

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 800 477**

51 Int. Cl.:

C12P 7/06 (2006.01)
C12N 15/56 (2006.01)
C12N 15/57 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)
C12N 9/28 (2006.01)
C12N 9/34 (2006.01)
C12N 9/42 (2006.01)
C12N 9/52 (2006.01)
C12P 7/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2014 PCT/CN2014/086235**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2015 WO15035914**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2014 E 14844456 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3063282**

54 Título: **Procesos para producir productos de fermentación**

30 Prioridad:

11.09.2013 WO PCT/CN2013/083313

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.12.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**TANG, LAN;
KANG, ZHENG FANG;
STRAHLER, CHRISTIE;
CLARK, SUZANNE y
KROGH, KRISTIAN BERTEL RØMER M.**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 800 477 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 producir 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

[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.

[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.

[0005] 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.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0006] 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 durante 0.5-5 horas a una temperatura de 75-95 °C a un pH de 4-6 usando:

- una alfa-amilasa;
- una endoglucanasa que tiene la secuencia mostrada como SEC ID N.º: 3 o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 3 y además tiene un punto de fusión (DSC) por encima de 80 °C;

ii) sacarificación del material licuado que contiene almidón de la etapa i) usando una glucoamilasa;

iii) fermentación usando una cepa de *Saccharomyces*, en donde los pasos ii) y iii) se llevan a cabo como sacarificación y fermentación simultáneas a una temperatura de 25 °C a 40 °C.

[0007] Se describen composiciones que comprenden:

- i) una alfa-amilasa;
- ii) una endoglucanasa que tiene la secuencia mostrada como SEC ID N.º: 3 o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 3 y además tiene un punto de fusión (DSC) por encima de 80 °C.

[0008] La composición puede usarse para licuar un material que contiene almidón.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0009] Los inventores han encontrado que se obtiene un mayor rendimiento de etanol al licuar material que contiene almidón usando una alfa-amilasa en presencia de una endoglucanasa termoestable según define en la reivindicación 1.

[0010] La invención se refiere a procesos para producir productos de fermentación, preferiblemente etanol, que comprenden los pasos de:

i) licuefacción del material que contiene almidón durante 0.5-5 horas a una temperatura de 75-95 °C a un pH de 4-6 usando:

- una alfa-amilasa;
- una endoglucanasa que tiene la secuencia mostrada como SEC ID N.º: 3 o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 3 y además tiene un punto de fusión (DSC) por encima de 80 °C;

ii) sacarificación del material licuado que contiene almidón de la etapa i) usando una glucoamilasa;

iii) fermentación usando una cepa de *Saccharomyces*, en donde los pasos ii) y iii) se llevan a cabo como sacarificación y fermentación simultáneas a una temperatura de 25 °C a 40 °C. Los pasos ii) y iii) se llevan a cabo simultáneamente. La alfa-amilasa, la endoglucanasa termoestable que tiene la secuencia mostrada como SEC ID N.º: 3 o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 3 y que además tiene un punto de fusión (DSC) por encima de 80 °C, se puede agregar antes y/o durante el paso de licuefacción i). Opcionalmente, pueden también estar presentes o añadirse una proteasa, una enzima generadora de fuentes de carbohidratos, preferiblemente una glucoamilasa, una pululanasa y/o una fitasa. En una realización preferida, una composición de la invención definida a continuación puede usarse adecuadamente para la licuefacción en un proceso de la invención. Las enzimas pueden agregarse individualmente o como una composición de mezcla que comprende una alfa-amilasa y una endoglucanasa termoestable tal como se define en la reivindicación 1, y opcionalmente una proteasa, una enzima generadora de fuentes de carbohidratos, una pululanasa y/o una fitasa.

[0011] Se pueden encontrar ejemplos de alfa-amilasas en la sección "Alfa-amilasa presente y/o añadida durante la licuefacción" más adelante.

[0012] En una realización preferida, la alfa-amilasa es una variante de la que se muestra en la SEC ID N.º: 1 en el presente documento, por ejemplo, una derivada de una cepa de *Bacillus stearothermophilus*, con mutaciones seleccionadas del grupo de:

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

[0013] Las alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus* generalmente se truncan de manera natural cuando se producen para tener alrededor de 491 aminoácidos de largo (en comparación con la SEC ID N.º: 3 en WO 99/19467 o la SEC ID N.º: 1 en el presente documento), por ejemplo, de 480-495 aminoácidos de longitud.

[0014] En una realización, la alfa-amilasa bacteriana, por ejemplo, la alfa-amilasa de *Bacillus*, especialmente la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* se dosifica en licuefacción en una concentración entre 0.01-10 KNU-A/g DS, por ejemplo, entre 0.02 y 5 KNU-A/g DS, por ejemplo, 0.03 y 3 KNU-A, preferiblemente 0.04 y 2 KNU-A/g DS, especialmente 0.01 y 2 KNU-A/g DS.

[0015] En una realización, la alfa-amilasa bacteriana, por ejemplo, alfa-amilasa de *Bacillus*, especialmente las alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus* se dosifican en licuefacción en una concentración de entre 0.0001-1 mg PE (proteína enzimática)/g DS, por ejemplo, 0.0005-0.5 mg PE/g DS, por ejemplo, 0.001-0.1 mg PE/g DS.

[0016] Se pueden encontrar ejemplos de endoglucanasas que tienen un punto de fusión (DSC) por encima de 70 °C en la sección "Endoglucanasa termoestable presente y/o añadida durante la licuefacción" más adelante.

[0017] En una realización preferida, la endoglucanasa es la que se muestra en la SEC ID N.º: 3 en el presente documento, por ejemplo, una derivada de una cepa de *Talaromyces leycettanus* (WO2013/019780) o una endoglucanasa que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 3 en el presente documento y que además tiene un punto de fusión (DSC) superior a 80 °C.

[0018] En una realización preferida, la endoglucanasa es la que se muestra en la SEC ID N.º: 3 en el presente documento, por ejemplo, una derivada de una cepa de *Talaromyces leycettanus* (WO2013/019780) o una endoglucanasa que tiene al menos un 90 % de identidad con la SEC ID N.º: 3 en el presente documento que tiene un punto de Fusión (DSC) por encima de 80 °C.

[0019] Se pueden encontrar ejemplos de proteasas opcionales en la sección "Proteasa presente y/o añadida durante la licuefacción" más adelante.

[0020] Se pueden encontrar ejemplos de enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos opcionales adecuadas, preferiblemente enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos termoestables, en particular

glucoamilasas, en la sección "Enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos presentes y/o añadidas durante la licuefacción" más adelante.

[0021] Se puede encontrar una pululanasa opcional adecuada en la sección "Pululanasa presente y/o añadida durante la licuefacción" más adelante.

[0022] En una realización preferida, la pululanasa se obtiene de *Bacillus* sp.

[0023] Se pueden encontrar ejemplos de fitasas en la sección "Fitasa presente y/o añadida durante la licuefacción" más adelante.

[0024] En una realización preferida, la fitasa se obtiene de una cepa de *Buttiauxella*

[0025] Se puede encontrar una composición adecuada de celulasa o enzima celulolítica presente y/o añadida durante la sacarificación y/o fermentación o sacarificación y fermentación simultáneas (SSF) en la sección "Composición de celulasa o enzima celulolítica presente y/o añadida durante la sacarificación y/o la fermentación o la SSF" más adelante.

[0026] En una realización, la composición de celulasa o enzima celulolítica se obtiene de *Trichoderma reesei*.

[0027] En una realización preferida, la composición de enzima 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 o la SEC ID N.º: 30 en el presente documento) y beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (SEC ID N.º: 2 de WO 2005/047499 o la SEC ID N.º: 29 en el presente documento).

[0028] En una realización, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además un polipéptido GH61A de *Penicillium emersonii* descrito como la SEC ID N.º: 2 en WO 2011/041397 o la SEC ID N.º: 31 en el presente documento y beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* descrita como la SEC ID N.º: 2 en WO 2005/047499 o la SEC ID N.º: 29 en el presente documento, o una variante de las mismas, cuya variante tiene una de las siguientes sustituciones o preferiblemente todas ellas: F100D, S283G, N456E, F512Y (usando la SEC ID N.º: 29 para la numeración).

[0029] De acuerdo con el proceso de la invención, el pH durante la licuefacción es de 4-6, por ejemplo, por encima de 4.8-6.0, por ejemplo, entre 5.0-5.8.

[0030] 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. La temperatura inicial de gelatinización puede ser de 50-70 °C

[0031] En una realización, la temperatura durante la etapa de licuefacción i) está en el intervalo entre 75-90 °C, preferiblemente entre 80-90 °C, por ejemplo, alrededor de 85 °C.

[0032] 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.

[0033] 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. La molienda, tanto 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.

[0034] 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.

[0035] La suspensión se puede calentar por encima de la temperatura de gelatinización inicial, preferiblemente entre 70-95 °C, por ejemplo entre 80-90 °C, preferiblemente entre pH 5.0 y 6.0, durante un tiempo de 30 minutos a 5 horas, por ejemplo, alrededor de 2 horas.

[0036] En una forma de realización preferida, la etapa de licuefacción i) se lleva a cabo durante 0.5-3 horas a una temperatura de 80-90 °C en un pH de 4-6.

[0037] La alfa-amilasa y la endoglucanasa termoestable, y la proteasa opcional, la enzima generadora de fuentes de carbohidratos opcional, en particular la glucoamilasa, la pululanasa opcional y/o la fitasa opcional, pueden añadirse 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).

[0038] 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 95-160 °C, por ejemplo, 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 aproximadamente 5 minutos.

Sacarificación y fermentación

[0039] De acuerdo con el proceso de la invención, una o más glucoamilasas pueden estar presentes y/o añadirse durante la etapa de sacarificación ii) y la etapa de fermentación iii). La glucoamilasa añadida durante la etapa de sacarificación ii) y la etapa de fermentación iii) es típicamente diferente de la enzima generadora de fuentes de carbohidratos opcional, en particular la glucoamilasa, opcionalmente añadida durante la etapa de licuefacción i). En una realización, la glucoamilasa se añade junto con una alfa-amilasa fúngica.

[0040] Se pueden encontrar ejemplos de glucoamilasas en la sección "Glucoamilasas presentes y/o añadidas durante la sacarificación y/o fermentación" más adelante.

[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.

[0042] En una realización, se lleva a cabo una etapa de presacarificación. En una realización, se añade una enzima generadora de fuentes de carbohidratos durante la presacarificación realizada antes de la etapa de sacarificación ii) y/o la etapa de fermentación iii). La enzima generadora de fuentes de carbohidratos también se puede añadir durante la presacarificación realizada antes de la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF).

[0043] En una realización, se añade una enzima generadora de fuentes de carbohidratos, preferiblemente glucoamilasa, y/o la composición de enzimas celulolíticas durante la presacarificación realizada antes de la etapa de sacarificación (ii) y/o la etapa de fermentación (iii). La enzima generadora de fuentes de carbohidratos, preferiblemente glucoamilasa, y la composición de enzima celulolítica también se pueden añadir durante la presacarificación realizada antes de la sacarificación y la fermentación simultáneas (SSF).

[0044] 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, por ejemplo, alrededor de pH 4.5.

[0045] 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. Puede que no haya una etapa de retención para la sacarificación, lo que significa que un organismo de fermentación, tal como levadura y enzima(s), en una realización preferida según la invención, se puede añadir una composición de glucoamilasa y una enzima celulolítica. Sin embargo, también se contempla agregar el organismo fermentador y la(s) enzima(s) por separado. La fermentación o la SSF pueden, según la invención, realizarse 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

[0046] "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.

Organismos de fermentación

[0047] 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. Según la invención, el organismo fermentador proviene de una cepa de *Saccharomyces* spp., en particular, *Saccharomyces cerevisiae*.

[0048] Una levadura de fermentación de etanol (p. ej., *Saccharomyces cerevisiae*) se añade al medio de fermentación para que el recuento de organismos de fermentación viables 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 .

[0049] 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

[0050] 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, yuca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, frijoles o batatas, o mezclas de los mismos o almidones derivados de los mismos, o cereales. También se contemplan los tipos cerosos y no cerosos de maíz y cebada.

[0051] 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

[0052] 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 calórico 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

[0053] 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.

Alfa-amilasa presente y/o añadida durante la licuefacción

[0054] De acuerdo con la invención, una alfa-amilasa está presente y/o se añade durante la licuefacción junto con una endoglucanasa que tiene la secuencia que se muestra como la SEC ID N.º: 3 o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 3 y además tiene un punto de fusión (DSC) por encima de 80 °C, y una proteasa opcional, una enzima generadora de fuentes de carbohidratos opcional, en particular una glucoamilasa, una pululanasa opcional y/o una fitasa opcional.

[0055] La alfa-amilasa añadida durante el paso de licuefacción i) puede ser cualquier alfa-amilasa. Se prefieren las alfa-amilasas bacterianas, especialmente, por ejemplo, las alfa-amilasas *Bacillus*, tales como las alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus*, que son estables a la temperatura utilizada durante la licuefacción.

Alfa-amilasa bacteriana

[0056] El término "alfa-amilasa bacteriana" se refiere a cualquier alfa-amilasa bacteriana clasificada en EC 3.2.1.1. Una alfa-amilasa bacteriana usada de acuerdo con la invención puede, por ejemplo, obtenerse de una cepa del género *Bacillus*, que a veces también se conoce como género *Geobacillus*. En una realización, la alfa-amilasa de *Bacillus* se obtiene de una cepa de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus sp.* TS-23 o *Bacillus subtilis*, pero también puede obtenerse de otros *Bacillus sp.*

[0057] Los ejemplos específicos de alfa-amilasas bacterianas incluyen la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* de la SEC ID N.º: 3 en WO 99/19467, la alfa-amilasa de *Bacillus amyloliquefaciens* de la SEC ID N.º: 5 en WO 99/19467 y la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* de la SEC ID N.º: 4 en WO 99/19467 y la alfa-amilasa de *Bacillus sp.* TS-23 descrita como la SEC ID N.º: 1 en WO 2009/061380.

[0058] En una realización, la alfa-amilasa bacteriana puede ser una enzima que tiene un grado de identidad de al menos un 60 %, *p. ej.*, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % con cualquiera de las secuencias mostradas en las SEC ID N.º: 3, 4 o 5, respectivamente, en WO 99/19467 y la SEC ID N.º: 1 en WO 2009/061380.

[0059] En una realización, la alfa-amilasa puede ser una enzima que tiene un grado de identidad de al menos un 60 %, por ejemplo, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % con cualquiera de las secuencias mostradas en la SEC ID N.º: 3 en WO 99/19467 o la SEC ID N.º: 1 en el presente documento.

[0060] En una realización preferida, la alfa-amilasa se obtiene de *Bacillus stearothermophilus*. La alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* puede ser de tipo salvaje maduro o una variante madura del mismo. Las alfa-amilasas maduras de *Bacillus stearothermophilus* o sus variantes, pueden truncarse de manera natural durante la producción recombinante. Por ejemplo, la alfa-amilasa madura de *Bacillus stearothermophilus* puede estar truncada, por lo que tiene alrededor de 491 aminoácidos (en comparación con la SEC ID N.º: 3 en WO 99/19467), por ejemplo, de 480-495 aminoácidos.

[0061] La alfa-amilasa de *Bacillus* también puede ser una variante y/o un híbrido. Se pueden encontrar ejemplos de dicha variante en WO 96/23873, WO 96/23874, WO 97/41213, WO 99/19467, WO 00/60059, WO 02/10355 y WO2009/061380. Se describen variantes específicas de alfa-amilasa en las patentes EE. UU. n.º 6.093.562, 6.187.576, 6.297.038 y 7.713.723 e incluyen las variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (a menudo denominada BSG alfa-amilasa) que tienen una delección de uno o dos aminoácidos en las posiciones R179, G180, 1181 y/o G182, preferiblemente una doble delección descrita en WO 96/23873 (ver, por ejemplo, página 20, líneas 1-10), preferiblemente correspondientes a la delección de las posiciones 1181 y G182 en comparación con la secuencia de aminoácidos de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* establecida en la SEC ID N.º: 3 descrita en WO 99/19467 o la SEC ID N.º: 1 en el presente documento o la delección de los aminoácidos R179 y G180 usando la SEC ID N.º: 3 en WO 99/19467 o la SEC ID N.º: 1 en el presente documento para la numeración. Se prefieren aún más las alfa-amilasas de *Bacillus*, especialmente las alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus*, que tienen una doble delección correspondiente a una delección 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: 3 descrita en WO 99/19467 o la SEC ID N.º: 1 en el presente documento. La alfa-amilasa bacteriana también puede tener una sustitución en una posición

correspondiente a S239 en la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* mostrada en la SEC ID N.º: 4 en WO 99/19467, o una variante S242 de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* de la SEC ID N.º: 3 en WO 99/19467 o SEC ID N.º: 1 en el presente documento.

[0062] En una realización, la variante es una variante S242A, E o Q, preferiblemente una variante S242Q, de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (usando la SEC ID N.º: 1 en el presente documento para la numeración).

[0063] En una realización, la variante es una variante de posición E188, preferiblemente una variante E188P de la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (usando la SEC ID N.º: 1 en el presente documento para la numeración).

[0064] Otra variante contemplada son las variantes de *Bacillus* sp. TS-23 descritas en WO2009/061380, especialmente las variantes definidas en la reivindicación 1 de WO2009/061380.

