asp Leu Asp Leu Tyr Leu
 340 345 350

30
 Tyr Asp Pro Asn Gly Asn Gln Val Asp Tyr Ser Tyr Thr Ala Tyr Tyr
 355 360 365

35
 Gly Phe Glu Lys Val Gly Tyr Tyr Asn Pro Thr Asp Gly Thr Trp Thr
 370 375 380

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

40
 Val Ser Asp Gly Ser Leu Ser Gln Pro Gly Ser Ser
 405 410

45
 <210> 14
 <211> 595
 <212> PRT
 <213> Penicillium oxalicum

50
 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(595)

55
 <223> secuencia de glucoamilasa de Penicillium oxalicum madura
 <400> 14

60
 Arg Pro Asp Pro Lys Gly Gly Asn Leu Thr Pro Phe Ile His Lys Glu
 1 5 10 15

ES 2 749 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

60 Ser Gly Ile Asp Leu Asp Ser Val Leu Gly Ser Ile His Thr Phe Asp

ES 2 749 652 T3

		260		265		270													
5	Pro	Glu	Ala	Ala	Cys	Asp	Asp	Ala	Thr	Phe	Gln	Pro	Cys	Ser	Ala	Arg			
			275					280					285						
10	Ala	Leu	Ala	Asn	His	Lys	Val	Tyr	Val	Asp	Ser	Phe	Arg	Ser	Ile	Tyr			
		290					295					300							
15	Lys	Ile	Asn	Ala	Gly	Leu	Ala	Glu	Gly	Ser	Ala	Ala	Asn	Val	Gly	Arg			
	305					310					315				320				
20	Tyr	Pro	Glu	Asp	Val	Tyr	Gln	Gly	Gly	Asn	Pro	Trp	Tyr	Leu	Ala	Thr			
					325					330					335				
25	Leu	Gly	Ala	Ser	Glu	Leu	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu	Tyr	Gln	Trp	Asp	Arg			
				340					345					350					
30	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Leu	Ser	Phe	Phe	Lys	Asp			
			355					360					365						
35	Phe	Asp	Ala	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Ser	Tyr	Ser	Arg	Asn	Ser	Lys	Thr			
	370						375					380							
40	Tyr	Lys	Lys	Leu	Thr	Gln	Ser	Ile	Lys	Ser	Tyr	Ala	Asp	Gly	Phe	Ile			
	385					390					395				400				
45	Gln	Leu	Val	Gln	Gln	Tyr	Thr	Pro	Ser	Asn	Gly	Ser	Leu	Ala	Glu	Gln			
					405					410					415				
50	Tyr	Asp	Arg	Asn	Thr	Ala	Ala	Pro	Leu	Ser	Ala	Asn	Asp	Leu	Thr	Trp			
				420					425					430					
55	Ser	Phe	Ala	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Thr	Gln	Arg	Arg	Asp	Ala	Val	Val			
			435					440					445						
60	Pro	Pro	Ser	Trp	Gly	Ala	Lys	Ser	Ala	Asn	Lys	Val	Pro	Thr	Thr	Cys			
	450						455					460							
65	Ser	Ala	Ser	Pro	Val	Val	Gly	Thr	Tyr	Lys	Ala	Pro	Thr	Ala	Thr	Phe			
	465					470					475				480				
70	Ser	Ser	Lys	Thr	Lys	Cys	Val	Pro	Ala	Lys	Asp	Ile	Val	Pro	Ile	Thr			
					485					490					495				
75	Phe	Tyr	Leu	Ile	Glu	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Asn	Val	Phe	Met	Ser			
			500						505					510					

ES 2 749 652 T3

Gly Asn Ile Thr Ala Leu Gly Asn Trp Asp Ala Lys Lys Gly Phe Pro
 515 520 525
 5

Leu Thr Ala Asn Leu Tyr Thr Gln Asp Gln Asn Leu Trp Phe Ala Ser
 530 535 540
 10

Val Glu Phe Ile Pro Ala Gly Thr Pro Phe Glu Tyr Lys Tyr Tyr Lys
 545 550 555 560
 15

Val Glu Pro Asn Gly Asp Ile Thr Trp Glu Lys Gly Pro Asn Arg Val
 565 570 575
 20

Phe Val Ala Pro Thr Gly Cys Pro Val Gln Pro His Ser Asn Asp Val
 580 585 590
 25

Trp Gln Phe
 595

30

<210> 15
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador sentido

35

<400> 15
 atgcgtctca ctctattatc aggtg 25

40

<210> 16
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Cebador F

45

<400> 16
 acacaactgg ggatccacca tgcgtctcac tctattatc 39

50

<210> 17
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

55

<220>
 <223> Cebador R

60

<400> 17
 agatctcgag aagcttaaaa ctgccacacg tcggttg 37

ES 2 749 652 T3

<210> 18
 <211> 18
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador K79V F 18mer