Alfa-amilasas híbridas bacterianas

[0065] La alfa-amilasa bacteriana también puede ser una alfa-amilasa bacteriana híbrida, por ejemplo, una alfa-amilasa que comprende 445 residuos de aminoácidos C-terminales de la alfa-amilasa de *Bacillus licheniformis* (se muestra en la SEC ID N.º: 4 de WO 99/19467) y los 37 residuos de aminoácidos N-terminales de la alfa-amilasa obtenida de *Bacillus amyloliquefaciens* (se muestra en la SEC ID N.º: 5 de WO 99/19467). En una realización preferida, este híbrido tiene una o más de las siguientes sustituciones, especialmente todas: G48A + T49I + G107A + H156Y + A181T + N190F + I201F + A209V + Q264S (utilizando la numeración de *Bacillus licheniformis* en la SEC ID N.º: 4 de WO 99/19467). También se prefieren las variantes que tienen una o varias de las siguientes mutaciones (o mutaciones correspondientes en otras alfa-amilasas de *Bacillus*): H154Y, A181T, N190F, A209V y Q264S y/o la delección de dos residuos entre las posiciones 176 y 179, preferiblemente la delección de E178 y G179 (usando la SEC ID N.º: 5 de WO 99/19467 para la numeración de la posición).

[0066] En una realización, la alfa-amilasa bacteriana es la parte madura de la alfa-amilasa quimérica descrita en Richardson et al., 2002, The Journal of Biological Chemistry 277 (29) : 267501-26507, denominada BD5088 o una variante de la misma. Esta alfa-amilasa es la misma que se muestra en la SEC ID N.º: 2 en WO 2007134207. La secuencia enzimática madura comienza después del aminoácido "Met" inicial en la posición 1.

Alfa-amilasa termoestable

[0067] Según la invención, la alfa-amilasa utilizada en un proceso de la invención o comprendida en una composición en combinación con una endoglucanasa que tiene la secuencia mostrada como SEC ID N.º: 3 o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 3 y además con un punto de fusión (DSC) por encima de 80 °C, puede ser una alfa-amilasa termoestable, por ejemplo, una alfa-amilasa bacteriana termoestable, preferiblemente de *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus* sp. TS-23. En una realización, la alfa-amilasa usada según la invención tiene una T_{1/2} (min) a pH 4.5, 85 °C, CaCl₂ 0.12 mM de al menos 10.

[0068] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T_{1/2} (min) a pH 4.5, 85 °C, CaCl₂ 0.12 mM, de al menos 15.

[0069] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T_{1/2} (min) a pH 4.5, 85 °C, CaCl₂ 0.12 mM, de al menos 20.

[0070] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T_{1/2} (min) a pH 4.5, 85 °C, CaCl₂ 0.12 mM, de al menos 25.

[0071] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T_{1/2} (min) a pH 4.5, 85 °C, CaCl₂ 0.12 mM, de al menos 30.

[0072] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T_{1/2} (min) a pH 4.5, 85 °C, CaCl₂ 0.12 mM, de al menos 40.

[0073] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T_{1/2} (min) a pH 4.5, 85 °C, CaCl₂ 0.12 mM, de al menos 50.

[0074] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una T_{1/2} (min) a pH 4.5, 85 °C, CaCl₂ 0.12 mM, de al menos 60.

ES 2 800 477 T3

[0075] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una $T_{1/2}$ (min) a pH 4.5, 85 °C, CaCl₂ 0.12 mM, entre 10-70.

5 [0076] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una $T_{1/2}$ (min) a pH 4.5, 85 °C, CaCl₂ 0.12 mM, entre 15-70.

[0077] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una $T_{1/2}$ (min) a pH 4.5, 85 °C, CaCl₂ 0.12 mM, entre 20-70.

10 [0078] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una $T_{1/2}$ (min) a pH 4.5, 85 °C, CaCl₂ 0.12 mM, entre 25-70.

[0079] En una realización, la alfa-amilasa termoestable tiene una $T_{1/2}$ (min) a pH 4.5, 85 °C, CaCl₂ 0.12 mM, entre 30-70.

15 [0080] 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.

20 [0081] 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.

[0082] 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.

25 [0083] En una realización, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa bacteriana, preferiblemente derivada del género *Bacillus*, especialmente una cepa de *Bacillus stearothermophilus*, en particular de *Bacillus stearothermophilus* según se describe en WO 99/19467 como la SEC ID N.º: 3 o la SEC ID N.º: 1 en el presente documento con uno o dos aminoácidos eliminados en las posiciones R179, G180, 1181 y/o G182, en particular con R179 y G180 eliminados, o con 1181 y G182 eliminados, con mutaciones en la siguiente lista de mutaciones.

30 [0084] En realizaciones preferidas, las alfa-amilasas de *Bacillus stearothermophilus* tienen doble delección 1181 + 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;
- V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S;
-V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + H274K;
-V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + Y276F;
-V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + D281N;
- V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + M284T;
- V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + G416V;
- V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S;
-V59A + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S + M284T;
- A91L + M96I + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S;
-E129V + K177L + R179E;
-E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S;
-E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + Y276F + L427M;
- E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + M284T;
- E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + N376* + I377*;
- E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S;
-E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S + M284T;
- E129V + K177L + R179E + S242Q;
-E129V + K177L + R179V + K220P + N224L + S242Q + Q254S;
-K220P + N224L + S242Q + Q254S;
-M284V;
-V59A + Q89R + E129V + K177L + R179E + Q254S + M284V.

[0085] 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; 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).

[0086] En una realización, la alfa-amilasa bacteriana, por ejemplo la alfa-amilasa de *Bacillus*, por ejemplo, la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* tiene al menos un 60 %, por ejemplo, al menos un 70 %, por ejemplo, al menos un 75 % de identidad, preferiblemente 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 %, más preferiblemente al menos un 94 %, e incluso más preferiblemente al menos un 95 %, por ejemplo, incluso al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, por ejemplo, un 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEC ID N.º: 1 en el presente documento.

[0087] En una realización, la variante de alfa-amilasa bacteriana, por ejemplo la variante de alfa-amilasa de *Bacillus*, por ejemplo, la variante de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* tiene al menos un 60 %, por ejemplo, al menos un 70 %, por ejemplo, al menos un 75 % de identidad, preferiblemente 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 %, más preferiblemente al menos un 94 %, e incluso más preferiblemente al menos un 95 %, por ejemplo, incluso al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, por ejemplo, un 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEC ID N.º: 1 en el presente documento.

[0088] Debe entenderse que cuando se hace referencia a la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* y variantes de las mismas estas se producen normalmente de forma natural en forma truncada. En particular, el truncamiento puede ser de modo que la alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* mostrada en la SEC ID N.º: 3 en WO 99/19467 o la SEC ID N.º: 1 en el presente documento o variantes de la misma, se trunquen en el terminal C y típicamente tengan alrededor de 491 aminoácidos de longitud, por ejemplo, 480-495 aminoácidos de longitud.

Endoglucanasa termoestable presente y/o añadida durante la licuefacción

[0089] De acuerdo con la invención, una endoglucanasa ("EG") que tiene la secuencia mostrada como SEC ID N.º: 3 o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 3 y además tiene un punto de fusión (DSC) superior a 80, está presente y/o se añade a la etapa de licuefacción i) en combinación con una alfa-amilasa, por ejemplo, una alfa-amilasa bacteriana termoestable. La endoglucanasa y la alfa-amilasa se pueden agregar individualmente o como una composición de una mezcla enzimática.

[0090] La termoestabilidad de una endoglucanasa puede determinarse tal como se describe en la sección "Materiales y métodos" en "Determinación de Td mediante calorimetría diferencial de barrido para endoglucanasas".

[0091] En una realización, la endoglucanasa tiene un punto de fusión (DSC) por encima de 82 °C, por ejemplo, por encima de 84 °C, por ejemplo, por encima de 86 °C, por ejemplo, por encima de 88 °C, por ejemplo, entre 80 °C y 92 °C, por ejemplo, entre 82 °C y 91 °C, por ejemplo entre 84 °C y 90 °C.

[0092] En una realización preferida, la endoglucanasa utilizada en un proceso de la invención comprendida en una composición es una endoglucanasa de la familia 5 de glucósido hidrolasa o endoglucanasa GH5 (consulte la base de datos CAZy en la página web "www.cazy.org"). En una realización, la endoglucanasa GH5 es de la familia EG II, por ejemplo, la endoglucanasa de *Talaromyces leycettanus* mostrada en la SEC ID N.º: 3 en el presente documento.

[0093] En una realización, la endoglucanasa tiene 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 preferiblemente al menos un 94 %, e incluso lo más preferible al menos un 95 %, por ejemplo, incluso al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, por ejemplo, un 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEC ID N.º: 3 en el presente documento. En una realización, la endoglucanasa se obtiene de una cepa del género *Talaromyces*, por ejemplo, una cepa de *Talaromyces leycettanus*.

[0094] En una realización, la endoglucanasa termoestable se agrega en la etapa de licuefacción i) en una dosis de 1-10 000 µg PE (proteína enzimática)/g DS), por ejemplo, 10-1000 µg PE/g DS.

Proteasa presente y/o añadida durante la licuefacción

[0095] En una realización de la invención, una proteasa, por ejemplo, una proteasa termoestable, está presente y/o se añade durante la licuefacción junto con una alfa-amilasa, por ejemplo, una alfa-amilasa termoestable, y una endoglucanasa que tiene la secuencia mostrada como SEC ID N.º 3 o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º 3 y que además tiene un punto de Fusión (DSC) superior a 80 °C, y opcionalmente una enzima generadora de fuentes de carbohidratos, en particular una glucoamilasa, opcionalmente una pululanasa y/u opcionalmente una fitasa.

[0096] Las proteasas se clasifican en función de su mecanismo catalítico en los siguientes grupos: serina proteasas (S), cisteína proteasas (C), proteasas aspárticas (A), metaloproteasas (M) y proteasas desconocidas o aún sin clasificar (U), ver Handbook of Proteolytic Enzymes, A.J.Barrett, N.D.Rawlings, J.F.Woessner (eds), Academic Press (1998), en particular la parte de introducción general.

[0097] En una realización preferida, la proteasa termoestable usada según la invención es una "metaloproteasa" definida como una proteasa perteneciente a EC 3.4.24 (metaloendopeptidasas); preferiblemente EC 3.4.24.39 (metaloproteinasas ácidas).

[0098] Para determinar si una proteasa dada es una metaloproteasa o no, se hace referencia al "Handbook of Proteolytic Enzymes" antes mencionado y a los principios allí indicados. Dicha determinación puede llevarse a cabo para todos los tipos de proteasas, ya sean de origen natural o de tipo salvaje; o proteasas genéticamente modificadas o sintéticas.

[0099] La actividad de la proteasa se puede medir usando cualquier ensayo adecuado en el que se emplee un sustrato que incluya enlaces peptídicos relevantes para la especificidad de la proteasa en cuestión. El ensayo de pH y el de temperatura también se deben adaptar a la proteasa en cuestión. Ejemplos de valores de pH de ensayo son pH 6, 7, 8, 9, 10 u 11. Ejemplos de temperaturas de ensayo son 30, 35, 37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 u 80 °C.

[0100] Ejemplos de sustratos de proteasa son la caseína, por ejemplo, la caseína reticulada con azurina (caseína AZCL). Más adelante se describen dos ensayos de proteasa en la sección "Materiales y métodos", de los cuales el denominado "ensayo de caseína AZCL" es el ensayo preferido.

[0101] En una realización, la proteasa termoestable tiene al menos un 20 %, por ejemplo, al menos un 30 %, por ejemplo, al menos un 40 %, por ejemplo, al menos un 50 %, por ejemplo, al menos un 60 %, por ejemplo, al menos un 70 %, por ejemplo, al menos un 80 %, por ejemplo, al menos un 90 %, por ejemplo, al menos un 95 %, por ejemplo, al menos un 100 % de la actividad de proteasa de la variante de proteasa 196 o proteasa Pfu determinada mediante el ensayo de caseína AZCL descrito en la sección "Materiales y Métodos".

[0102] No existen limitaciones en el origen de la proteasa termoestable utilizada en un proceso o composición de la invención siempre que cumpla con las propiedades de termoestabilidad definidas más adelante.

[0103] En una realización, la proteasa es de origen fúngico.

[0104] La proteasa termoestable puede ser una variante de, por ejemplo, una proteasa de tipo salvaje siempre que la proteasa tenga las propiedades de termoestabilidad definidas en el presente documento. En una realización preferida, la proteasa termoestable es una variante de una metaloproteasa tal como se ha definido anteriormente. En una realización, la proteasa termoestable usada en un proceso o composición de la invención es de origen fúngico, por ejemplo, una metaloproteasa fúngica, por ejemplo, una metaloproteasa fúngica obtenida de una cepa del género *Thermoascus*, preferiblemente una cepa de *Thermoascus aurantiacus*, especialmente *Thermoascus aurantiacus* CGMCC N.º 0670 (clasificado como EC 3.4.24.39).

[0105] En una realización, la proteasa termoestable es una variante de la parte madura de la metaloproteasa mostrada en la SEC ID N.º 2 descrita en WO 2003/048353 o la parte madura de la SEC ID N.º 1 en WO 2010/008841 y mostrada como SEC ID N.º 2 más adelante en el presente documento con mutaciones seleccionadas de la siguiente lista:

- S5* + D79L + S87P + A112P + D142L;
- D79L + S87P + A112P + T124V + D142L;
- S5* + N26R + D79L + S87P + A112P + D142L;
- N26R + T46R + D79L + S87P + A112P + D142L;
- T46R + D79L + S87P + T116V + D142L;

- D79L + P81R + S87P + A112P + D142L;
- A27K + D79L + S87P + A112P + T124V + D142L;
- D79L + Y82F + S87P + A112P + T124V + D142L;
- D79L + Y82F + S87P + A112P + T124V + D142L;
- 5 – D79L + S87P + A112P + T124V + A126V + D142L;
- D79L + S87P + A112P + D142L;
- D79L + Y82F + S87P + A112P + D142L;
- S38T + D79L + S87P + A112P + A126V + D142L;
- D79L + Y82F + S87P + A112P + A126V + D142L;
- 10 – A27K + D79L + S87P + A112P + A126V + D142L;
- D79L + S87P + N98C + A112P + G135C + D142L;
- D79L + S87P + A112P + D142L + T141C + M161C;
- S36P + D79L + S87P + A112P + D142L;
- A37P + D79L + S87P + A112P + D142L;
- 15 – S49P + D79L + S87P + A112P + D142L;
- S50P + D79L + S87P + A112P + D142L;
- D79L + S87P + D104P + A112P + D142L;
- D79L + Y82F + S87G + A112P + D142L;
- S70V + D79L + Y82F + S87G + Y97W + A112P + D142L;
- 20 – D79L + Y82F + S87G + Y97W + D104P + A112P + D142L;
- S70V + D79L + Y82F + S87G + A112P + D142L;
- D79L + Y82F + S87G + D104P + A112P + D142L;
- D79L + Y82F + S87G + A112P + A126V + D142L;
- Y82F + S87G + S70V + D79L + D104P + A112P + D142L;
- 25 – Y82F + S87G + D79L + D104P + A112P + A126V + D142L;
- A27K + D79L + Y82F + S87G + D104P + A112P + A126V + D142L;
- A27K + Y82F + S87G + D104P + A112P + A126V + D142L;
- A27K + D79L + Y82F + D104P + A112P + A126V + D142L;
- A27K + Y82F + D104P + A112P + A126V + D142L;
- 30 – A27K + D79L + S87P + A112P + D142L;
- D79L + S87P + D142L.

[0106] En una realización preferida, la proteasa termoestable es una variante de la metaloproteasa madura descrita como la parte madura de la SEC ID N.º: 2 descrita en WO 2003/048353 o la parte madura de la SEC ID N.º: 1 en WO 2010/008841 o la SEC ID N.º: 2 en el presente documento con las siguientes mutaciones:

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

[0107] En una realización, la variante de proteasa tiene al menos un 75 % de identidad, preferiblemente 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 preferiblemente al menos un 94 %, e incluso lo más preferible al menos un 95 %, por ejemplo, incluso al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, por ejemplo, pero menos de un 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEC ID N.º: 2 descrita en WO 2003/048353 o la parte madura de la SEC ID N.º: 1 en WO 2010/008841 o la SEC ID N.º: 2 en el presente documento.

[0108] La proteasa termoestable también puede obtenerse de cualquier bacteria siempre que la proteasa tenga las propiedades de termoestabilidad definidas según la invención.

[0109] En una realización, la proteasa termoestable se obtiene de una cepa de la bacteria *Pyrococcus*, por ejemplo, una cepa de *Pyrococcus furiosus* (proteasa Pfu).

[0110] 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) y la SEC ID N.º: 13 en el presente documento.

[0111] En otra realización, la proteasa termoestable es una descrita en la SEC ID N.º: 13 en el presente documento o una proteasa que 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: 1 en la patente EE. UU. n.º 6.358.726-B1 o la SEC ID N.º: 13 del presente documento. La proteasa de *Pyrococcus furiosus* se puede comprar en Takara Bio, Japón.

[0112] 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.

[0113] En una realización, una proteasa termoestable usada en un proceso de la invención tiene un valor de termoestabilidad de más del 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C de la forma descrita en el ejemplo 2.

[0114] En una realización, la proteasa tiene una termoestabilidad de más del 30 %, más del 40 %, más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, más del 90 %, más del 100 %, 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.

[0115] En una realización, la proteasa tiene una termoestabilidad de entre el 20 y el 50 %, por ejemplo, entre el 20 y el 40 %, por ejemplo, el 20 y el 30 % determinada como actividad relativa a 80 °C/70 °C.