 10 <400> 18
 gcagtcctttc caattgac 18

 <210> 19
 15 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220> Cebador
 20 <223> Primer K79V R 18mer

 <400> 19
 aattggaaaag actgcccg 18

 25
 <210> 20
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30
 <220>
 <223> Cebador F-NP003940

 <400> 20
 35 acacaactgg ggatccacca tgcgtctcac tctattatc 39

 <210> 21
 <211> 37
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebador F-NP003940
 45
 <400> 21
 agatctcgag aagcttaaaa ctgccacacg tcgttgg 37

 50 <210> 22
 <211> 863
 <212> PRT
 <213> Aspergillus fumigatus

 55 <400> 22

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

 60 Ala Asn Ala Gln Glu Leu Ala Phe Ser Pro Pro Phe Tyr Pro Ser Pro

ES 2 749 652 T3

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

ES 2 749 652 T3

5 Gly Phe Gln Gly Phe Val Met Ser Asp Trp Ser Ala His His Ser Gly
275 280 285

10 Val Gly Ala Ala Leu Ala Gly Leu Asp Met Ser Met Pro Gly Asp Ile
290 295 300

15 Ser Phe Asp Asp Gly Leu Ser Phe Trp Gly Thr Asn Leu Thr Val Ser
305 310 315 320

20 Val Leu Asn Gly Thr Val Pro Ala Trp Arg Val Asp Asp Met Ala Val
325 330 335

25 Arg Ile Met Thr Ala Tyr Tyr Lys Val Gly Arg Asp Arg Leu Arg Ile
340 345 350

30 Pro Pro Asn Phe Ser Ser Trp Thr Arg Asp Glu Tyr Gly Trp Glu His
355 360 365

35 Ser Ala Val Ser Glu Gly Ala Trp Thr Lys Val Asn Asp Phe Val Asn
370 375 380

40 Val Gln Arg Ser His Ser Gln Ile Ile Arg Glu Ile Gly Ala Ala Ser
385 390 395 400

45 Thr Val Leu Leu Lys Asn Thr Gly Ala Leu Pro Leu Thr Gly Lys Glu
405 410 415

50 Val Lys Val Gly Val Leu Gly Glu Asp Ala Gly Ser Asn Pro Trp Gly
420 425 430

55 Ala Asn Gly Cys Pro Asp Arg Gly Cys Asp Asn Gly Thr Leu Ala Met
435 440 445

60 Ala Trp Gly Ser Gly Thr Ala Asn Phe Pro Tyr Leu Val Thr Pro Glu
450 455 460

65 Gln Ala Ile Gln Arg Glu Val Ile Ser Asn Gly Gly Asn Val Phe Ala
465 470 475 480

70 Val Thr Asp Asn Gly Ala Leu Ser Gln Met Ala Asp Val Ala Ser Gln
485 490 495

75 Ser Ser Val Ser Leu Val Phe Val Asn Ala Asp Ser Gly Glu Gly Phe
500 505 510

ES 2 749 652 T3

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

5
Lys Asn Gly Glu Ala Val Ile Asp Thr Val Val Ser His Cys Asn Asn
530 535 540

10
Thr Ile Val Val Ile His Ser Val Gly Pro Val Leu Ile Asp Arg Trp
545 550 555 560

15
Tyr Asp Asn Pro Asn Val Thr Ala Ile Ile Trp Ala Gly Leu Pro Gly
565 570 575

20
Gln Glu Ser Gly Asn Ser Leu Val Asp Val Leu Tyr Gly Arg Val Asn
580 585 590

25
Pro Ser Ala Lys Thr Pro Phe Thr Trp Gly Lys Thr Arg Glu Ser Tyr
595 600 605

30
Gly Ala Pro Leu Leu Thr Glu Pro Asn Asn Gly Asn Gly Ala Pro Gln
610 615 620

35
Asp Asp Phe Asn Glu Gly Val Phe Ile Asp Tyr Arg His Phe Asp Lys
625 630 635 640

40
Thr Phe Gly Tyr Ser His Leu Arg Val Gln Ala Leu Asn Ser Ser Ser
660 665 670

45
Ser Ala Tyr Val Pro Thr Ser Gly Glu Thr Lys Pro Ala Pro Thr Tyr
675 680 685

50
Gly Glu Ile Gly Ser Ala Ala Asp Tyr Leu Tyr Pro Glu Gly Leu Lys
690 695 700

55
Arg Ile Thr Lys Phe Ile Tyr Pro Trp Leu Asn Ser Thr Asp Leu Glu
705 710 715 720

60
Asp Ser Ser Asp Asp Pro Asn Tyr Gly Trp Glu Asp Ser Glu Tyr Ile
725 730 735

Pro Glu Gly Ala Arg Asp Gly Ser Pro Gln Pro Leu Leu Lys Ala Gly
740 745 750

ES 2 749 652 T3

Gly Ala Pro Gly Gly Asn Pro Thr Leu Tyr Gln Asp Leu Val Arg Val
755 760 765

5 Ser Ala Thr Ile Thr Asn Thr Gly Asn Val Ala Gly Tyr Glu Val Pro
770 775 780

10 Gln Leu Tyr Val Ser Leu Gly Gly Pro Asn Glu Pro Arg Val Val Leu
785 790 795 800

15 Arg Lys Phe Asp Arg Ile Phe Leu Ala Pro Gly Glu Gln Lys Val Trp
805 810 815

20 Thr Thr Thr Leu Asn Arg Arg Asp Leu Ala Asn Trp Asp Val Glu Ala
820 825 830

Gln Asp Trp Val Ile Thr Lys Tyr Pro Lys Lys Val His Val Gly Ser
835 840 845

25 Ser Ser Arg Lys Leu Pro Leu Arg Ala Pro Leu Pro Arg Val Tyr
850 855 860

30 <210> 23
<211> 253
<212> PRT
<213> Penicillium sp.

35 <400> 23

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

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

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

50 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

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

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

ES 2 749 652 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

50 <210> 24
<211> 532
<212> PRT
<213> Aspergillus fumigatus

55 <400> 24

60 Met Leu Ala Ser Thr Phe Ser Tyr Arg Met Tyr Lys Thr Ala Leu Ile
1 5 10 15

65 Leu Ala Ala Leu Leu Gly Ser Gly Gln Ala Gln Gln Val Gly Thr Ser
20 25 30

70 Gln Ala Glu Val His Pro Ser Met Thr Trp Gln Ser Cys Thr Ala Gly
35 40 45

75 Gly Ser Cys Thr Thr Asn Asn Gly Lys Val Val Ile Asp Ala Asn Trp
50 55 60

ES 2 749 652 T3

Arg Trp Val His Lys Val Gly Asp Tyr Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn
 65 70 75 80
 5 Thr Trp Asp Thr Thr Ile Cys Pro Asp Asp Ala Thr Cys Ala Ser Asn
 85 90 95
 10 Cys Ala Leu Glu Gly Ala Asn Tyr Glu Ser Thr Tyr Gly Val Thr Ala
 100 105 110
 15 Ser Gly Asn Ser Leu Arg Leu Asn Phe Val Thr Thr Ser Gln Gln Lys
 115 120 125
 20 Asn Ile Gly Ser Arg Leu Tyr Met Met Lys Asp Asp Ser Thr Tyr Glu
 130 135 140
 25 Met Phe Lys Leu Leu Asn Gln Glu Phe Thr Phe Asp Val Asp Val Ser
 145 150 155 160
 30 Ala Asp Gly Gly Met Ser Lys Tyr Pro Thr Asn Lys Ala Gly Ala Lys
 180 185 190
 35 Tyr Gly Thr Gly Tyr Cys Asp Ser Gln Cys Pro Arg Asp Leu Lys Phe
 195 200 205
 40 Ile Asn Gly Gln Ala Asn Val Glu Gly Trp Gln Pro Ser Ser Asn Asp
 210 215 220
 45 Ala Asn Ala Gly Thr Gly Asn His Gly Ser Cys Cys Ala Glu Met Asp
 225 230 235 240
 50 Ile Trp Glu Ala Asn Ser Ile Ser Thr Ala Phe Thr Pro His Pro Cys
 245 250 255
 55 Asp Thr Pro Gly Gln Val Met Cys Thr Gly Asp Ala Cys Gly Gly Thr
 260 265 270
 60 Tyr Ser Ser Asp Arg Tyr Gly Gly Thr Cys Asp Pro Asp Gly Cys Asp
 275 280 285
 Phe Asn Ser Phe Arg Gln Gly Asn Lys Thr Phe Tyr Gly Pro Gly Met
 290 295 300
 60 Thr Val Asp Thr Lys Ser Lys Phe Thr Val Val Thr Gln Phe Ile Thr