[0116] En una realización, la proteasa tiene una termoestabilidad de entre el 50 y el 115 %, por ejemplo, entre el 50 y el 70 %, por ejemplo, entre el 50 y el 60 %, por ejemplo, entre el 100 y el 120 %, por ejemplo, entre el 105 y el 115 % determinada como actividad relativa a 80 °C/70 °C.

[0117] En una realización, la proteasa tiene un valor de termoestabilidad de más del 10 % determinado como actividad relativa a 85 °C/70 °C de la forma descrita en el ejemplo 2.

[0118] En una realización, la proteasa tiene una termoestabilidad de más del 10 %, por ejemplo, más del 12 %, más del 14 %, más del 16 %, más del 18 %, más del 20 %, más del 30 %, más del 40 %, más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, más del 90 %, más del 100 %, más del 110 % determinada como actividad relativa a 85 °C/70 °C.

[0119] En una realización, la proteasa tiene una termoestabilidad de entre el 10 y el 50 %, por ejemplo, entre el 10 y el 30 %, por ejemplo, entre el 10 y el 25 % determinada como actividad relativa a 85 °C/70 °C.

[0120] En una realización, la proteasa tiene más del 20 %, más del 30 %, más del 40 %, más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, más del 90 % determinada como actividad restante a 80 °C; y/o

[0121] En una realización, la proteasa tiene más del 20 %, más del 30 %, más del 40 %, más del 50 %, más del 60 %, más del 70 %, más del 80 %, más del 90 % determinada como actividad restante a 84 °C.

[0122] La determinación de la "actividad relativa" y la "actividad restante" se realiza como se describe en el ejemplo 2.

[0123] En una realización, la proteasa puede tener una capacidad de estabilidad por encima de 90, por ejemplo, por encima de 100 a 85 °C tal como se determina usando el ensayo de zeína-BCA según se describe en el ejemplo 3.

[0124] En una realización, la proteasa tiene una estabilidad por encima del 60 %, por ejemplo, por encima del 90 %, por ejemplo, por encima del 100 %, por ejemplo, por encima del 110 % a 85 °C, según se determina usando el ensayo de zeína-BCA.

[0125] En una realización, la proteasa tiene una estabilidad de entre el 60-120, por ejemplo, entre el 70-120 %, por ejemplo, entre el 80-120 %, por ejemplo, entre el 90-120 %, por ejemplo, entre el 100-120 %, por ejemplo, el 110-120 % a 85 °C tal como se determina usando el ensayo de zeína-BCA.

[0126] En una realización, la proteasa termoestable tiene al menos un 20 %, por ejemplo, al menos un 30 %, por ejemplo, al menos un 40 %, por ejemplo, al menos un 50 %, por ejemplo, al menos un 60 %, por ejemplo, al menos un 70 %, por ejemplo, al menos un 80 %, por ejemplo, al menos un 90 %, por ejemplo, al menos un 95 %, por ejemplo, al menos un 100 % de la actividad de la variante de proteasa JTP196 o proteasa Pfu determinada mediante el ensayo de caseína AZCL.

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

[0127] Según la invención, una enzima generadora de fuentes de carbohidratos, en particular una glucoamilasa, preferiblemente una glucoamilasa termoestable, puede estar presente y/o añadirse durante la licuefacción junto con una alfa-amilasa, por ejemplo, una alfa-amilasa termoestable, y una endoglucanasa con

un punto de fusión (DSC) por encima de los 70 °C, y opcionalmente una pululanasa y/u opcionalmente una fitasa.

[0128] 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).

[0129] 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.

[0130] 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).

[0131] 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).

[0132] 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).

[0133] 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 WO 2011/127802 y mostrada en las SEC ID N.º: 14 en el presente documento.

[0134] 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: 14 en el presente documento.

[0135] En una realización, la enzima generadora de fuentes de carbohidratos, en particular glucoamilasa termoestable, es la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* mostrada en la SEC ID N.º: 14 en el presente documento.

[0136] 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 o 14 en el presente documento, que tiene una sustitución K79V (denominada "PE001") (usando la secuencia madura mostrada en la SEC ID N.º: 14 para la numeración). La variante de glucoamilasa K79V tiene una sensibilidad reducida a la degradación de la proteasa en relación con la progenitora tal como se describe en WO 2013/036526.

[0137] 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 se muestra como la secuencia madura en la SEC ID N.º: 9 o 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 o 14 en el presente documento que tiene Val (V) en la posición 79 (usando SEC ID N.º: 14 en el presente documento para la numeración).

[0138] Las variantes de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* contempladas se describen en WO 2013/053801.

[0139] En una realización, estas variantes tienen una sensibilidad reducida a la degradación de la proteasa.

[0140] En una realización, estas variantes tienen termoestabilidad mejorada en comparación con la progenitora.

5 [0141] Más específicamente, en una realización, la glucoamilasa tiene una sustitución K79V (usando la SEC ID N.º: 14 en el presente documento para la numeración), correspondiente a la variante PE001, y además comprende al menos una de las siguientes sustituciones o combinaciones de sustituciones:

10 T65A; o
Q327F; o
E501V; o
Y504T; o
Y504*; o
T65A + Q327F; o
T65A + E501V; o
15 T65A + Y504T; o
T65A + Y504*; o
Q327F + E501V; o
Q327F + Y504T; o
Q327F + Y504*; o
20 E501V + Y504T; o
E501V + Y504*; o
T65A + Q327F + E501V; o
T65A + Q327F + Y504T; o
T65A + E501V + Y504T; o
25 Q327F + E501V + Y504T; o
T65A + Q327F + Y504*; o
T65A + E501V + Y504*; o
Q327F + E501V + Y504*; o
T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
30 T65A + Q327F + E501V + Y504*; o
E501V + Y504T; o
T65A + K161S; o
T65A + Q405T; o
T65A + Q327W; o
35 T65A + Q327F; o
T65A + Q327Y; o
P11F + T65A + Q327F; o
R1K + D3W + K5Q + G7V + N8S + T10K + P11S + T65A + Q327F; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F; o
40 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
P11F + T65A + Q327W; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
45 P11F + T65A + Q327W + E501V + Y504T; o
T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
T65A + S105P + Q327W; o
T65A + S105P + Q327F; o
T65A + Q327W + S364P; o
50 T65A + Q327F + S364P; o
T65A + S103N + Q327F; o
P2N + P4S + P11F + K34Y + T65A + Q327F; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + D445N + V447S; o
P2N + P4S + P11F + T65A + 1172V + Q327F; o
55 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
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + S377T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + V325T + Q327W; o
60 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
P2N + P4S + P11F + D26N + K34Y + T65A + Q327F; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + I375A + E501V + Y504T; o
65 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
K5A + P11F + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
5 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
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + K524T + G526A; o
P2N + P4S + P11F + K34Y + T65A + Q327F + D445N + V447S + E501V + Y504T; o
10 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
P2N + P4S + P11F + T65A + K112S + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + T516P + K524T + G526A; o
15 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
K5A + P11F + T65A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + E501V + Y504T + T516P + K524T + G526A; o
20 P2N + P4S + P11F + T65A + V79A + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + V79G + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + V79I + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + V79L + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + V79S + Q327F + E501V + Y504T; o
25 P2N + P4S + P11F + T65A + L72V + Q327F + E501V + Y504T; o
S255N + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + E74N + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + G220N + Q327F + E501V + Y504T; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Y245N + Q327F + E501V + Y504T; o
30 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
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F + V460S + E501V + Y504T; o
35 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.
- [0142] En una realización preferida, la variante de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* tiene una sustitución K79V usando la SEC ID N.º: 14 en el presente documento para la numeración (variante PE001), y además comprende una de las siguientes mutaciones:
- 40 P11F + T65A + Q327F; o
P2N + P4S + P11F + T65A + Q327F; o
45 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.
- 50 [0143] En una realización, la variante de glucoamilasa, por ejemplo, la variante de glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* tiene al menos un 60 %, por ejemplo, al menos un 70 %, por ejemplo, al menos un 75 % de identidad, preferiblemente 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 %, más preferiblemente al menos un 94 %, e incluso más preferiblemente al menos un 95 %, por ejemplo, incluso al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, por ejemplo, un 100 % de identidad con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 14 en el presente documento.
- 55 [0144] 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.
- 60 Pululanasa presente y/o añadida durante la licuefacción
- 65 [0145] Opcionalmente, una pululanasa puede estar presente y/o agregarse durante la etapa de licuefacción i) junto con una alfa-amilasa, una endoglucanasa que tiene la secuencia mostrada como SEC ID N.º: 3 o una

secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 3 y además tiene un punto de fusión (DSC) por encima de 80 °C, y una proteasa. 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).

[0146] 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.

[0147] Las pululanosas (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.

[0148] Las pululanosas contempladas incluyen las pululanosas 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, la *Bacillus deramificans* descrita como la SEC ID N.º: 4 en WO 01/151620 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.

[0149] Las pululanosas adicionales contempladas según la presente invención incluyen las pululanosas de *Pyrococcus woesei*, específicamente de *Pyrococcus woesei* DSM n.º 3773 descritas en WO 92/02614.

[0150] 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 WO 2011/087836. Más específicamente, la pululanasa puede obtenerse de una cepa del género *Thermococcus*, incluyendo *Thermococcus litoralis* y *Thermococcus hydrothermalis*, por ejemplo, la pululanasa de *Thermococcus hydrothermalis* mostrada en WO 2011/087836 troncada en el sitio X4 justo después del dominio X47. La pululanasa también puede ser un híbrido de las pululanosas de *Thermococcus litoralis* y *Thermococcus hydrothermalis* o una enzima híbrida de *T. hydrothermalis*/*T. litoralis* con sitio de truncamiento X4 descrito en WO 2011/087836 (que se incorpora en el presente documento mediante referencia).

[0151] En otra realización, la pululanasa es tal que comprende un dominio X46 descrito en WO 2011/076123 (Novozymes)

[0152] La pululanasa puede añadirse 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.

[0153] Los productos de pululanasa disponibles comercialmente adecuados incluyen PROMOZYME 400L, PROMOZYME™ D2 (Novozymes A/S, Dinamarca), OPTIMAX L-300 (Genencor Int., EE. UU.) y AMANO 8 (Amano, Japón).

Fitasa presente y/o añadida durante la licuefacción

[0154] Opcionalmente, una fitasa puede estar presente y/o añadirse durante la licuefacción en combinación con una alfa-amilasa y una endoglucanasa con un punto de fusión (DSC) por encima de 70 °C.

[0155] Una fitasa usada de acuerdo con la invención puede ser cualquier enzima capaz de efectuar la liberación de fosfato inorgánico del ácido fítico (mioinositol hexakisfosfato) o de cualquier sal del mismo (fitatos). Las fitasas se pueden clasificar según su especificidad en la etapa de hidrólisis inicial, esto es, según qué grupo fosfato-éster se hidroliza primero. La fitasa que se va a usar en la invención puede tener cualquier especificidad, por ejemplo, una 3-fitasa (EC 3.1.3.8), una 6-fitasa (EC 3.1.3.26) o una 5-fitasa (sin número de EC). En una realización, la fitasa tiene una temperatura óptima superior a 50 °C, por ejemplo, en el intervalo de 50-90 °C.

[0156] La fitasa puede obtenerse de plantas o microorganismos, tales como bacterias u hongos, por ejemplo, hongos de levadura o filamentosos.

[0157] Una fitasa vegetal puede ser de salvado de trigo, maíz, soja o polen de lirio. Las fitasas vegetales adecuadas se describen en Thomlinson et al., Biochemistry, 1 (1962), 166-171; Barrientos et al., Plant. Physiol., 106 (1994), 1489-1495; WO 98/05785; WO 98/20139.

[0158] Una fitasa bacteriana puede ser de los géneros *Bacillus*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Pseudomonas*, *Buttiauxella* o *Escherichia*, específicamente las especies *Bacillus subtilis*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Buttiauxella gaviniae*, *Buttiauxella agrestis*, *Buttiauxella noackies* y *E. coli*. Las fitasas

bacterianas adecuadas se describen en Paver y Jagannathan, 1982, Journal of Bacteriology 151: 1102-1108; Cosgrove, 1970, Australian Journal of Biological Sciences 23: 1207-1220; Greiner et al., Arch. Biochem. Biophys., 303, 107-113, 1993; WO 1997/33976; WO 1997/48812, WO 1998/06856, WO 1998/028408, WO 2004/085638, WO 2006/037327, WO 2006/038062, WO 2006/063588, WO 2008/092901, WO 2008/116878 y WO 2010/034835.

[0159] Una fitasa de levadura puede obtenerse de los géneros *Saccharomyces* o *Schwanniomyces*, específicamente las especies *Saccharomyces cerevisiae* o *Schwanniomyces occidentalis*. La enzima anterior se ha descrito como una levadura adecuada. Las fitasas se describen en Nayini et al, 1984, Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 17: 24-26; Wodzinski et al., Adv. Appl. Microbiol., 42, 263-303; AU-A-24840/95; Las fitasas de hongos filamentosos pueden obtenerse del filo fúngico de Ascomycota (ascomicetos) o del filo Basidiomycota, por ejemplo, los géneros *Aspergillus*, *Thermomyces* (también llamado *Humicola*), *Myceliophthora*, *Monascus*, *Penicillium*, *Peniophora*, *Agrocybe*, *Paxillus*, o *Trametes*, específicamente las especies *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* var. *awamori* *Aspergillus ficuum*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus oryzae*, *T. lanuginosus* (también conocido como *H. lanuginosa*), *Myceliophthora thermophila*, *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, *Monascus anka*, *Paxillus involutus* o *Trametes pubescens*. Fitasas fúngicas adecuadas se describen en Yamada et al., 1986, Agric. Biol. Chem 322: 1275-1282; Piddington et al., 1993, Gene 133: 55-62; EP 684 313; EP 0 420 358; EP 0 684 313; WO 1998/28408; WO 1998/28409; JP 7-67635; WO 1998/44125; WO 1997/38096; WO 1998/13480.

[0160] En una realización preferida, la fitasa se obtiene de *Buttiauxella*, por ejemplo, *Buttiauxella gaviniae*, *Buttiauxella agrestis* o *Buttiauxella noackies*, por ejemplo, las descritas como SEC ID N.º: 2, SEC ID N.º: 4 y SEC ID N.º: 6, respectivamente, en WO 2008/092901.

[0161] En una realización preferida, la fitasa se obtiene de *Citrobacter*, por ejemplo, *Citrobacter braakii*, como la descrita en WO 2006/037328.

[0162] Las fitasas modificadas o las variantes de fitasa se pueden obtener por métodos conocidos en la técnica, en particular por los métodos descritos en EP 897010; EP 897985; WO 99/49022; WO 99/48330, WO 2003/066847, WO 2007/112739, WO 2009/129489 y WO 2010/034835.

[0163] Los productos con contenido de fitasa disponibles comercialmente incluyen BIO-FEED PHYTASE™, PHYTASE NOVO™ CT o L (todos de Novozymes), LIQMAX (DuPont) o RONOZYME™ NP, RONOZYME® HiPhos, RONOZYME® P5000 (CT), NATUPHOS™ NG 5000 (de DSM).

Glucoamilasa presente y/o añadida durante la sacarificación y/o la fermentación

[0164] De acuerdo con la invención, una glucoamilasa, está presente y/o se añade durante la sacarificación y la fermentación.

[0165] En una realización preferida, la glucoamilasa 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 *T. emersonii*,
Glucoamilasa

[0166] 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).

[0167] 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.

[0168] Las glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen glucoamilasas del género *Clostridium*, en particular *C. Thermoamylolyticum* (EP 135,138), y *C. thermohydrosulfuricum* (WO 86/01831).

[0169] Las glucoamilasas fúngicas contempladas incluyen *Trametes cingulata*, *Pachykytospora papyracea* y *Leucopaxillus giganteus* todas descritas en WO 2006/069289; y *Peniophora rufomarginata* descrita en WO2007/124285; o una mezcla de las mismas. También se contempla la glucoamilasa híbrida según 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 (cuyos híbridos se incorporan en el presente documento mediante referencia).

[0170] 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), o de una cepa del género *Gloeophyllum*, en particular una cepa de *Gloeophyllum* tal como se describe en WO 2011/068803 (SEC ID N.º: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 o 16) o una cepa del género *Nigrofores*, en particular una cepa de *Nigrofores* sp. descrita en WO 2012/064351 (SEC ID N.º: 2) (todas las referencias incorporadas en el presente documento mediante referencia). 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 %, por ejemplo, un 100 % de identidad con cualquiera de las partes maduras de las secuencias enzimáticas mencionadas anteriormente.

[0171] 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.

[0172] 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 Genencor Int.); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME™ G900, G-ZYME™ y G990 ZR (de Genencor Int.).

Amilasa maltogénica

[0173] 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, que se incorporan aquí mediante referencia. 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.

Composición de celulasa o enzima celulolítica presente y/o añadida durante la sacarificación y/o la fermentación o la SSF

[0174] En una realización preferida de la invención, una composición de celulasa o enzima celulolítica está presente y/o se añade durante la sacarificación en el paso ii) y/o la fermentación en el paso iii) o la SSF.

[0175] La composición de celulasa o enzima celulolítica puede comprender una o más enzimas celulolíticas. La composición de celulasa o enzima celulolítica puede ser de cualquier origen. En una realización preferida, la composición de celulasa o enzima celulolítica comprende enzimas celulolíticas de origen fúngico.