ES 2 749 652 T3

<212> PRT
 <213> Aspergillus fumigatus

<400> 25

5 Met Lys His Leu Ala Ser Ser Ile Ala Leu Thr Leu Leu Leu Pro Ala
 1 5 10 15

10 Val Gln Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Gln Gly Trp
 20 25 30

15 Ser Gly Pro Thr Ser Cys Val Ala Gly Ala Ala Cys Ser Thr Leu Asn
 35 40 45

20 Pro Tyr Tyr Ala Gln Cys Ile Pro Gly Ala Thr Ala Thr Ser Thr Thr
 50 55 60

Leu Thr Thr Thr Thr Ala Ala Thr Thr Thr Ser Gln Thr Thr Thr Lys
 65 70 75 80

25 Pro Thr Thr Thr Gly Pro Thr Thr Ser Ala Pro Thr Val Thr Ala Ser
 85 90 95

30 Gly Asn Pro Phe Ser Gly Tyr Gln Leu Tyr Ala Asn Pro Tyr Tyr Ser
 100 105 110

35 Ser Glu Val His Thr Leu Ala Met Pro Ser Leu Pro Ser Ser Leu Gln
 115 120 125

40 Pro Lys Ala Ser Ala Val Ala Glu Val Pro Ser Phe Val Trp Leu Asp
 130 135 140

45 Val Ala Ala Lys Val Pro Thr Met Gly Thr Tyr Leu Ala Asp Ile Gln
 145 150 155 160

Ala Lys Asn Lys Ala Gly Ala Asn Pro Pro Ile Ala Gly Ile Phe Val
 165 170 175

50 Val Tyr Asp Leu Pro Asp Arg Asp Cys Ala Ala Leu Ala Ser Asn Gly
 180 185 190

55 Glu Tyr Ser Ile Ala Asn Asn Gly Val Ala Asn Tyr Lys Ala Tyr Ile
 195 200 205

60 Asp Ala Ile Arg Ala Gln Leu Val Lys Tyr Ser Asp Val His Thr Ile
 210 215 220

ES 2 749 652 T3

Leu Val Ile Glu Pro Asp Ser Leu Ala Asn Leu Val Thr Asn Leu Asn
 225 230 235 240

5 Val Ala Lys Cys Ala Asn Ala Gln Ser Ala Tyr Leu Glu Cys Val Asp
 245 250 255

10 Tyr Ala Leu Lys Gln Leu Asn Leu Pro Asn Val Ala Met Tyr Leu Asp
 260 265 270

15 Ala Gly His Ala Gly Trp Leu Gly Trp Pro Ala Asn Leu Gly Pro Ala
 275 280 285

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

25 Val Arg Gly Leu Ala Thr Asn Val Ala Asn Tyr Asn Ala Trp Ser Leu
 305 310 315 320

30 Ser Thr Cys Pro Ser Tyr Thr Gln Gly Asp Pro Asn Cys Asp Glu Lys
 325 330 335

35 Lys Tyr Ile Asn Ala Met Ala Pro Leu Leu Lys Glu Ala Gly Phe Asp
 340 345 350

40 Ala His Phe Ile Met Asp Thr Ser Arg Asn Gly Val Gln Pro Thr Lys
 355 360 365

45 Gln Asn Ala Trp Gly Asp Trp Cys Asn Val Ile Gly Thr Gly Phe Gly
 370 375 380

50 Val Arg Pro Ser Thr Asn Thr Gly Asp Pro Leu Gln Asp Ala Phe Val
 385 390 395 400

55 Trp Ile Lys Pro Gly Gly Glu Ser Asp Gly Thr Ser Asn Ser Thr Ser
 405 410 415

60 Pro Arg Tyr Asp Ala His Cys Gly Tyr Ser Asp Ala Leu Gln Pro Ala
 420 425 430

65 Pro Glu Ala Gly Thr Trp Phe Gln Ala Tyr Phe Glu Gln Leu Leu Thr
 435 440 445

70 Asn Ala Asn Pro Ser Phe
 450

75 <210> 26

ES 2 749 652 T3

<211> 573
 <212> PRT
 <213> Gloeophyllum sepiarium

5

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(17)

10 <400> 26

Met Tyr Arg Phe Leu Val Cys Ala Leu Gly Leu Ala Ala Ser Val Leu
 1 5 10 15

15

Ala Gln Ser Val Asp Ser Tyr Val Ser Ser Glu Gly Pro Ile Ala Lys
 20 25 30

20

Ala Gly Val Leu Ala Asn Ile Gly Pro Asn Gly Ser Lys Ala Ser Gly
 35 40 45

25

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

30

Tyr Trp Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Ser Leu Val Phe Lys Ser Leu
 65 70 75 80

Ile Asp Gln Tyr Thr Thr Gly Ile Asp Ser Thr Ser Ser Leu Arg Thr
 85 90 95

35

Leu Ile Asp Asp Phe Val Thr Ala Glu Ala Asn Leu Gln Gln Val Ser
 100 105 110

40

Asn Pro Ser Gly Thr Leu Thr Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe
 115 120 125

45

Asn Val Asp Glu Thr Ala Phe Thr Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg
 130 135 140

50

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

Leu Leu Ser Asn Gly Asn Thr Ser Tyr Val Thr Ser Asn Leu Trp Pro
 165 170 175

55

Ile Ile Gln Asn Asp Leu Gly Tyr Val Val Ser Tyr Trp Asn Gln Ser
 180 185 190

60

Thr Tyr Asp Leu Trp Glu Glu Val Asp Ser Ser Ser Phe Phe Thr Thr
 195 200 205

ES 2 749 652 T3

5 Ala Val Gln His Arg Ala Leu Arg Glu Gly Ala Ala Phe Ala Thr Ala
210 215 220

10 Ile Gly Gln Thr Ser Gln Val Ser Ser Tyr Thr Thr Gln Ala Asp Asn
225 230 235 240

15 Leu Leu Cys Phe Leu Gln Ser Tyr Trp Asn Pro Ser Gly Gly Tyr Ile
245 250 255

20 Thr Ala Asn Thr Gly Gly Gly Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr Leu
260 265 270

25 Leu Ala Ser Ile His Thr Tyr Asp Pro Ser Ala Gly Cys Asp Ala Ala
275 280 285

30 Thr Phe Gln Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val Tyr
290 295 300

35 Val Asp Ser Phe Arg Ser Val Tyr Ser Ile Asn Ser Gly Val Ala Ser
305 310 315 320

40 Asn Ala Ala Val Ala Thr Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Ser Tyr Gln Gly
325 330 335

45 Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Thr Thr Phe Ala Val Ala Glu Gln Leu Tyr
340 345 350

50 Asp Ala Leu Asn Val Trp Glu Ser Gln Gly Ser Leu Glu Val Thr Ser
355 360 365

55 Thr Ser Leu Ala Phe Phe Gln Gln Phe Ser Ser Gly Val Thr Ala Gly
370 375 380

60 Thr Tyr Ser Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Ser Thr Leu Thr Ser Ala Ile
385 390 395 400

65 Lys Asn Phe Ala Asp Gly Phe Val Ala Ile Asn Ala Lys Tyr Thr Pro
405 410 415

70 Ser Asn Gly Gly Leu Ala Glu Gln Tyr Ser Lys Ser Asp Gly Ser Pro
420 425 430

75 Leu Ser Ala Val Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ser Ala Leu Thr Ala
435 440 445

ES 2 749 652 T3

Phe Glu Ala Arg Asn Asn Thr Gln Phe Ala Gly Trp Gly Ala Ala Gly
 450 455 460
 5
 Leu Thr Val Pro Ser Ser Cys Ser Gly Asn Ser Gly Gly Pro Thr Val
 465 470 475 480
 10
 Ala Val Thr Phe Asn Val Asn Ala Glu Thr Val Trp Gly Glu Asn Ile
 485 490 495
 15
 Tyr Leu Thr Gly Ser Val Asp Ala Leu Glu Asn Trp Ser Ala Asp Asn
 500 505 510
 20
 Ala Leu Leu Leu Ser Ser Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ile Thr Val
 515 520 525
 25
 Asn Leu Pro Ala Ser Thr Ala Ile Glu Tyr Lys Tyr Ile Arg Lys Asn
 530 535 540
 30
 Asn Gly Ala Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Asn Ser Ile Thr Thr
 545 550 555 560
 35
 Pro Ala Ser Gly Ser Thr Thr Glu Asn Asp Thr Trp Arg
 565 570
 <210> 27
 <211> 576
 <212> PRT
 <213> Gloeophyllum trabeum
 40
 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(17)
 <400> 27
 45
 Met Tyr Arg Phe Leu Val Cys Ala Leu Gly Leu Leu Gly Thr Val Leu
 1 5 10 15
 50
 Ala Gln Ser Val Asp Ser Tyr Val Gly Ser Glu Gly Pro Ile Ala Lys
 20 25 30
 55
 Ala Gly Val Leu Ala Asn Ile Gly Pro Asn Gly Ser Lys Ala Ser Gly
 35 40 45
 60
 Ala Ala Ala Gly Val Val Val Ala Ser Pro Ser Lys Ser Asp Pro Asp
 50 55 60