[0176] En una realización, la composición de celulasa o enzima celulolítica se obtiene de una cepa de *Trichoderma*, por ejemplo, *Trichoderma reesei*; o una cepa de *Humicola*, por ejemplo, *Humicola insolens*; o una cepa de *Chrysosporium*, por ejemplo, *Chrysosporium lucknowense*; o una cepa de *Penicillium*, por ejemplo, *Penicillium decumbens*. En una realización preferida, la composición de enzima celulolítica se obtiene de una cepa de *Trichoderma reesei*.

[0177] La celulasa puede ser una beta-glucosidasa, una celobiohidrolasa y una endoglucanasa o una combinación de las mismas.

[0178] La composición de enzima celulolítica puede comprender una beta-glucosidasa, una celobiohidrolasa y una endoglucanasa.

[0179] En una realización, la composición de celulasa o enzima celulolítica que comprende uno o más polipéptidos seleccionados del grupo que consta de:

beta-glucosidasa;
celobiohidrolasa I;
celobiohidrolasa II;
o una mezcla de las mismas.

[0180] En una realización preferida, la composición de celulasa o enzima celulolítica comprende además un polipéptido GH61 que tiene actividad potenciadora celulolítica. La actividad potenciadora celulolítica se define y se determina tal como se describe en WO 2011/041397 (incorporado mediante referencia).

[0181] El término "polipéptido GH61 con actividad potenciadora celulolítica" significa un polipéptido GH61 que mejora la hidrólisis de un material celulósico mediante enzimas que tienen actividad celulolítica. Para los fines de la presente invención, la actividad de mejora celulolítica puede determinarse 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 (rastrojo de maíz pretratado), 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 50 °C 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 preferido, una mezcla de CELLUCLAST™ 1.5L (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* según 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.

[0182] La composición de enzima celulolítica puede comprender una beta-glucosidasa, preferiblemente una obtenida de una cepa del género *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus oryzae* como la descrita en WO 2002/095014 o la proteína de fusión que tiene actividad beta-glucosidasa descrita en WO 2008/057637 (vea las SEC ID N.º: 74 o 76), o *Aspergillus fumigatus*, como la descrita en la SEC ID N.º: 2 en WO 2005/047499 o la SEC ID N.º: 29 en el presente documento o una variante de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* descrita en WO 2012/044915; 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*.

[0183] En una realización, la beta-glucosidasa es de una cepa de *Aspergillus*, por ejemplo, una cepa de *Aspergillus fumigatus*, por ejemplo, beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (SEC ID N.º: 29 en el presente documento), o una variante de la misma, que comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consta de L89M, G91L, F100D, 1140V, 1186V, S283G, N456E y F512Y; por ejemplo, una variante de la misma con las siguientes sustituciones:
F100D + S283G + N456E + F512Y;
L89M + G91L + 1186V + 1140V;
1186V + L89M + G91L + 1140V + F100D + S283G + N456E + F512Y.

[0184] La beta-glucosidasa progenitora tiene al menos un 60 % de identidad, por ejemplo, al menos un 70 %, por ejemplo, al menos un 80 %, 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 %, por ejemplo, un 100 % de identidad con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 29 en el presente documento.

[0185] En caso de que la beta-glucosidasa sea una variante de beta-glucosidasa, tiene al menos un 60 % de identidad, por ejemplo, al menos un 70 %, por ejemplo, al menos un 80 %, 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 %, pero menos de un 100 % de identidad con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 29 en el presente documento.

[0186] En caso de que la composición de la enzima celulolítica pueda comprender un polipéptido GH61, puede ser uno derivado del género *Thermoascus*, por ejemplo, una cepa de *Thermoascus aurantiacus*, como la descrita en WO 2005/074656 como SEC ID N.º: 2 o la SEC ID N.º: 30 en el presente documento; 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 derivada de una cepa de *Penicillium*, por ejemplo, una cepa de *Penicillium emersonii*, como la descrita en WO 2011/041397 como SEC ID N.º: 2 o la SEC ID N.º: 31 en el presente documento.

[0187] En una realización preferida, el polipéptido GH61, por ejemplo, uno derivado de una cepa de *Penicillium emersonii* se selecciona del grupo que consta de:

(i) un polipéptido GH61 que comprende el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 31 en el presente documento;
(ii) un polipéptido GH61 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 %, por ejemplo, al menos un 70 %, por ejemplo, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 31 en el presente documento.

[0188] En una realización, la composición de enzima celulolítica comprende una celobiohidrolasa I (CBH I), por ejemplo, una derivada de una cepa del género *Aspergillus*, por ejemplo, una cepa de *Aspergillus fumigatus*, por ejemplo, la Cel7a CBHI descrita en la SEC ID N.º: 6 en WO 2011/057140 o la SEC ID N.º: 32 en el presente documento, o una cepa del género *Trichoderma*, por ejemplo, una cepa de *Trichoderma reesei*.

[0189] En una realización preferida, la celobiohidrolasa I, por ejemplo, una derivada de una cepa de *Aspergillus fumigatus*, se selecciona del grupo que consta de:

(i) una celobiohidrolasa I que comprende el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 32 en el presente documento;

(ii) una celobiohidrolasa I que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 %, por ejemplo, al menos un 70 %, por ejemplo, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 32 en el presente documento.

[0190] En una realización, la composición de enzima celulolítica comprende una celobiohidrolasa II (CBH II), por ejemplo, una derivada de una cepa del género *Aspergillus*, por ejemplo, una cepa de *Aspergillus fumigatus*, por ejemplo, la que se describe como la SEC ID N.º: 33 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*.

[0191] En una realización preferida, la celobiohidrolasa II, por ejemplo, una derivada de una cepa de *Aspergillus fumigatus*, se selecciona del grupo que consta de:

(i) una celobiohidrolasa II que comprende el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 33 en el presente documento;

(ii) una celobiohidrolasa II que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 %, por ejemplo, al menos un 70 %, por ejemplo, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de identidad con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 33 en el presente documento.

[0192] En una realización, la composición de enzima celulolítica comprende un polipéptido GH61 que tiene actividad potenciadora celulolítica y una beta-glucosidasa.

[0193] En una realización, la composición de enzima celulolítica comprende un polipéptido GH61 que tiene actividad potenciadora celulolítica derivada de una cepa de *Penicillium*, por ejemplo, una cepa de *Penicillium emersonii* por ejemplo, la descrita como la SEC ID N.º: 2 en WO 2011/041397 o la SEC ID N.º: 31 en el presente documento, y una beta-glucosidasa.

[0194] En una realización, la composición de enzima celulolítica comprende un polipéptido GH61 que tiene actividad potenciadora celulolítica, una beta-glucosidasa y una CBH I.

[0195] En una realización, la composición de enzima celulolítica comprende un polipéptido GH61 que tiene actividad potenciadora celulolítica derivada de una cepa de *Penicillium*, por ejemplo, una cepa de *Penicillium emersonii* por ejemplo, la descrita como la SEC ID N.º: 2 en WO 2011/041397 o la SEC ID N.º: 31 en el presente documento, una beta-glucosidasa y una CBH I.

[0196] En una realización, la composición de enzima celulolítica comprende un polipéptido GH61 que tiene actividad potenciadora celulolítica, una beta-glucosidasa, una CBH I y una CBH II.

[0197] En una realización, la composición de enzima celulolítica comprende un polipéptido GH61 que tiene actividad potenciadora celulolítica derivada de una cepa de *Penicillium*, por ejemplo, una cepa de *Penicillium emersonii* por ejemplo, la descrita como la SEC ID N.º: 2 en WO 2011/041397 o la SEC ID N.º: 31 en el presente documento, una beta-glucosidasa, una CBH I y una CBH II.

[0198] En una realización, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además un polipéptido GH61A de *Thermoascus aurantiacus* (SEC ID N.º: 2 en WO 2005/074656 o SEC ID N.º: 30 en el presente documento) y una proteína de fusión de beta-glucosidasa de *Aspergillus oryzae* (WO 2008/057637).

[0199] En una realización, la composición de enzima 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 o la SEC ID N.º: 30 en el presente documento) y beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (SEC ID N.º: 2 de WO 2005/047499 o la SEC ID N.º: 29 en el presente documento).

[0200] En una realización, la composición de enzima celulolítica es una composición de enzima celulolítica de *Trichoderma reesei*, que comprende además un polipéptido GH61A de *Penicillium emersonii* descrito como la SEC ID N.º: 2 en WO 2011/041397 o la SEC ID N.º: 10 en el presente documento y beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* descrita como la SEC ID N.º: 2 en WO 2005/047499 o la SEC ID N.º: 29 en el presente documento, o una variante de las mismas, cuya variante tiene una de las siguientes sustituciones o preferiblemente todas ellas: F100D, S283G, N456E, F512Y.

[0201] En una realización, la composición de enzima celulolítica comprende uno o más de los siguientes componentes:

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

[0202] En una realización, la beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (SEC ID N.º: 29 en el presente documento) comprende una o más sustituciones seleccionadas del grupo que consta de L89M, G91L, F100D, I140V, I186V, S283G, N456E y F512Y; por ejemplo, una variante de la misma con las siguientes sustituciones:

F100D + S283G + N456E + F512Y;
L89M + G91L + I186V + I140V; o
I186V + L89M + G91L + I140V + F100D + S283G + N456E + F512Y.

[0203] En una realización, la composición de enzima celulolítica comprende además el polipéptido GH61 de *Penicillium* sp. mostrado en la SEC ID N.º: 31 en el presente documento; o un polipéptido GH61 que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 60 %, por ejemplo, al menos un 70 %, por ejemplo, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %, por ejemplo, un 100 % de identidad con el polipéptido maduro de la SEC ID N.º: 31 en el presente documento.

[0204] En una realización, la composición de enzima celulolítica comprende los siguientes componentes:

- (i) celobiohidrolasa I de *Aspergillus fumigatus* mostrada en la SEC ID N.º: 32 en el presente documento;
- (ii) celobiohidrolasa II de *Aspergillus fumigatus* mostrada en la SEC ID N.º: 33 en el presente documento;
- (iii) variante de beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* mostrada en la SEC ID N.º: 29 con las siguientes sustituciones: F100D + S283G + N456E + F512Y; y
- (iv) polipéptido GH61 de *Penicillium* sp. mostrado en la SEC ID N.º: 31 en el presente documento.

[0205] En una realización, la composición de enzima celulolítica se dosifica (es decir, durante la sacarificación en el paso ii) y/o la fermentación en el paso iii) o la SSF) de 0.0001-3 mg PE/g DS, preferiblemente 0.0005-2 mg PE/g DS, preferiblemente 0.001 -1 mg/g DS, más preferiblemente de 0.005-0.5 mg PE/g DS, aún más preferiblemente 0.01-0.1 mg PE/g DS.

Composición

[0206] Se describe una composición que comprende una alfa-amilasa, por ejemplo, una alfa-amilasa termoestable, y una endoglucanasa que tiene la secuencia mostrada como SEC ID N.º: 3 o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 3 y que además tiene un punto de fusión (DSC) por encima de 80 °C; opcionalmente una proteasa, por ejemplo, una proteasa termoestable. La composición también puede comprender además una enzima generadora de fuentes de carbohidratos, en particular una glucoamilasa, opcionalmente una pululanasa y opcionalmente también una fitasa.

[0207] Por lo tanto, la composición puede comprender:

- i) una alfa-amilasa;
- ii) una endoglucanasa que tiene la secuencia mostrada como SEC ID N.º: 3 o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 3 y además tiene un punto de fusión (DSC) superior a 80 °C;
- iii) opcionalmente una proteasa;
- iv) opcionalmente una enzima generadora de fuentes de carbohidratos.

[0208] Alfa-amilasa: La alfa-amilasa puede ser cualquier alfa-amilasa. En una realización preferida, la alfa-amilasa es una alfa-amilasa bacteriana, como las alfa-amilasas derivadas del género *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus stearothermophilus*.

[0209] La alfa-amilasa puede ser una alfa-amilasa termoestable. La alfa-amilasa termoestable puede tener una T_{1/2} (min) a pH 4.5, 85 °C, CaCl₂ 0.12 mM de al menos 10, por ejemplo, al menos 15, por ejemplo, al menos 20, por ejemplo, al menos 25, por ejemplo, al menos 30, por ejemplo, al menos 40, por ejemplo, al menos 50, por ejemplo, al menos 60, por ejemplo, entre 10-70, por ejemplo, entre 15-70, por ejemplo, entre 20-70, por ejemplo, entre 25-70, por ejemplo, entre 30-70, por ejemplo, entre 40-70, por ejemplo, entre 50-70, por ejemplo, entre 60-70.

[0210] En una realización, la alfa-amilasa se selecciona del grupo de variantes de alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, en particular las que se truncan para tener 491 aminoácidos de longitud, por ejemplo, de 480 a 495 aminoácidos de longitud, con mutaciones seleccionadas del grupo de:

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

[0211] Debe entenderse que estas alfa-amilasas son solo ejemplos específicos. Cualquier alfa-amilasa descrita anteriormente en la sección "Alfa-amilasa presente y/o añadida durante la licuefacción" puede usarse como componente de alfa-amilasa en una composición de la invención.

[0212] Endoglucanasa: El componente de endoglucanasa en la composición puede ser cualquier endoglucanasa que tenga la secuencia mostrada como SEC ID N.º: 3 o una secuencia que tenga al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 3 y que además tenga un punto de fusión (DSC) superior a 80 °C determinado usando el "Ensayo de calorimetría diferencial de barrido (DSC)" descrito en la sección "Materiales y métodos" más adelante.

[0213] En una realización, la endoglucanasa tiene un punto de fusión (DSC) por encima de 82 °C, por ejemplo, por encima de 84 °C, por ejemplo, por encima de 86 °C, por ejemplo, por encima de 88 °C, por ejemplo, entre 80 °C y 92 °C, por ejemplo, entre 82 °C y 91 °C, por ejemplo entre 84 °C y 90 °C.

[0214] La endoglucanasa utilizada en un proceso de la invención comprendida en una composición es una endoglucanasa de la familia 5 de glucósido hidrolasa o endoglucanasa GH5 (consulte la base de datos CAZy en la página web "www.cazy.org"). La endoglucanasa GH5 es la endoglucanasa de *Talaromyces leycettanus* mostrada en la SEC ID N.º: 3 en el presente documento.

[0215] En una realización, la endoglucanasa tiene 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 preferiblemente al menos un 94 %, e incluso lo más preferible al menos un 95 %, por ejemplo, incluso al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, por ejemplo, un 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEC ID N.º: 3 en el presente documento. En una realización, la endoglucanasa se obtiene de una cepa del género *Talaromyces*, por ejemplo, una cepa de *Talaromyces leycettanus*.

[0216] En una realización preferida, la endoglucanasa tiene al menos un 90 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEC ID N.º: 3 derivada de una cepa de *Talaromyces leycettanus* que tiene un punto de fusión (DSC) por encima de 80 °C.

[0217] Proteasa: Una composición puede comprender opcionalmente una proteasa, por ejemplo, una proteasa termoestable. No hay limitación en el origen del componente de proteasa siempre que cumpla con las propiedades de termoestabilidad definidas en el presente documento.

[0218] En una realización, la proteasa es de origen fúngico. En una realización, la proteasa es una metaloproteasa. En una realización, la proteasa se obtiene de *Thermoascus aurantiacus* mostrada en la SEC ID N.º: 2 en el presente documento.

[0219] En una realización preferida, la proteasa es una variante de la proteasa de *Thermoascus aurantiacus* mencionada anteriormente que tiene un valor de termoestabilidad de más del 20 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C determinada como se describe en el ejemplo 2.

[0220] En una realización preferida específica, la proteasa es una variante de la metaloproteasa derivada de *Thermoascus aurantiacus* descrita como la parte madura de la SEC ID N.º: 2 descrita en WO 2003/048353 o la parte madura de la SEC ID N.º: 1 en WO 2010/008841 o la SEC ID N.º: 2 en el presente documento con mutaciones seleccionadas del grupo de:

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

[0221] En otra realización, la proteasa es una proteasa bacteriana. [0221] En otra realización, la proteasa es una serina proteasa. En una realización preferida, la proteasa se obtiene de una cepa de *Pyrococcus furiosus*, como la que se muestra en la SEC ID N.º: 1 en EE. UU. 6.358.726 o la SEC ID N.º: 13 en el presente documento.

[0222] Debe entenderse que estas proteasas son solo ejemplos. Cualquier proteasa descrita anteriormente en la sección "Proteasa presente y/o añadida durante la licuefacción" puede usarse como el componente de proteasa en una composición.

[0223] Enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos: Opcionalmente, una composición puede comprender además una enzima generadora de fuentes de carbohidrato, en particular una glucoamilasa, por ejemplo, una glucoamilasa termoestable que tiene una estabilidad térmica a 85 °C, pH 5.3, de al menos un 30 %, preferiblemente al menos un 35 %.

[0224] Dicha enzima generadora de fuentes de carbohidratos puede ser una glucoamilasa termoestable que tiene una estabilidad térmica de actividad relativa a 85 °C de al menos 20 %, al menos un 30 %, preferiblemente al menos un 35 % determinada tal como se describe en el ejemplo 4 (estabilidad térmica).

[0225] 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).

[0226] 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).

[0227] En una realización 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* descrita como la SEC ID N.º: 2 en WO 2011/127802 (que se incorpora aquí mediante referencia), o una variante de la misma, y se muestra en las SEC ID N.º: 9 o 14 en el presente documento.

[0228] En una realización, la glucoamilasa, o una variante de la misma, puede tener 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 %, por ejemplo, un 100 % de identidad con el polipéptido maduro que se muestra en la SEC ID N.º: 2 en WO 2011/127802 o la SEC ID N.º: 14 en el presente documento.