ES 2 749 652 T3

Tyr Trp Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Ser Leu Val Phe Lys Ser Leu
 65 70 75 80
 5 Ile Asp Gln Tyr Thr Thr Gly Ile Asp Ser Thr Ser Ser Leu Arg Ser
 85 90 95
 10 Leu Ile Asp Ser Phe Val Ile Ala Glu Ala Asn Ile Gln Gln Val Ser
 100 105 110
 15 Asn Pro Ser Gly Thr Leu Thr Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe
 115 120 125
 20 Asn Val Asp Glu Thr Ala Phe Thr Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg
 130 135 140
 25 Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Leu Ile Thr Tyr Gly Asn Trp
 145 150 155 160
 30 Leu Leu Ser Asn Gly Asn Thr Thr Trp Val Thr Ser Thr Leu Trp Pro
 165 170 175
 35 Ile Ile Gln Asn Asp Leu Asn Tyr Val Val Gln Tyr Trp Asn Gln Thr
 180 185 190
 40 Thr Phe Asp Leu Trp Glu Glu Val Asn Ser Ser Ser Phe Phe Thr Thr
 195 200 205
 45 Ala Val Gln His Arg Ala Leu Arg Glu Gly Ala Ala Phe Ala Thr Lys
 210 215 220
 50 Ile Gly Gln Thr Ser Ser Val Ser Ser Tyr Thr Thr Gln Ala Ala Asn
 225 230 235 240
 55 Leu Leu Cys Phe Leu Gln Ser Tyr Trp Asn Pro Thr Ser Gly Tyr Ile
 245 250 255
 60 Thr Ala Asn Thr Gly Gly Gly Arg Ser Gly Lys Asp Ala Asn Thr Leu
 260 265 270
 65 Leu Ala Ser Ile His Thr Tyr Asp Pro Ser Ala Gly Cys Asp Ala Thr
 275 280 285
 70 Thr Phe Gln Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val Tyr
 290 295 300
 75 Val Asp Ser Phe Arg Ser Val Tyr Ser Ile Asn Ser Gly Ile Ala Ser

ES 2 749 652 T3

	305				310					315					320	
5	Asn	Ala	Ala	Val	Ala	Thr	Gly	Arg	Tyr	Pro	Glu	Asp	Ser	Tyr	Gln	Gly
					325					330					335	
10	Gly	Asn	Pro	Trp	Tyr	Leu	Thr	Thr	Phe	Ala	Val	Ala	Glu	Gln	Leu	Tyr
				340					345					350		
15	Asp	Ala	Leu	Asn	Val	Trp	Ala	Ala	Gln	Gly	Ser	Leu	Asn	Val	Thr	Ser
			355					360					365			
20	Ile	Ser	Leu	Pro	Phe	Phe	Gln	Gln	Phe	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Gly
	370						375					380				
25	Thr	Tyr	Ala	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Tyr	Thr	Thr	Leu	Thr	Ser	Ala	Ile
	385						390				395					400
30	Lys	Ser	Phe	Ala	Asp	Gly	Phe	Val	Ala	Ile	Asn	Ala	Gln	Tyr	Thr	Pro
					405					410					415	
35	Ser	Asn	Gly	Gly	Leu	Ala	Glu	Gln	Phe	Ser	Arg	Ser	Asn	Gly	Ala	Pro
			420						425					430		
40	Val	Ser	Ala	Val	Asp	Leu	Thr	Trp	Ser	Tyr	Ala	Ser	Ala	Leu	Thr	Ala
			435					440					445			
45	Phe	Glu	Ala	Arg	Asn	Asn	Thr	Gln	Phe	Ala	Gly	Trp	Gly	Ala	Val	Gly
	450						455					460				
50	Leu	Thr	Val	Pro	Thr	Ser	Cys	Ser	Ser	Asn	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
	465					470					475					480
55	Ser	Thr	Val	Ala	Val	Thr	Phe	Asn	Val	Asn	Ala	Gln	Thr	Val	Trp	Gly
					485					490					495	
60	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ile	Thr	Gly	Ser	Val	Asp	Ala	Leu	Ser	Asn	Trp	Ser
				500					505					510		
65	Pro	Asp	Asn	Ala	Leu	Leu	Leu	Ser	Ser	Ala	Asn	Tyr	Pro	Thr	Trp	Ser
			515					520					525			
70	Ile	Thr	Val	Asn	Leu	Pro	Ala	Ser	Thr	Ala	Ile	Gln	Tyr	Lys	Tyr	Ile
	530						535					540				
75	Arg	Lys	Asn	Asn	Gly	Ala	Val	Thr	Trp	Glu	Ser	Asp	Pro	Asn	Asn	Ser
	545					550					555					560

ES 2 749 652 T3

Ile Thr Thr Pro Ala Ser Gly Ser Val Thr Glu Asn Asp Thr Trp Arg
5 565 570 575

<210> 28
<211> 573
<212> PRT
10 <213> Pycnopus sanguineus

<220>
<221> SEÑAL
15 <222> (1)..(18)