[0229] En una realización específica y 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 tiene una sensibilidad reducida a la degradación de la proteasa en relación con la progenitora tal como se describe en WO 2013/036526.

[0230] Ejemplos de variantes de glucoamilasa termoestable de *Penicillium oxalicum* adecuadas se han enumerado anteriormente y en los ejemplos 17 y 18 más adelante.

[0231] En una realización, la enzima generadora de fuentes de carbohidratos, por ejemplo, glucoamilasa, por ejemplo, la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum*, tiene actividad lateral de pululanasa.

[0232] Debe entenderse que estas enzimas generadoras de fuentes de carbohidratos, en particular glucoamilasas, son solo ejemplos. Cualquier enzima generadora de fuentes de carbohidratos descrita anteriormente en la sección "Enzima generadora de fuentes de carbohidratos presente y/o añadida durante la licuefacción" puede usarse como componente en una composición de la invención.

[0233] En una realización preferida, la enzima generadora de fuentes de carbohidratos es la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* mostrada en la SEC ID N.º: 14 en el presente documento o una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con la misma que comprende además una sustitución K79V.

[0234] Pululanasa: Opcionalmente, una composición puede comprender además una pululanasa. La pululanasa puede ser de cualquier origen.

[0235] En una realización, la pululanasa es de origen bacteriano. En una realización, la pululanasa se obtiene de una cepa de *Bacillus* sp.

[0236] En una realización, la pululanasa es una pululanasa de la familia GH57. En una realización preferida, la pululanasa incluye un dominio X47 tal como se describe en WO 2011/087836 (que se incorporan aquí mediante referencia).

[0237] Específicamente, la pululanasa puede obtenerse de una cepa del género *Thermococcus*, incluyendo *Thermococcus litoralis* y *Thermococcus hydrothermalis*, o un híbrido de las mismas.

[0238] La pululanasa puede ser la pululanasa de *Thermococcus hydrothermalis* mostrada en la SEC ID N.º: 11 en el presente documento truncada en el sitio X4 o una enzima híbrida de *Thermococcus hydrothermalis*/*T. litoralis* con sitio de truncamiento X4 tal como se describe en WO 2011/087836.

[0239] En otra realización, la pululanasa es tal que comprende un dominio X46 descrito en WO 2011/076123 (Novozymes)

[0240] Debe entenderse que estas pululanosas son solo ejemplos específicos. Cualquier pululanasa descrita anteriormente en la sección "Pululanasa presente y/o añadida durante la licuefacción" puede usarse como componente opcional de pululanasa en una composición de la invención.

[0241] Fitasa Una composición puede además comprender opcionalmente una fitasa. La fitasa puede ser de cualquier origen.

[0242] En una realización, la fitasa es de origen bacteriano. En una realización, la fitasa se obtiene de una cepa de *Buttiauxella*, por ejemplo, *Buttiauxella gaviniae* como la descrita como la SEC ID N.º: 2 (los aminoácidos 1-33 son péptidos señal esperados) en WO 2008/092901; o *Buttiauxella agrestis*, como la que se muestra como la SEC ID N.º: 4 (se espera que los aminoácidos -9 a -1 sean parte del péptido señal) en WO 2008/092901; o *Buttiauxella noackies*, como la que se muestra como la SEC ID N.º: 6 en WO 2008/092901.

[0243] En otra realización, la fitasa se obtiene de una cepa de *Citrobacter*, por ejemplo, una cepa de *Citrobacter braakii*, como las descritas como las SEC ID N.º: 2 o 4 en WO 2006/037328.

[0244] Debe entenderse que estas fitasas son solo ejemplos específicos. Cualquier fitasa descrita anteriormente en la sección "Fitasa presente y/o añadida durante la licuefacción" puede usarse como componente opcional de pululanasa en una composición de la invención.

[0245] En una realización preferida, la fitasa se obtiene de una cepa de *Buttiauxella*
Materiales y métodos

Materiales:

[0246]

Alfa-amilasa 369 (AA369): Alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus* con las mutaciones: I181 * + G182 * + N193F + V59A + Q89R + E129V + K177L + R179E + Q254S + M284V truncadas a 491 aminoácidos (SEC ID NO: 1 en el presente documento).

Endoglucanasa TL (EG TL): Endoglucanasa GH5 de *Talaromyces leycettanus* descrita en WO2013/019780 como la SEC ID N.º: 2 y SEC ID N.º: 3 en el presente documento. (P23YSQ).

Endoglucanasa PC (EG PC): Endoglucanasa GH5 de *Penicillium capsulatum* descrita como la SEC ID N.º: 4 en el presente documento. (P244HZ)

Endoglucanasa TS (EG TS): Endoglucanasa GH5 de *Trichophaea saccata* descrita como la SEC ID N.º: 5 en el presente documento. (P2PJ)

Endoglucanasa TT (EG TT): Endoglucanasa GH45 de *Thielavia terrestris* descrita en la SEC ID N.º: 6 en el presente documento. (P24PYU)

Endoglucanasa SF (EG SF): Endoglucanasa GH45 de *Sordaria fimicola* descrita en la solicitud pendiente PCT/CN2012/080220 como la SEC ID N.º: 2 y SEC ID N.º: 7 en el presente documento (P2CF).

Proteasa 196: (JTP196) Metaloproteasa derivada de *Thermoascus aurantiacus* CGMCC n.º 0670 descrita como los aminoácidos 1-177 en la SEC ID NO: 2 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.

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.

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

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).

Glucoamilasa AC: 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 de WO 2006/069290 como actividades secundarias; y composición de enzima celulolítica que comprende el polipéptido GH61A que tiene actividad potenciadora celulolítica obtenida de una cepa de *Penicillium emersonii* (SEC ID N.º: 2 en WO 2011/041397), beta-glucosidasa de *Aspergillus fumigatus* (SEC ID N.º: 22 en WO 2005/047499) 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; y CBH II de *Aspergillus fumigatus* descrita como la SEC ID N.º: 18 en WO 2011/057140.

Levadura: RED STAR ETHANOL REDTM disponible en Red Star/Lesaffre, EE. UU.

Métodos

Determinación de Td mediante calorimetría diferencial de barrido para endoglucanasas.

[0247] La termoestabilidad de una enzima se determina mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) utilizando un calorímetro diferencial de barrido VP-capillary (MicroCal Inc., Piscataway, NJ, EE. UU.). La temperatura de desnaturalización térmica, Td (°C), se tomó como la parte superior del pico de desnaturalización (pico endotérmico principal) en los termogramas (Cp vs. T) obtenidos después de calentar soluciones enzimáticas (aprox. 0.5 mg/ml) en tampón (acetato 50 mM, pH 5.0) a una velocidad de calentamiento programada constante de 200 K/h.

[0248] Las soluciones de muestra y de referencia (aprox. 0.2 ml) se cargaron en el calorímetro (referencia: tampón sin enzima) desde las condiciones de almacenamiento a 10 °C y se equilibraron térmicamente durante 20 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.

[0249] Identidad: La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad".

[0250] 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 "alineal", 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.

[0251] "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).

Ensayos de proteasa

Ensayo de AZCL-caseína

[0252] 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 añaden 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.

Ensayo de APN

[0253] La muestra que contiene 50 µl de proteasa se agrega a una placa de microtitulación y el ensayo se inicia añadiendo 100 µl de sustrato de APN 1 mM (5 mg disueltos en 100 µl de DMSO y luego diluidos hasta 10 ml con tampón Bórax/NaH₂PO₄ pH 9.0). El aumento en OD₄₀₅ a temperatura ambiente se monitoriza como una medida de la actividad de proteasa.

Actividad de glucoamilasa (AGU)

[0254] La actividad de glucoamilasa se puede medir en unidades de glucoamilasa (AGU).

[0255] La unidad de glucoamilasa novo (AGU) se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 micromol de maltosa por minuto en condiciones estándar de 37 °C, pH 4.3, sustrato: maltosa 23.2 mM, tampón: acetato 0.1 M, tiempo de reacción 5 minutos.

[0256] Se puede usar un sistema de autoanizador. Se agrega mutarotasa al reactivo de glucosa deshidrogenasa para que cualquier alfa-D-glucosa presente se convierta en beta-D-glucosa. La glucosa deshidrogenasa reacciona específicamente con la beta-D-glucosa en la reacción mencionada anteriormente, formando NADH, lo que se determina usando un fotómetro a 340 nm como una medida de la concentración de glucosa original.

<u>Incubación de AMG:</u>	
Sustrato:	maltosa 23.2 mM
Tampón:	acetato 0.1 M
pH:	4.30 ± 0.05
Temperatura de incubación:	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Rango de trabajo de la enzima:	0.5-4.0 AGU/ml
<u>Reacción de color:</u>	
GlucDH:	430 U/L
Mutarotasa	9 U/L
NAD:	0.21 mM
Tampón:	fosfato 0.12 M; NaCl 0.15 M
pH:	7.60 ± 0.05
Temperatura de incubación:	37°C ± 1
Tiempo de reacción:	5 minutos
Longitud de onda:	340 nm

[0257] Una carpeta (EB-SM-0131.02/01) que describe este método analítico con más detalle está disponible a petición en Novozymes A/S, Dinamarca.

Actividad de alfa-amilasa (KNU)

[0258] 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 negruzco, 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.

[0259] 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.

[0260] Una carpeta EB-SM-0009.02/01 que describe este método analítico con más detalle está disponible previa solicitud en Novozymes A/S, Dinamarca.

Actividad de alfa-amilasa (KNU-A)

5 [0261] Una carpeta EB-SM-5091.02-D para determinar la actividad KNU-A está disponible previa solicitud en Novozymes A/S, Dinamarca.

Actividad de alfa-amilasa KNU (S)

10 [0262] La amilasa de BS en muestras y la enzima alfa-glucosidasa en el kit de reactivos hidrolizan el sustrato (4,6-etilideno(G7)-p-nitrofenil(G1)-alfa-D-maltoheptaósido (etilideno-G7PNP)) a glucosa y al p-nitrofenol de color amarillo.

[0263] La velocidad de formación de p-nitrofenol puede observarse mediante Konelab 30. Esta es una expresión de la velocidad de reacción y, por lo tanto, de la actividad enzimática.

15

Condiciones de reacción

Reacción:	
pH	: 7.15
Temperatura	: 37 °C
Tiempo de reacción	: 180 segundos
Detección	
Longitud de onda	: 405 nm
Tiempo de medición	: 120 segundos

Definición de la unidad

20 [0264] La actividad de la amilasa de *Bacillus stearothermophilus* (amilasa BS) se mide en KNU(S), unidades Kilo Novo (*stearothermophilus*), en relación con un estándar enzimático de una potencia declarada.

[0265] Este método analítico se describe con más detalles en EB-SM-0221.02 disponible en Novozymes A/S, Dinamarca, previa solicitud.

25 Determinación de la actividad de FAU

[0266] Una unidad de alfa-amilasa fúngica (FAU) se define como la cantidad de enzima que descompone 5.26 g de almidón (Merck Amylum soluble Erg. B.6, lote 9947275) por hora en función de las siguientes condiciones estándar:

30

Sustrato	Almidón soluble
Temperatura	37 °C
pH	4.7
Tiempo de reacción	7-20 minutos

Determinación de la actividad de la alfa-amilasa ácida (AFAU)

35 [0267] La actividad de la alfa-amilasa ácida se mide en AFAU (unidades de alfa-amilasa fúngica ácida), que se determinan en relación con un estándar enzimático.

[0268] El estándar utilizado es AMG 300 L (de Novozymes A/S, glucoamilasa de tipo salvaje de *Aspergillus niger* G1, también descrito en Boel et al. (1984), EMBO J. 3 (5), págs. 1097-1102) y WO 92/00381). La alfa-amilasa neutra en este AMG cae por debajo de 0.05 FAU/ml después del almacenamiento a temperatura ambiente durante 3 semanas a partir de aprox. 1 FAU/ml.

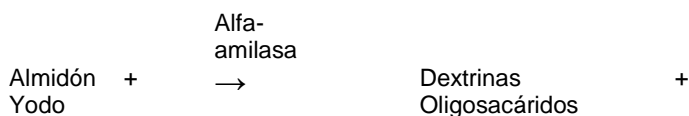
40

[0269] La actividad de la alfa-amilasa ácida en este estándar AMG se determina de acuerdo con la siguiente descripción. En este método, 1 AFAU se define como la cantidad de enzima que degradan 5.260 mg de materia seca de almidón por hora en condiciones estándar.

45

[0270] El yodo forma un complejo azul con el almidón pero no con sus productos de degradación. La intensidad del color es, por lo tanto, directamente proporcional a la concentración de almidón. La actividad de la amilasa se determina usando colorimetría inversa como una reducción en la concentración de almidón en condiciones analíticas específicas.

50



40 °C, pH
2.5
azul/violeta t = 23 seg. Decoloración

Condiciones estándar/condiciones de reacción: (por minuto)

Sustrato:	Almidón, 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:	lambda = 590 nm
Concentración de enzimas:	0.025 AFAU/ml
Rango de trabajo de la enzima:	0.01-0.04 AFAU/ml

- 5 [0271] Si se prefieren más detalles, estos se pueden encontrar en EB-SM-0259.02/01 disponible previa solicitud en Novozymes A/S.

Determinación de la actividad de pululanasa (NPUN)

- 10 [0272] 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.

- 15 [0273] 1 ml de muestra diluida o estándar se incubaba 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.

20

EJEMPLOS

Ejemplo 1

- 25 Estabilidad de las variantes de alfa-amilasa

- 30 [0274] 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 en este documento para la numeración)) y las variantes de alfa-amilasa de las mismas 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).

- 35 [0275] 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. 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.
- 45

[0276] 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.

- 5 [0277] 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.

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 V59A + E129V + K177L + R179E + H208Y + K220P + N224L + S242Q + Q254S	>180	62	ND
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 + M96I + E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S	>180	38	ND
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179E	57	11	402
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S	174	44	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + Y276F + L427M	>180	49	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S+ M284T	>180	49	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + S242Q + Q254S + N376* + I377*	177	36	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S	94	13	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179E + K220P + N224L + Q254S + M284T	129	24	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179E + S242Q	148	30	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179V	78	9	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones E129V + K177L + R179V + K220P + N224L + S242Q + Q254S	178	31	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones K220P + N224L + S242Q + Q254S	66	17	>480
Alfa-amilasa A de referencia con las sustituciones K220P + N224L + Q254S	30	6	159
Alfa-amilasa A de referencia con la sustitución M284T	35	7	278
Alfa-amilasa A de referencia con la sustitución M284V	59	13	ND
ND no determinado			

[0278] 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

[0279] Se usó *E. coli* DH12S (disponible en Gibco BRL) para el rescate del plásmido de levadura. pJTP000 es un *S. cerevisiae* y *E. coli* un vector lanzadera bajo el control del promotor TPI, contruidos a partir de pJC039 descrito en WO 01/92502, en el que se ha insertado el gen de proteasa M35 *Thermoascus aurantiacus* (WO 03/048353).

[0280] 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.

Medios y sustratos

[0281] Solución basal 10X: Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos (DIFCO) 66.8 g/l, succinato 100 g/l, NaOH 60 g/l.

[0282] 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 ácidos casamino 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.

[0283] YPD: 20 g/l de peptona Bacto, 10 g/l de extracto de levadura, 100 ml/l de glucosa al 20 %.

[0284] YPD + Zn: YPD + ZnSO₄ 0.25 mM.

[0285] Solución PEG/LiAc: 50 ml de PEG4000 al 40 %, 1 ml de acetato de litio 5 M.

[0286] Placa de microtitulación de zeína de 96 pocillos:

[0287] 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

[0288] 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.).

Transformación de levadura

[0289] 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).

Secuenciación de ADN

[0290] 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.

Construcción del vector de expresión de proteasa

[0291] El gen de la proteasa M35 de *Thermoascus* se amplificó con el par de cebadores Prot F (SEC ID N.º: 15 en el presente documento) y Prot R (SEC ID N.º: 16 en el presente documento). Los fragmentos de PCR resultantes se introdujeron en *S. cerevisiae* YNG318 junto con el vector pJC039 (descrito en WO2001/92502) digeridos con enzimas de restricción para eliminar el gen de la cutinasa de *Humicola insolens*.

[0292] El plásmido en clones de levadura en las placas de glucosa SC se recuperó para confirmar la secuencia interna y se denominó pJTP001.

Construcción de la biblioteca de levadura y variantes dirigidas

[0293] 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.

[0294] Los cebadores AM34 (SEC ID N.º: 17 en el presente documento) y AM35 (SEC ID N.º: 18 en el presente documento) se usaron para hacer fragmentos de ADN que contenían cualquier fragmento mutado 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

5 [0295] 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

10 [0296] 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

20 [0297] 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

30 [0298] 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.

35 [0299] 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*

40 [0300] 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

50 [0301]

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: centrífuga 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

[0302]

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

[0303]

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 en el presente documento.		
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 %
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 en el presente documento.				
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 en el presente documento.

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/P81 R/S87P/A112P/D142L			80 %
JTP101	A27K/D79L/S87P/A112P/T124V/D142L		81 %	
JTP116	D79L/Y82F/S87P/A112P/T124V/D142L		59 %	
JTP117	D79L/Y82F/S87P/A112P/T124V/D142L		94 %	
JTP127	D79L/S87P/A112P/T124V/A126V/D142L		53 %	

Tabla 5. Actividad relativa de 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 en el presente documento.

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 6. 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 en el presente documento.

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

[0304] 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.