<400> 28

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

Phe Ala Gln Ser Ser Ala Val Asp Ala Tyr Val Ala Ser Glu Ser Pro
25 20 25 30

Ile Ala Lys Gln Gly Val Leu Asn Asn Ile Gly Pro Asn Gly Ser Lys
30 35 40 45

Ala His Gly Ala Lys Ala Gly Ile Val Val Ala Ser Pro Ser Thr Glu
50 55 60

Asn Pro Asp Tyr Leu Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Ser Leu Val Phe
35 65 70 75 80

Lys Leu Leu Ile Asp Gln Phe Thr Ser Gly Asp Asp Thr Ser Leu Arg
40 85 90 95

Gly Leu Ile Asp Asp Phe Thr Ser Ala Glu Ala Ile Leu Gln Gln Val
45 100 105 110

Ser Asn Pro Ser Gly Thr Val Ser Thr Gly Gly Leu Gly Glu Pro Lys
115 120 125

Phe Asn Ile Asp Glu Thr Ala Phe Thr Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln
130 135 140

Arg Asp Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ser Ile Ile Arg Tyr Ala Asn
55 145 150 155 160

Trp Leu Leu Asp Asn Gly Asn Thr Thr Tyr Val Ser Asn Thr Leu Trp
60 165 170 175

ES 2 749 652 T3

Pro Val Ile Gln Leu Asp Leu Asp Tyr Val Ala Asp Asn Trp Asn Gln
 180 185 190
 5
 Ser Thr Phe Asp Leu Trp Glu Glu Val Asp Ser Ser Ser Phe Phe Thr
 195 200 205
 10
 Thr Ala Val Gln His Arg Ala Leu Arg Glu Gly Ala Thr Phe Ala Ser
 210 215 220
 15
 Arg Ile Gly Gln Ser Ser Val Val Ser Gly Tyr Thr Thr Gln Ala Asp
 225 230 235 240
 20
 Asn Leu Leu Cys Phe Leu Gln Ser Tyr Trp Asn Pro Ser Gly Gly Tyr
 245 250 255
 Val Thr Ala Asn Thr Gly Gly Gly Arg Ser Gly Lys Asp Ser Asn Thr
 260 265 270
 25
 Val Leu Thr Ser Ile His Thr Phe Asp Pro Ala Ala Gly Cys Asp Ala
 275 280 285
 30
 Ala Thr Phe Gln Pro Cys Ser Asp Lys Ala Leu Ser Asn Leu Lys Val
 290 295 300
 35
 Tyr Val Asp Ala Phe Arg Ser Ile Tyr Thr Ile Asn Asn Gly Ile Ala
 305 310 315 320
 40
 Ser Asn Ala Ala Val Ala Thr Gly Arg Tyr Pro Glu Asp Ser Tyr Met
 325 330 335
 Gly Gly Asn Pro Trp Tyr Leu Thr Thr Ser Ala Val Ala Glu Gln Leu
 340 345 350
 45
 Tyr Asp Ala Leu Tyr Val Trp Asp Gln Leu Gly Gly Leu Asn Val Thr
 355 360 365
 50
 Ser Thr Ser Leu Ala Phe Phe Gln Gln Phe Ala Ser Gly Leu Ser Thr
 370 375 380
 55
 Gly Thr Tyr Ser Ala Ser Ser Ser Thr Tyr Ala Thr Leu Thr Ser Ala
 385 390 395 400
 60
 Ile Arg Ser Phe Ala Asp Gly Phe Leu Ala Ile Asn Ala Lys Tyr Thr
 405 410 415

ES 2 749 652 T3

Pro Ala Asp Gly Gly Leu Ala Glu Gln Tyr Ser Arg Asn Asp Gly Thr
420 425 430

5 Pro Leu Ser Ala Val Asp Leu Thr Trp Ser Tyr Ala Ala Ala Leu Thr
435 440 445

10 Ala Phe Ala Ala Arg Glu Gly Lys Thr Tyr Gly Ser Trp Gly Ala Ala
450 455 460

15 Gly Leu Thr Val Pro Ala Ser Cys Ser Gly Gly Gly Ala Thr Val
465 470 475 480

20 Ala Val Thr Phe Asn Val Gln Ala Thr Thr Val Phe Gly Glu Asn Ile
485 490 495

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

25 Ala Leu Ile Leu Ser Ala Ala Asn Tyr Pro Thr Trp Ser Ile Thr Val
515 520 525

30 Asn Leu Pro Ala Asn Thr Val Val Gln Tyr Lys Tyr Ile Arg Lys Phe
530 535 540

35 Asn Gly Gln Val Thr Trp Glu Ser Asp Pro Asn Asn Gln Ile Thr Thr
545 550 555 560

40 Pro Ser Gly Gly Ser Phe Thr Gln Asn Asp Val Trp Arg
565 570

<210> 29
<211> 413
<212> PRT
<213> Pyrococcus furiosus

45 <220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(413)