Ensayo de zeína-BCA:

[0305] El ensayo de zeína-BCA se realizó para detectar la cuantificación de proteínas solubles liberadas de zeína por las variantes de proteasas a varias temperaturas.
Protocolo:

[0306]

1) Mezclar 10 microlitros de 10 microgramos/ml de soluciones enzimáticas y 100 µl de solución de zeína al 0.025 % en una placa de microtitulación (MTP).

2) Incubar a varias temperaturas durante 60 minutos.

3) Añadir 10 microlitros de solución de ácido tricloroacético (TCA) al 100 %.

4) Centrifugar MTP a 3500 rpm durante 5 minutos.

5) Llevar 15 microlitros a un nuevo MTP que contenga 100 microlitros de solución de ensayo de BCA (Pierce n.º cat: 23225, kit de ensayo de proteínas BCA).

6) Incubar durante 30 minutos a 60 °C.

7) Medir A562.

[0307] Los resultados se muestran en la tabla 7. Todas las variantes ensayadas mostraron una termoestabilidad mejorada en comparación con la proteasa ts.

Tabla 7. Ensayo de zeína-BCA

TS/variante	Muestra incubada 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*

[0308] La glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* se describe en las SEC ID N.º: 9 y 14 (maduras) del presente documento.

[0309] Sustrato. Sustrato: almidón soluble (Sigma S-9765) del 1 % en agua desionizada

[0310] Tampón de reacción: tampón de acetato 0.1 M a pH 5.3

[0311] Kit de determinación de concentración de glucosa: kit de ensayo de glucosa Wako (LabAssay glucose, WAKO, n.º cat 298-65701).

[0312] 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.

[0313] La concentración de glucosa se determinó mediante kits Wako.

[0314] Todo el trabajo se realizó en paralelo.

[0315] 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 8.

Tabla 8 Temperatura óptima

Temperatura (°C)	20	30	40	50	60	70	80	85	90	95
Actividad relativa (%)	60	71	84	94	94	100	99	92	87	88

[0316] 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.

[0317] 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.

[0318] Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9 Estabilidad térmica

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

[0319] 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.

[0320] 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.

[0321] Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10 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	78	77	91	84	100	55	66	30	17	15	16
	4	6	0	2	2	0	5	7	9	8	9	1

[0322] 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.

[0323] 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.

[0324] Los resultados se muestran en la tabla 11.

Tabla 11 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	98	98	103	100	93	71	90	58	17	17	17
	4	0	0	2	0	4	2	7	7	4	0	2

[0325] 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.

Ejemplo 5

Termoestabilidad de la proteasa Pfu.

[0326] La termoestabilidad de la proteasa de *Pyrococcus furiosus* (Pfu S) comprada en Takara Bio Inc, (Japón) se ensayó 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 6Clonación del gen de glucoamilasa de la cepa de *Penicillium oxalicum*

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

[0327] 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*

[0328] 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'.

[0329] Cebador sentido: 5'- ATGCGTCTCACTCTATTATCAGGTG-3' (SEC ID N.º: 19)

[0330] 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.

[0331] 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.

Ejemplo 7Expresión de la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* clonada

[0332] 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' ACACAACTGGGGATCCACCATGCGTCTCACTCTATTATC (SEC ID N.º: 20)

Cebador R: 5' AGATCTCGAGAAGCTTAAACTGCCACACGTCGTTGG (SEC ID N.º: 21)

[0333] 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.

[0334] 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 WO 2005/042735 A1.

[0335] 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.

[0336] 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 poliácridamida-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).

[0337] 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.

[0338] 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).

[0339] 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.

[0340] 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* (PE001)

[0341] Se realizaron dos reacciones de PCR con el plásmido XYZ1471-4, descrito en el ejemplo 9, 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: 22)

Cebador K79V R 18mer AATTGGAAAGACTGCCCCG (SEC ID N.º: 23)

Cebador F-NP003940: 5' ACACAACTGGGGATCCACCATGCGTCTCACTCTATTATC (SEC ID N.º: 24)

Cebador R-NP003940: 5' AGATCTCGAGAAGCTTAAAACTGCCACACGTCGTTGG (SEC ID N.º: 25)

- 5 [0342] 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	H2O	1	94 °C	2 min
2 perlas	PURE Taq Ready-To-Go PCR	2	94 °C	30 s
Perlas (Amersham Biosciences)		3	55 °C	30 s
0 µl X 2100 100 pmol/µl de cebadores		4	72 °C	90 s
(K79V F + cebador R-NP003940, K79V R + cebador F-NP003940)		2-4	25 ciclos	
0.5 µl	Plantilla de ADN	5	72 °C	10 min

- 10 [0343] 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.

- 15 [0344] 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.

- 25 [0345] 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.

35 Ejemplo 9

Purificación de la variante dirigida de Po AMG PE001

- 40 [0346] El transformante seleccionado de la variante y la cepa que expresa la glucoamilasa de *Penicillium oxalicum* de tipo salvaje descrita en el ejemplo 8 se 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.

- 45 [0347] 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.

50 Ejemplo 10

Caracterización de la estabilidad de la proteasa PE001

[0348] 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 Biochemical journal [0264-6021] Ichishima, 2003, 371 (2): 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.

[0349] 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.

TABLA 12 El resultado de SDS-PAGE después del tratamiento con proteasa

	Glucoamilasa de tipo salvaje				PE001				Cont rol
Proteasa	aspergiloepsi na I		aorsin		aspergiloepsi na I		aorsin		
Temperatur a de incubación (°C)	4	32	4	3 2	4	32	4	32	4
glucoamilas a intacta (aprox. 70 kDa)	10 0 %	90 %	4 0 %	1 0 %	10 0 %	100 %	1 0 0 %	100 %	100 %
glucoamilas a dividida (aprox. 60 kDa)	ND	10 %	6 0 %	9 0 %	ND	ND	N D	ND	ND
N.D.: no detectado.									

Ejemplo 11

Menos escisión durante el cultivo

[0350] El transformante de *Aspergillus* de la variante (PE001) 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.

[0351] Los sobrenadantes de cultivo se cargaron en SDS-PAGE.

TABLA 13 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.

[0352] La glucoamilasa de tipo salvaje fue dividida por las proteasas del huésped durante la fermentación, mientras que la variante produjo solo una molécula intacta.

Ejemplo 12

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

[0353] 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.

[0354] 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 14

Actividad específica relativa	AGU/mg
<i>Penicillium oxalicum</i> ts	100 %
<i>Penicillium oxalicum</i> PE001	102 %

Ejemplo 13Purificación de variantes de glucoamilasa que tienen termoestabilidad incrementada

[0355] 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 (SEC ID N.º: 14 numeración) se micropurificaron de la siguiente manera:

El micelio se eliminó por filtración a través de un filtro de 0.22 µm. Se añadieron 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 14Análisis de despliegue térmico de proteínas (TSA, ensayo de cambio térmico)

[0356] 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).

[0357] En una placa de 96 pocillos, se mezcló una muestra micropurificada de 25 microlitros en acetato 50 mM pH 4.5 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.

[0358] 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).

[0359] En una placa de 96 pocillos, se mezcló una muestra purificada de 15 microlitros en acetato 50 mM pH 4.5 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.

[0360] La fluorescencia se monitorizó cada 20 segundos usando luz LED azul incorporada para la excitación y filtro ROX (610 nm, emisión).

[0361] Los valores de T_m se calcularon como el valor máximo de la primera derivada (dF/dK) (ref.: Gregory et al., 2009, J. Biomol. Screen. 14: 700).

Tabla 15a.

Muestra	T _m (Grad. Celsius) +/- 0.4
PO-AMG (PE001)	80.3
Variante Q327F	82.3
Variante T65A	81.9

Tabla 15b.

Muestra	T _m (Grad. Celsius) +/- 0.4	
Acarbosa:	-	+
PO-AMG (PE001)	79.5	86.9
Variante E501V Y504T	79.5	95.2

Ejemplo 15Análisis de termoestabilidad por calorimetría diferencial de barrido (DSC)

[0362] 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 9.

[0363] 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.

[0364] 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.

[0365] Las variantes aisladas y los datos de DSC se describen en la tabla 16 a continuación.

Tabla 16.

Nombre Po-AMG	Mutaciones	DSC T _d (°C) @ pH 4.0	DSC T _d (°C) @ pH 4.8
	Mutaciones relativas a PE001		
PE001		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 P11 D 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
GA010	P11F T65A Q327W E501V Y504T		89.7
GA507	T65A Q327F E501V Y504T		89.3

ES 2 800 477 T3

GA5 13	T65A S105P Q327W		87.0
GA5 14	T65A S105P Q327F		87.4
GA5 15	T65A Q327W S364P		87.8
GA5 16	T65A Q327F S364P		88.0
GA5 17	T65A S103N Q327F		88.9
GA0 22	P2N P4S P11F K34Y T65A Q327F		89.7
GA0 23	P2N P4S P11F T65A Q327F D445N V447S		89.9
GA0 32	P2N P4S P11F T65A I172V Q327F		88.7
GA0 49	P2N P4S P11F T65A Q327F N502*		88.4
GA0 55	P2N P4S P11F T65A Q327F N502T P563S K571E		88.0
GA0 57	P2N P4S P11F R31S K33V T65A Q327F N564D K571S		89.5
GA0 58	P2N P4S P11F T65A Q327F S377T		88.6
GA0 64	P2N P4S P11F T65A V325T Q327W		88.0
GA0 68	P2N P4S P11F T65A Q327F D445N V447S E501V Y504T		90.2
GA0 69	P2N P4S P11F T65A I172V Q327F E501V Y504T		90.2
GA0 73	P2N P4S P11F T65A Q327F S377T E501V Y504T		90.1
GA0 74	P2N P4S P11F D26N K34Y T65A Q327F		89.1
GA0 76	P2N P4S P11F T65A Q327F I375A E501V Y504T		90.2
GA0 79	P2N P4S P11F T65A K218A K221D Q327F E501V Y504T		90.9
GA0 85	P2N P4S P11F T65A S103N Q327F E501V Y504T		91.3
GA0 86	P2N P4S T10D T65A Q327F E501V Y504T		90.4
GA0 88	P2N P4S F12Y T65A Q327F E501V Y504T		90.4
GA0 97	K5A P11F T65A Q327F E501V Y504T		90.0
GA1 01	P2N P4S T10E E18N T65A Q327F E501V Y504T		89.9
GA1 02	P2N T10E E18N T65A Q327F E501V Y504T		89.8
GA0 84	P2N P4S P11F T65A Q327F E501V Y504T T568N		90.5
GA1 08	P2N P4S P11F T65A Q327F E501V Y504T K524T G526A		88.6
GA1 26	P2N P4S P11F K34Y T65A Q327F D445N V447S E501V Y504T		91.8
GA1 29	P2N P4S P11F R31S K33V T65A Q327F D445N V447S E501V Y504T		91.7
GA0 87	P2N P4S P11F D26N K34Y T65A Q327F E501V Y504T		89.8
GA0 91	P2N P4S P11F T65A F80 * Q327F E501V Y504T		89.9

GA1 00	P2N P4S P11F T65A K112S Q327F E501V Y504T		89.8
GA1 07	P2N P4S P11F T65A Q327F E501V Y504T T516P K524T G526A		90.3
GA1 10	P2N P4S P11F T65A Q327F E501V N502T Y504*		90.6

Ejemplo 16Análisis de termoestabilidad mediante prueba de estrés térmico y ensayo de pNPG

[0366] Partiendo de una de las variantes de sustitución identificadas del ejemplo 10, identificadas como PE008, se probaron variantes adicionales mediante un ensayo de estrés térmico en el que se analizó la actividad de glucoamilasa (AMG) en el sobrenadante de cultivos de crecimiento después de un choque térmico a 83 °C durante 5 minutos.

[0367] Después del choque térmico, se midió la actividad residual de la variante, así como de una muestra sin estrés.

Descripción del ensayo de actividad de Po-AMG pNPG:

[0368] 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.

Cultivo:

[0369] Se añadió a una placa de microtitulación esterilizada (MTP) 200 µl de medio de crecimiento enriquecido (FT X-14 sin Dowfax) en cada pocillo. 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.

Ensayo:

[0370] Se transfirieron 50 microlitros de sobrenadante a 50 microlitros de NaAc 0.5 M a pH 4.8 para obtener el pH de muestra correcto.

[0371] La dilución de 50 microlitros 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.

[0372] Se transfirieron 20 microlitros de muestras estresadas y no estresadas a un MTP estándar. Se añadieron 20 microlitros de sustrato de pNPG para comenzar la reacción. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h.

[0373] La reacción se detuvo y el color se desarrolló mediante la adición de 50 microlitros de Na₂CO₃ 0.5 M. El color amarillo se midió en un lector de placas (Molecular Devices) a 405 nm.

Tampones:

[0374]
NaAc 0.5 M pH 4.8
NaAc 0.25 M pH 4.8

Sustrato, pNPG 6 mM:

[0375] 15 mg de 4-nitrofenil D-glucopiranosido en 10 ml 0.25 NaAc pH 4.8

Solución de parada/desarrollo:

[0376] Na₂CO₃ 0.5 M

Tratamiento de datos:

[0377] 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. = $(\text{Abs}_{\text{sin estrés}} (\text{Abs}_{\text{sin estrés}} - \text{Abs}_{\text{con estrés}})) / \text{Abs}_{\text{con estrés}} * 100 \%$) se calculó y trazó en relación con el punto de referencia, Po-amg0008.

5

Tabla 17

Nombre Po-AMG	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 18

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

10 Ejemplo 17

Prueba de actividad de glucoamilasa de variantes termoestables según la invención

15 [0378] Todas las variantes descritas anteriormente mostradas en las tablas 16, 17 y 18 se han comprobado para determinar la actividad de glucoamilasa en sobrenadantes de cultivo usando el ensayo de pNPG descrito en el ejemplo 16.

Ejemplo 18

20 Determinación de la termoestabilidad de las endo-beta-glucanasas (EG) mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)

[0379] La termoestabilidad de las EG se ensayó como se describe en la sección "Materiales y métodos" en "Determinación de Td mediante calorimetría diferencial de barrido para endoglucanasas".

25

ID	Familia	Donante	Punto de fusión °C (DSC)
Endoglucanasa TL (SEC ID N.º: 3)	GH 5	<i>Talaromyces leycettanus</i>	89
Endoglucanasa PC (SEC ID N.º: 4)	GH 5	<i>Penicillium capsulatum</i>	83
Endoglucanasa TS (SEC ID N.º: 5)	GH 5	<i>Trichophaea saccata</i>	81

Endoglucanasa SF (SEC ID N.º: 7)	GH 45	<i>Sordaria fimicola</i>	75
----------------------------------	-------	--------------------------	----

Ejemplo 19

Adición de endo-beta-glucanasa termoestable (EG) en la licuefacción del maíz

[0380] Todos los tratamientos se evaluaron mediante licuefacción a pequeña escala de 25 g. Para los experimentos se utilizaron harina de maíz y vinaza diluida obtenidas de plantas industriales de etanol de maíz. Los sólidos secos (DS) de la harina de maíz constituyeron el 85.62 % y los DS de la vinaza diluida eran el 8.08 %, ambos según lo determinado por el equilibrio de humedad halógeno Mettler-Toledo HB43. Para la licuefacción, se agregaron 7.9 g de harina de maíz, 7.5 g de vinaza diluida y 9.6 g de agua corriente para alcanzar un DS del 29.5 % y una masa de 25 g en un tubo de policarbonato Nalgene de 30 ml con una tapa roscada y un sello de goma. Se encontró que el pH de la suspensión de maíz era de aproximadamente 5.1 sin ajuste. Los tubos que contenían la suspensión de maíz se colocaron luego en un horno de hibridación Boekel con un estante giratorio ajustado a 60 ± 1 °C para calentar antes de añadir la enzima; la rotación se fijó a 20 rpm. La alfa-amilasa (AA) utilizada fue BE369. Además del control de solo AA, se evaluaron cinco EG termoestables tal como se muestra en la tabla 19. Después de precalentar durante 20-30 minutos, los tubos se retiraron y se dosificaron con la cantidad apropiada de enzima diluida tal como se muestra en la tabla 20 a continuación. Cada tratamiento de licuefacción se ensayó por duplicado. Las dosis reales de enzimas suponen un volumen constante de maceración en cada tubo; el DS final de la suspensión de maíz después de todas las adiciones y antes de la licuefacción fue del 28.2 %. Después de añadir la enzima, los tubos se agitaron a conciencia y luego se devolvieron al horno de hibridación Boekel calentado a 75 ± 1 °C durante dos horas y diez minutos; la rotación del estante se fijó a 20 rpm. El tiempo deseado a 75 ± 1 °C fue de dos horas, los diez minutos adicionales sirvieron para permitir que la temperatura de la suspensión de maíz se equilibrara.

Tabla 19: Lista de fuentes de EG, familia e ID de secuencia

Fuente de EG	Familia	ID de secuencia
<i>Sordaria fimicola</i>	GH45	(SEC ID N.º 7)
<i>Thielavia terrestris</i>	GH45	(SEC ID N.º 6)
<i>Talaromyces leycettanus</i>	GH5	(SEC ID N.º 3)
<i>Penicillium capsulatum</i>	GH5	(SEC ID N.º 4)
<i>Trichophaea saccata</i>	GH5	(SEC ID N.º 5)

Tabla 20: Dosificación de enzimas en licuefacción

Tratamientos de licuefacción	Dosis AA (KNU-A/g DS)	Dosis EG (µg PE (proteína enzimática)/g DS)
AA	0.12	
AA + EG	0.12	100

[0381] Después de dos horas de licuefacción, los tubos se retiraron del horno, se sumergieron en agua fría y se agitaron periódicamente durante aproximadamente 15 minutos hasta que los tubos estaban fríos al tacto. Las soluciones de urea y penicilina de preparación propia se añadieron a cada tubo para alcanzar concentraciones finales de 1000 ppm y 3 ppm, respectivamente. Para la fermentación, se prepararon tubos de polipropileno de 15 ml perforando un orificio de 1/32 pulgadas (1.5 mm) en la tapa y luego se pesaron para registrar el peso vacío. Se transfirieron aproximadamente 5 g de suspensión de cada tubo de Nalgene (licuefacción) a cada uno de los cuatro tubos de 15 ml. Luego se volvieron a pesar los tubos para determinar el peso exacto de la maceración de maíz en cada tubo. Cada tubo se dosificó con la cantidad apropiada de glucoamilasa AC diluida. La dosificación real de la enzima fue de 0.6 AGU/g DS basada en el peso exacto de la suspensión de maíz en cada tubo. Todos los tubos se dosificaron con 100 µl de propagación de levadura y luego se colocaron en un baño de agua a 32 °C para la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). El DS final calculado fue del 27.8 % al inicio de la SSF.

[0382] Se recogieron muestras para análisis mediante HPLC tras 53 horas de fermentación. La preparación de la muestra de HPLC consistió en detener las reacciones de enzimas y levaduras mediante la adición de 50 µl de H₂SO₄ al 40 %, agitar en vórtice para distribuir el ácido, centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos y hacer pasar el sobrenadante a través de un filtro de 0.45 µm. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta el análisis. El sistema utilizado para determinar la concentración de etanol y oligosacáridos fue un sistema HPLC Agilent™ 100 junto con un detector RI. La columna de separación era una columna de exclusión de iones BioRad™ Aminex HPX-87H (300 mm x 7.8 mm).

Resultados

[0383] Los resultados del análisis mediante HPLC se resumen en la tabla 21 a continuación. Cinco EG mostraron un mayor rendimiento final de etanol después de la SSF que con la maceración de maíz licuada con BE369 AA sola (Control) cuando se añadió en la licuefacción a 75 °C durante 2 horas. Un GH5 de *Talaromyces leycettanus* aumentó el rendimiento final de etanol en un 1.93 % en comparación con el control BE369 AA solo. Esta EG tiene una Td de 89 °C.

Tabla 21: Resultados resumidos de rendimiento de etanol y cambio porcentual

Tratamiento de licuefacción	Etanol (% p/v)	Aumento de etanol
AA369 (Control)	10.13	-
AA369 + <i>S. fimicola</i> EG V	10.27	1.31 %
AA369 + <i>T. terrestris</i> EG V	10.25	1.16 %
AA369 + <i>T. leycettanus</i> EG II	10.33	1.93 %
AA369 + <i>P. capsulatum</i> EG II	10.26	1.21 %
AA369 + <i>T. sacchari</i> EG II	10.25	1.19 %

Ejemplo 20

Adición de endo-beta-glucanasa termoestable (EG) en la licuefacción del maíz

[0384] Todos los tratamientos se evaluaron mediante licuefacción de 100 o 107 g. Se obtuvieron dos harinas de maíz diferentes, denominadas harina de maíz A y harina de maíz B, de plantas industriales de etanol de maíz que se van a utilizar para los experimentos; cada harina se evaluó en un experimento separado. Los sólidos secos (% DS) de la harina de maíz A fueron del 86.1 % y de la harina de maíz B fueron del 86.3 % según lo determinado mediante el equilibrio de humedad halógeno Mettler-Toledo HB43 por duplicado.

[0385] Para la licuefacción de la harina de maíz A, se añadieron 37.2 g de harina de maíz y 62.8 g de agua corriente para alcanzar un DS del 32 % y una masa de 100 g en un recipiente de 200 ml de acero inoxidable Lab-O-Mat. Se encontró que el pH de la suspensión de maíz era de aproximadamente 6.0; 80 µl de H₂SO₄ al 40 % se agregaron para reducir el pH a 5.0 en la licuefacción. La alfa-amilasa (AA) utilizada fue BE369. Además del control de solo AA, se evaluaron tres EG termoestables tal como se muestra en la tabla 22. Cada recipiente se dosificó con la cantidad apropiada de enzima diluida como se muestra en la tabla 23 a continuación. Cada tratamiento de licuefacción se ensayó por duplicado. Las dosis reales de enzimas suponen un volumen constante de maceración en cada recipiente; el volumen final de la suspensión de maíz después de todas las adiciones y antes de la licuefacción era de 107 g y el DS final fue del 29.9 %. Después de añadir la enzima, los recipientes se sellaron herméticamente, se agitaron completamente y luego se colocaron en la cámara Lab-O-Mat. El programa utilizado para la licuefacción comenzó con una rampa de temperatura de 5 °C/min para alcanzar los 75 °C; los 75 °C se mantuvieron durante dos minutos. Esto fue seguido inmediatamente por una rampa de temperatura de 1 °C/min para alcanzar 80 °C; se mantuvieron los 80 °C durante 110 minutos. La rotación alterna de 45 rpm en sentido horario durante 30 segundos seguida de 45 rpm en sentido antihorario durante 30 segundos continuó durante todo el programa.

Tabla 22: Lista de fuentes de EG, familia e ID de secuencia

Fuente de EG	Familia	ID de secuencia
<i>Talaromyces leycettanus</i>	GH5	(SEC ID N.º 3)
<i>Trichophaea sacchari</i>	GH5	(SEC ID N.º 5)
<i>Penicillium capsulatum</i>	GH5	(SEC ID N.º 4)

Tabla 23: Dosificación de enzimas en licuefacción

Tratamientos de licuefacción	Dosis AA (KNU-A/g DS)	Dosis EG (µg PE (proteína enzimática)/g DS)
AA	0.12	-
AA + EG	0.12	100

[0386] Una vez completado el programa, los recipientes se retiraron del Lab-O-Mat y se sumergieron en hielo durante aproximadamente 20 minutos hasta que estuvieron fríos al tacto. Las soluciones de urea y penicilina de preparación propia se añadieron a cada recipiente para alcanzar concentraciones finales de 800 ppm y 3 ppm, respectivamente. Para la fermentación, se pesaron matraces de polycarbonato de 125 ml con deflectores y tapones de rosca fabricados por Corning para registrar el peso vacío. Se transfirieron aproximadamente 50 g de suspensión de cada recipiente (licuefacción) a cada uno de los dos matraces de 125 ml. Los matraces se volvieron a pesar para determinar el peso exacto de la maceración de maíz en cada matraz. Cada matraz se dosificó con la cantidad apropiada de glucoamilasa AC diluida. La dosificación real de la enzima fue de 0.6 AGU/g DS basada en el peso exacto de la suspensión de maíz en cada matraz. Todos los matraces se dosificaron con 1100 µl de propagación de levadura basándose en el peso promedio de la maceración en cada matraz y una dosis de levadura de 20 µl/g de maceración de maíz redondeada hasta los 100 más cercanos. Luego, los matraces se colocaron en una incubadora de agitación controlada mediante humedad de Infors

para la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). La temperatura era de 32 °C, la humedad se fijó al 80 % y se agitó a 150 rpm. El DS final calculado fue del 28.6 % al comienzo de la SSF.

[0387] Se recogieron muestras para análisis mediante HPLC tras 62 horas de fermentación. La preparación de la muestra de HPLC consistió en detener las reacciones de enzimas y levaduras mediante la adición de 550 µl de H₂SO₄ al 40 %, (10 µl/g de puré de maíz), mezclar para distribuir el ácido, transferir aproximadamente 5 g a un tubo Falcon de 15 ml, centrifugar a 3000 rpm durante 8 minutos y hacer pasar el sobrenadante a través de un filtro de 0.45 µm. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta el análisis. El sistema utilizado para determinar la concentración de etanol y oligosacáridos fue un sistema HPLC Agilent™ 100 junto con un detector RI. La columna de separación era una columna de exclusión de iones BioRad™ Aminex HPX-87H (300 mm x 7.8 mm).

[0388] Para la licuefacción de la harina de maíz B, se añadieron 37.7 g de harina de maíz y 55.3 g de agua corriente para alcanzar un DS del 35 % y una masa de 93 g en un recipiente de 200 ml de acero inoxidable Lab-O-Mat. Se encontró que el pH de la suspensión de maíz era de aproximadamente 6.0; 75 µl de H₂SO₄ al 40 % se agregaron para reducir el pH a 5.0 en la licuefacción. La alfa-amilasa (AA) utilizada fue BE369. Además del control de solo AA, se evaluaron tres EG termoestables tal como se muestra en la tabla 22. Cada recipiente se dosificó con la cantidad apropiada de enzima diluida tal como se muestra en la tabla 23; se añadió más agua corriente para llevar el volumen final de cada recipiente a 100 g. Cada tratamiento de licuefacción se ensayó por duplicado. Las dosis reales de enzimas suponen un volumen constante de maceración en cada recipiente; el volumen final de la suspensión de maíz después de todas las adiciones y antes de la licuefacción era de 100 g y el DS final fue del 32.6 %. Después de añadir la enzima, los recipientes se sellaron herméticamente, se agitaron completamente y luego se colocaron en la cámara Lab-O-Mat. El programa utilizado para la licuefacción comenzó con una rampa de temperatura de 5 °C/min para alcanzar los 75 °C; los 75 °C se mantuvieron durante dos minutos. Esto fue seguido inmediatamente por una rampa de temperatura de 1 °C/min para alcanzar 80 °C; se mantuvieron los 80 °C durante 110 minutos. La rotación alterna de 45 rpm en sentido horario durante 30 segundos seguida de 45 rpm en sentido antihorario durante 30 segundos continuó durante todo el programa.

[0389] Una vez completado el programa, los recipientes se retiraron del Lab-O-Mat y se sumergieron en hielo durante aproximadamente 20 minutos hasta que estuvieron fríos al tacto. Para la fermentación, se pesaron matraces de polycarbonato de 125 ml con deflectores y tapones de rosca fabricados por Corning para registrar el peso vacío. Se transfirieron aproximadamente 50 g de suspensión de cada recipiente (licuefacción) a cada uno de los dos matraces de 125 ml. Los matraces se volvieron a pesar para determinar el peso exacto de la maceración de maíz en cada matraz. Las soluciones de urea y penicilina de preparación propia se añadieron a cada matraz para alcanzar concentraciones finales de 800 ppm y 3 ppm, respectivamente. Cada matraz se dosificó con la cantidad apropiada de glucoamilasa AC diluida. La dosificación real de la enzima fue de 0.6 AGU/g DS basada en el peso exacto de la suspensión de maíz en cada matraz. Todos los matraces se dosificaron con 1000 µl de propagación de levadura basándose en el peso promedio de la maceración en cada matraz y una dosis de levadura de 20 µl/g de maceración de maíz redondeada hasta los 100 más cercanos. Luego, los matraces se colocaron en una incubadora con agitación controlada mediante humedad de Infors para la sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). La temperatura era de 32 °C, la humedad se fijó al 80 % y se agitó a 150 rpm. El DS final calculado fue del 30.5 % al comienzo de la SSF.

[0390] Se recogieron muestras para análisis mediante HPLC tras 63 horas de fermentación. La preparación de la muestra de HPLC consistió en detener las reacciones de enzimas y levaduras mediante la adición de 500 µl de H₂SO₄ al 40 %, (10 µl/g de puré de maíz), mezclar para distribuir el ácido, transferir aproximadamente 5 g a un tubo Falcon de 15 ml, centrifugar a 3000 rpm durante 8 minutos y hacer pasar el sobrenadante a través de un filtro de 0.45 µm. Las muestras se almacenaron a 4 °C hasta el análisis. El sistema utilizado para determinar la concentración de etanol y oligosacáridos fue un sistema HPLC Agilent™ 100 junto con un detector RI. La columna de separación era una columna de exclusión de iones BioRad™ Aminex HPX-87H (300 mm x 7.8 mm).

Resultados

[0391] Los resultados del análisis mediante HPLC se resumen en la tabla 24 a continuación. Todos las EG ensayadas en harina de maíz A y harina de maíz B mostraron un mayor rendimiento final de etanol después de la SSF que la maceración de maíz licuada con BE369 AA sola (control) cuando se añade en la licuefacción a 80 °C durante 2 horas.

Tabla 24: Resultados resumidos de rendimiento de etanol y cambio porcentual

Tratamiento de licuefacción	Harina de maíz A		Harina de maíz B	
	Etanol (%) p/v	Aumento de etanol	Etanol (%) p/v	Aumento de etanol

AA369 (Control)	12.42	-	13.39	-
AA369 + <i>T. leycettanus</i> EG II	12.49	0.53 %	13.46	0.51 %
AAE369 + <i>T. saccata</i> EG II	12.46	0.29 %	13.40	0.07 %
AA369 + <i>P. capsulatum</i> EG II	12.50	0.60 %	13.42	0.24 %

LISTADO DE SECUENCIAS

[0392]

5 <110> Novozymes
Kang, Zhengfang
Krogh, Kristian Bertel Rømer M.
Lan, Tang
10 Clark, Suzanne
Strahler, Christie

<120> Procesos para la producción de productos de fermentación

15 <130> 12748-WO-PCT[2]

<160> 33

<170> versión de PatentIn 3.5

20 <210> 1
<211> 515
<212> PRT
<213> *Bacillus stearothermophilus*

25 <220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(515)

30 <400> 1

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 800 477 T3

	Thr	Glu	Trp	Val	Asp	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Ser	Asp	Arg	Asn	Gln	
			115					120					125				
5																	
	Glu	Ile	Ser	Gly	Thr	Tyr	Gln	Ile	Gln	Ala	Trp	Thr	Lys	Phe	Asp	Phe	
		130					135					140					
10																	
	Pro	Gly	Arg	Gly	Asn	Thr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp	Tyr	His	
	145					150					155					160	
15																	
	Phe	Asp	Gly	Val	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Arg	Ile	Tyr	
					165					170					175		
20																	
	Lys	Phe	Arg	Gly	Ile	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Asp	Thr	Glu	
				180					185					190			
25																	
	Asn	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Leu	Asp	Met	Asp	His	
			195					200					205				
30																	
	Pro	Glu	Val	Val	Thr	Glu	Leu	Lys	Asn	Trp	Gly	Lys	Trp	Tyr	Val	Asn	
		210					215					220					
35																	
	Thr	Thr	Asn	Ile	Asp	Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys	
	225					230					235					240	
40																	
	Phe	Ser	Phe	Phe	Pro	Asp	Trp	Leu	Ser	Tyr	Val	Arg	Ser	Gln	Thr	Gly	
					245					250					255		
45																	
	Lys	Pro	Leu	Phe	Thr	Val	Gly	Glu	Tyr	Trp	Ser	Tyr	Asp	Ile	Asn	Lys	
				260					265					270			
50																	
	Leu	His	Asn	Tyr	Ile	Thr	Lys	Thr	Asn	Gly	Thr	Met	Ser	Leu	Phe	Asp	
		275						280					285				
55																	
	Ala	Pro	Leu	His	Asn	Lys	Phe	Tyr	Thr	Ala	Ser	Lys	Ser	Gly	Gly	Ala	
		290					295					300					
60																	
	Phe	Asp	Met	Arg	Thr	Leu	Met	Thr	Asn	Thr	Leu	Met	Lys	Asp	Gln	Pro	
	305					310					315					320	
65																	
	Thr	Leu	Ala	Val	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Thr	Glu	Pro	Gly	Gln	
					325					330					335		
70																	
	Ala	Leu	Gln	Ser	Trp	Val	Asp	Pro	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	Tyr	Ala	
				340					345					350			
75																	
	Phe	Ile	Leu	Thr	Arg	Gln	Glu	Gly	Tyr	Pro	Cys	Val	Phe	Tyr	Gly	Asp	
		355						360					365				
80																	
	Tyr	Tyr	Gly	Ile	Pro	Gln	Tyr	Asn	Ile	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Lys	Ile	
		370					375					380					

ES 2 800 477 T3

5 Asp Pro Leu Leu Ile Ala Arg Arg Asp Tyr Ala Tyr Gly Thr Gln His
 385 390 395 400
 Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Val
 405 410 415
 10 Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
 420 425 430
 15 Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val
 435 440 445
 20 Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser
 450 455 460
 25 Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp
 465 470 475 480
 Val Pro Arg Lys Thr Thr Val Ser Thr Ile Ala Arg Pro Ile Thr Thr
 485 490 495
 30 Arg Pro Trp Thr Gly Glu Phe Val Arg Trp Thr Glu Pro Arg Leu Val
 500 505 510
 35 Ala Trp Pro
 515
 40 <210> 2
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Thermoascus aurantiacus
 45 <400> 2
 Thr Arg Ile Ser Ser Cys Ser Gly Ser Arg Gln Ser Ala Leu Thr Thr
 1 5 10 15
 50 Ala Leu Arg Asn Ala Ala Ser Leu Ala Asn Ala Ala Ala Asp Ala Ala
 20 25 30
 55 Gln Ser Gly Ser Ala Ser Lys Phe Ser Glu Tyr Phe Lys Thr Thr Ser
 35 40 45
 Ser Ser Thr Arg Gln Thr Val Ala Ala Arg Leu Arg Ala Val Ala Arg
 50 55 60
 Glu Ala Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ala Thr Thr Tyr Tyr Cys Asp Asp
 65 70 75 80
 65 Pro Tyr Gly Tyr Cys Ser Ser Asn Val Leu Ala Tyr Thr Leu Pro Ser
 85 90 95