50 <400> 29

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

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

60 Ile Asp Thr Gly Ile Asp Ala Ser His Pro Asp Leu Gln Gly Lys Val

ES 2 749 652 T3

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

ES 2 749 652 T3

Asp Ile Ala Tyr Gly Ala Gly Arg Val Asn Ala Tyr Lys Ala Ile Asn
 290 295 300
 5
 Tyr Asp Asn Tyr Ala Lys Leu Val Phe Thr Gly Tyr Val Ala Asn Lys
 305 310 315 320
 10
 Gly Ser Gln Thr His Gln Phe Val Ile Ser Gly Ala Ser Phe Val Thr
 325 330 335
 15
 Ala Thr Leu Tyr Trp Asp Asn Ala Asn Ser Asp Leu Asp Leu Tyr Leu
 340 345 350
 20
 Tyr Asp Pro Asn Gly Asn Gln Val Asp Tyr Ser Tyr Thr Ala Tyr Tyr
 355 360 365
 25
 Asp Phe Glu Lys Val Gly Tyr Tyr Asn Pro Thr Asp Gly Thr Trp Thr
 370 375 380
 30
 Ile Lys Val Val Ser Tyr Ser Gly Ser Ala Asn Tyr Gln Val Asp Val
 385 390 395 400
 35
 Val Ser Asp Gly Ser Leu Ser Gln Pro Gly Ser Ser Pro
 405 410

REIVINDICACIONES

- 5 1. Proceso para generar productos de fermentación a partir de un material que contiene almidón que comprende los pasos de:
- 10 i) licuefacción del material que contiene almidón a una temperatura superior a la temperatura de gelatinización inicial usando:
- 15 - una alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* que tiene una doble delección de las posiciones 1181 + G182 o R179 + G180 y que tiene un grado de identidad de al menos un 60 % con respecto a la SEC ID N.º: 1 y
- una proteasa que tiene un valor de termoestabilidad de más del 50 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C y además tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N.º: 13 o tiene
- 20 - opcionalmente una enzima generadora de fuentes de carbohidratos;
- ii) sacarificación usando una enzima generadora de fuentes de carbohidratos;
- 20 iii) fermentación utilizando un organismo de fermentación;
- en donde una composición celulolítica derivada de *Trichoderma reesei* está presente o se añade durante la fermentación o la sacarificación y fermentación simultáneas.
- 25 2. Proceso según la reivindicación 1, en el que el pH durante la licuefacción está por encima de 5,0-6,5.
- 30 3. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el producto de fermentación es un alcohol, preferiblemente etanol, especialmente etanol combustible, etanol potable y/o etanol industrial.
- 30 4. Proceso según la reivindicación 1, en el que la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* tiene una doble delección de las posiciones 1181 + G182 y una sustitución N193F usando la SEC ID N.º: 1 para la numeración.
- 35 5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteasa se deriva de una cepa de *Pyrococcus* preferiblemente una cepa de *Pyrococcus furiosus*.
- 40 6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la enzima generadora de fuentes de carbohidratos presente y/o añadida durante la etapa de licuefacción i) es una glucoamilasa, preferiblemente derivada de una cepa del género *Penicillium*, especialmente una cepa de *Penicillium oxalicum* descrita como las SEC ID N.º: 9 o 14 en el presente documento.
- 45 7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que además una glucoamilasa está presente y/o se añade durante la sacarificación y/o la fermentación.
8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la glucoamilasa presente y/o añadida durante la sacarificación y/o la fermentación es de origen fúngico, preferiblemente de una cepa de *Aspergillus*, preferiblemente *A. Niger*, *A. Awamori* o *A. oryzae*; o una cepa de *Trichoderma* preferiblemente *T. reesei*; o una cepa de *Talaromyces*, preferiblemente *Talaromyces emersonii*, o una cepa de *Pycnoporus* o una cepa de *Gloeophyllum*, por ejemplo, una cepa de *Gloeophyllum sepiarium* o *Gloeophyllum trabeum* o una cepa de *Nigrofoomes*.
- 50 9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la composición celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei* que comprende además el polipéptido GH61A de *Penicillium emersonii* que tiene actividad potenciadora celulolítica descrito en la SEC ID N.º: 23 en el presente documento) y beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* descrita en la SEC ID N.º: 22 en el presente documento o una variante de las mismas con las siguientes sustituciones: F100D, S283G, N456E, F512Y.
- 55