ES 2 800 477 T3

Tyr Asn Ile Ile Ala Asn Cys Asp Ile Phe Tyr Thr Tyr Leu Pro Ala
 100 105 110
 5
 Leu Thr Ser Thr Cys His Ala Gln Asp Gln Ala Thr Thr Ala Leu His
 115 120 125
 10
 Glu Phe Thr His Ala Pro Gly Val Tyr Ser Pro Gly Thr Asp Asp Leu
 130 135 140
 15
 Ala Tyr Gly Tyr Gln Ala Ala Met Gly Leu Ser Ser Ser Gln Ala Val
 145 150 155 160
 20
 Met Asn Ala Asp Thr Tyr Ala Leu Tyr Ala Asn Ala Ile Tyr Leu Gly
 165 170 175
 Cys
 25
 <210> 3
 <211> 409
 <212> PRT
 30 <213> Talaromyces leycettanus
 <220>
 <221> SEÑAL
 35 <222> (1)..(18)
 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (19)..(409)
 40 <400> 3
 Met Lys Phe Ser Asn Val Ile Leu Ala Ala Ser Ala Ser Ser Leu Val
 -15 -10 -5
 45
 Leu Ala Ala Pro Lys Ser Lys Thr Lys Arg Thr Ser Ala Phe Gln Trp
 -1 1 5 10
 50
 Phe Gly Ala Asn Glu Ser Gly Ala Glu Phe Gly Asn Gln Asn Ile Pro
 15 20 25 30
 55
 Gly Thr Leu Gly Thr Asp Tyr Thr Trp Pro Asp Thr Ser Thr Ile Gln
 35 40 45
 60
 Thr Leu Arg Asn Ala Gly Met Asn Ile Phe Arg Val Pro Phe Leu Met
 50 55 60
 Glu Arg Leu Val Pro Asn Gln Met Thr Gly Ser Pro Asp Pro Thr Tyr
 65 70 75
 65
 Leu Ala Asp Leu Lys Ser Thr Val Asn Phe Ile Thr Gly Thr Gly Ala

ES 2 800 477 T3

	80					85						90					
5	Tyr 95	Ala	Val	Val	Asp	Pro 100	His	Asn	Tyr	Gly	Arg 105	Tyr	Tyr	Asn	Asn	Ile 110	
10	Ile	Thr	Ser	Thr	Ser 115	Asp	Phe	Ala	Ala	Phe 120	Trp	Thr	Thr	Val	Ala	Ser 125	
15	Gln	Phe	Ala	Ser	Asn 130	Pro	Arg	Val	Ile 135	Phe	Asp	Thr	Asn	Asn 140	Glu	Tyr	
20	Asn	Asn	Met 145	Asp	Gln	Thr	Leu	Val 150	Leu	Asn	Leu	Asn	Gln	Ala	Ala	Ile 155	
25	Asn	Ala	Ile	Arg	Ala	Ala	Gly 165	Ala	Thr	Ser	Gln	Tyr 170	Ile	Phe	Ala	Glu	
30	Gly 175	Asn	Ser	Trp	Thr	Gly 180	Ala	Trp	Thr	Trp	Thr 185	Ser	Val	Asn	Asp	Asn 190	
35	Met	Lys	Gln	Leu	Thr 195	Asp	Pro	Ser	Asn	Lys 200	Leu	Val	Tyr	Glu	Met 205	His	
40	Gln	Tyr	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Gly 215	Thr	Ser	Asp	Gln	Cys 220	Val	Asn	
45	Ser	Thr	Ile	Gly	Tyr	Asp	Arg	Ile 225	Val	Ser	Ala	Thr	Gln 235	Trp	Leu	Gln	
50	Ala	Asn	Gly	Lys	Val	Ala	Phe 245	Leu	Gly	Glu	Phe	Ala 250	Gly	Gly	Ser	Asn	
55	Ser	Val	Cys	Glu	Ala	Ala	Val 260	Thr	Gly	Met	Leu 265	Asp	Tyr	Met	Glu	Gln 270	
60	Asn	Ser	Asp	Val	Trp 275	Leu	Gly	Ala	Glu	Trp 280	Trp	Ala	Ala	Gly	Pro 285	Trp	
65	Trp	Gly	Asn	Tyr	Ile	Tyr	Ser	Met 290	Glu	Pro 295	Pro	Ser	Gly	Ile 300	Ala	Tyr	
70	Gln	Asn	Tyr 305	Leu	Ser	Ile	Leu	Glu 310	Pro	Tyr	Phe	Pro	Gly 315	Gly	Ser	Tyr	
75	Ser	Gly	Gly	Thr	Gly	Ser	Gly 325	Ser	Gly	Ser	Thr	Thr 330	Thr	Thr	Ala	Thr	
80	Thr	Thr	Thr	Thr	Lys	Val 340	Pro	Pro	Thr	Ser	Thr 345	Thr	Ser	Ser	Ala	Ser 350	

ES 2 800 477 T3

	Ser Thr Gly Thr Gly Val Ala Gln His Trp Gly Gln Cys Gly Gly Gln	355	360	365
5	Gly Trp Thr Gly Pro Thr Thr Cys Val Ser Pro Tyr Thr Cys Gln Glu	370	375	380
10	Leu Asn Pro Tyr Tyr Tyr Gln Cys Leu	385	390	
15	<210> 4 <211> 334 <212> PRT <213> Penicillium capsulatum			
20	<220> <221> SEÑAL <222> (1)..(18)			
25	<220> <221> mat_peptide <222> (19)..(334)			
	<400> 4			
30	Met Lys Phe Ser Asn Leu Val Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala	-15	-10	-5
35	Met Ala Leu Pro Leu Thr Lys Lys His Ala Lys Arg Ala Ser Ser Phe	-1 1	5	10
40	Glu Trp Phe Gly Ser Asn Glu Ser Gly Ala Glu Phe Gly Ser Gly Asn	15	20	25
	Ile Pro Gly Val Tyr Gly Thr Asp Tyr Ile Phe Pro Ser Thr Ser Ala	35	40	45
45	Ile Gln Thr Leu Ile Asn Asn Gly Met Asn Ile Phe Arg Val Thr Phe	50	55	60
50	Met Met Glu Arg Leu Val Pro Asn Thr Met Thr Gly Ser Phe Asp Ala	65	70	75
55	Glu Tyr Leu Ser Asn Leu Thr Ser Val Val Asn Tyr Ile Thr Glu Ala	80	85	90
60	Gly Ala His Ala Val Ile Asp Pro His Asn Tyr Gly Arg Tyr Tyr Gly	95	100	105
	Ser Ile Ile Ser Ser Thr Ser Asp Phe Gln Thr Phe Trp Lys Asn Val	115	120	125
65	Ala Gly Gln Phe Lys Ser Asn Ser Leu Val Ile Phe Asp Thr Asn Asn	130	135	140

ES 2 800 477 T3

Glu Tyr His Asp Met Asp Gln Thr Leu Val Leu Asn Leu Asn Gln Ala
 145 150 155
 5
 Ala Ile Asn Gly Ile Arg Ala Ala Gly Ala Thr Ser Gln Tyr Ile Phe
 160 165 170
 10
 Val Glu Gly Asn Ser Tyr Thr Gly Ala Trp Thr Trp Ala Asp Val Asn
 175 180 185 190
 15
 Asp Asn Leu Lys Asn Leu Thr Asp Pro Gln Asn Lys Ile Val Tyr Glu
 195 200 205
 20
 Met His Gln Tyr Leu Asp Ser Asp Gly Ser Gly Thr Ser Ala Thr Cys
 210 215 220
 25
 Val Ser Thr Thr Ile Gly Lys Glu Arg Val Thr Ser Ala Thr Gln Trp
 225 230 235
 30
 Leu Gln Lys Asn Gly Lys Val Gly Ile Leu Gly Glu Phe Ala Gly Gly
 240 245 250
 35
 Val Asn Asp Gln Cys Lys Thr Ala Ile Thr Gly Met Leu Ser Tyr Leu
 255 260 265 270
 40
 Glu Asp Asn Ser Asp Val Trp Arg Gly Ala Met Trp Trp Ala Ala Gly
 275 280 285
 45
 Pro Trp Trp Gly Asp Tyr Ile Phe Ser Leu Glu Pro Pro Ser Gly Thr
 290 295 300
 50
 Ala Tyr Thr Gly Met Trp Ser Thr Leu Lys Ser Tyr Leu Ala
 305 310 315
 55
 <210> 5
 <211> 394
 <212> PRT
 <213> Trichophaea saccata
 60
 <220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)..(20)
 65
 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (21)..(394)
 70
 <400> 5
 Met His Ser Phe Phe Ser Leu Ala Leu Ala Val Ala Gly Leu Pro Ala
 -20 -15 -10 -5
 75
 Leu Ile Asn Ala Gln Gln Ser Ala Trp Gly Gln Cys Gly Gly Val Gly
 -1 1 5 10

ES 2 800 477 T3

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

ES 2 800 477 T3

	270		275		280
5	Ile Gly Ala Glu Arg Leu Ala Ala Ala Thr Ala Trp Leu Gln Ala Asn 285 290 295 300				
10	Asn Lys Lys Gly Phe Leu Gly Glu Ile Gly Ala Gly Ser Asn Asp Asp 305 310 315				
15	Cys Ile Ala Ala Val Lys Gly Ala Leu Cys Ser Met Gln Glu Ala Gly 320 325 330				
20	Gly Val Trp Leu Gly Ala Leu Trp Trp Ala Ala Gly Pro Trp Trp Gly 335 340 345				
25	Asp Tyr Tyr Gln Ser Ile Glu Pro Pro Asp Gly Ala Ala Ile Ala Arg 350 355 360				
30	Ile Leu Pro Glu Ala Leu Leu Pro Phe Leu 365 370				
35	<210> 6 <211> 278 <212> PRT <213> Thielavia terrestris				
40	<220> <221> mat_peptide <222> (1)..(278) <400> 6				
45	Ala Ser Gly Ser Gly Gln Ser Thr Arg Tyr Trp Asp Cys Cys Lys Pro 1 5 10 15				
50	Ser Cys Ala Trp Pro Gly Lys Ala Ala Val Ser Gln Pro Val Tyr Ala 20 25 30				
55	Cys Asp Ala Asn Phe Gln Arg Leu Ser Asp Phe Asn Val Gln Ser Gly 35 40 45				
60	Cys Asn Gly Gly Ser Ala Tyr Ser Cys Ala Asp Gln Thr Pro Trp Ala 50 55 60				
65	Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala Thr Ser Ile Ala Gly 65 70 75 80				
70	Gly Ser Glu Ser Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr Ala Leu Thr Phe Thr 85 90 95				
75	Ser Gly Pro Val Ala Gly Lys Thr Met Val Val Gln Ser Thr Ser Thr 100 105 110				

ES 2 800 477 T3

	Gly	Gly	Asp	Leu	Gly	Ser	Asn	His	Phe	Asp	Ile	Ala	Met	Pro	Gly	Gly	
			115					120					125				
5	Gly	Val	Gly	Ile	Phe	Asn	Gly	Cys	Ser	Ser	Gln	Phe	Gly	Gly	Leu	Pro	
		130					135					140					
10	Gly	Ala	Gln	Tyr	Gly	Gly	Ile	Ser	Ser	Arg	Asp	Gln	Cys	Asp	Ser	Phe	
	145					150					155					160	
15	Pro	Ala	Pro	Leu	Lys	Pro	Gly	Cys	Gln	Trp	Arg	Phe	Asp	Trp	Phe	Gln	
					165					170					175		
20	Asn	Ala	Asp	Asn	Pro	Thr	Phe	Thr	Phe	Gln	Gln	Val	Gln	Cys	Pro	Ala	
				180					185					190			
25	Glu	Ile	Val	Ala	Arg	Ser	Gly	Cys	Lys	Arg	Asn	Asp	Asp	Ser	Ser	Phe	
			195					200					205				
30	Pro	Val	Phe	Thr	Pro	Pro	Ser	Gly	Gly	Asn	Gly	Gly	Thr	Gly	Thr	Pro	
		210					215					220					
35	Thr	Ser	Thr	Ala	Pro	Gly	Ser	Gly	Gln	Thr	Ser	Pro	Gly	Gly	Gly	Ser	
	225					230					235					240	
40	Gly	Cys	Thr	Ser	Gln	Lys	Trp	Ala	Gln	Cys	Gly	Gly	Ile	Gly	Phe	Ser	
					245					250					255		
45	Gly	Cys	Thr	Thr	Cys	Val	Ser	Gly	Thr	Thr	Cys	Gln	Lys	Leu	Asn	Asp	
				260					265					270			
50	Tyr	Tyr	Ser	Gln	Cys	Leu											
			275														
55	<210>	7															
	<211>	294															
	<212>	PRT															
	<213>	Sordaria fimicola															
60	<220>																
	<221>	SEÑAL															
	<222>	(1)..(21)															
65	<400>	7															
	Met	Arg	Ser	Ser	Thr	Ile	Leu	Gln	Thr	Gly	Leu	Val	Ala	Val	Leu	Pro	
	1				5					10					15		
70	Phe	Ala	Val	Gln	Ala	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Arg	Tyr	Trp	
				20					25					30			
75	Asp	Cys	Cys	Lys	Pro	Ser	Cys	Ala	Trp	Ser	Gly	Lys	Ala	Ser	Val	Asn	
		35						40					45				

ES 2 800 477 T3

Arg Pro Val Leu Ala Cys Asp Ala Asn Asn Asn Pro Leu Asn Asp Ala
 50 55 60
 5
 Asn Val Lys Ser Gly Cys Asp Gly Gly Ser Ala Tyr Thr Cys Ala Asn
 65 70 75 80
 10
 Asn Ser Pro Trp Ala Val Asn Asp Asn Leu Ala Tyr Gly Phe Ala Ala
 85 90 95
 15
 Thr Lys Leu Ser Gly Gly Thr Glu Ser Ser Trp Cys Cys Ala Cys Tyr
 100 105 110
 20
 Ala Leu Thr Phe Thr Ser Gly Pro Val Ser Gly Lys Thr Leu Val Val
 115 120 125
 25
 Gln Ser Thr Ser Thr Gly Gly Asp Leu Gly Ser Asn His Phe Asp Leu
 130 135 140
 30
 Asn Met Pro Gly Gly Gly Val Gly Leu Phe Asp Gly Cys Lys Arg Glu
 145 150 155 160
 35
 Phe Gly Gly Leu Pro Gly Ala Gln Tyr Gly Gly Ile Ser Ser Arg Ser
 165 170 175
 40
 Glu Cys Asp Ser Phe Pro Ala Ala Leu Lys Pro Gly Cys Gln Trp Arg
 180 185 190
 45
 Phe Asp Trp Phe Lys Asn Ala Asp Asn Pro Glu Phe Thr Phe Lys Gln
 195 200 205
 50
 Val Gln Cys Pro Ser Glu Leu Thr Ser Arg Thr Gly Cys Lys Arg Asn
 210 215 220
 55
 Asp Asp Ser Gln Phe Pro Ala Phe Thr Pro Pro Ser Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240
 60
 Asn Pro Ser Thr Pro Thr Thr Pro Pro Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 245 250 255
 65
 Gly Cys Ala Ala Ala Met Tyr Ala Gln Cys Gly Gly Ser Gly Phe Ser
 260 265 270
 Gly Cys Thr Asn Cys Pro Ser Gly Ser Thr Cys Lys Ala Ile Asn Asp
 275 280 285
 Tyr Tyr His Gln Cys Ala
 290
 <210> 8
 <211> 1851

ES 2 800 477 T3

<212> ADN
<213> Penicillium oxalicum

5	<220> <221> CDS <222> (1)..(1851)	
10	<400> 8 atg cgt ctc act cta tta tca ggt gta gcc ggc gtt ctc tgc gca gga Met Arg Leu Thr Leu Leu Ser Gly Val Ala Gly Val Leu Cys Ala Gly 1 5 10 15	48
15	cag ctg acg gcg gcg cgt cct gat ccc aag ggt ggg aat ctg acg ccg Gln Leu Thr Ala Ala Arg Pro Asp Pro Lys Gly Gly Asn Leu Thr Pro 20 25 30	96
20	ttc atc cac aaa gag ggc gag cgg tcg ctc caa ggc atc ttg gac aat Phe Ile His Lys Glu Gly Glu Arg Ser Leu Gln Gly Ile Leu Asp Asn 35 40 45	144
25	ctc ggt ggg cga ggt aag aaa aca ccc ggc act gcc gca ggg ttg ttt Leu Gly Gly Arg Gly Lys Lys Thr Pro Gly Thr Ala Ala Gly Leu Phe 50 55 60	192
30	att gcc agt cca aac aca gag aat cca aac tat tat tat aca tgg act Ile Ala Ser Pro Asn Thr Glu Asn Pro Asn Tyr Tyr Tyr Thr Trp Thr 65 70 75 80	240
35	cgt gac tca gct ttg act gcc aag tgc ttg atc gac ctg ttc gaa gac Arg Asp Ser Ala Leu Thr Ala Lys Cys Leu Ile Asp Leu Phe Glu Asp 85 90 95	288
40	tct cgg gca aag ttt cca att gac cgc aaa tac ttg gaa aca gga att Ser Arg Ala Lys Phe Pro Ile Asp Arg Lys Tyr Leu Glu Thr Gly Ile 100 105 110	336
45	cgg gac tac gtg tcg tcc caa gca atc ctc cag agt gtg tct aat cct Arg Asp Tyr Val Ser Ser Gln Ala Ile Leu Gln Ser Val Ser Asn Pro 115 120 125	384
50	tct gga acc ctg aag gat ggc tct ggt ctg ggt gaa ccc aag ttt gag Ser Gly Thr Leu Lys Asp Gly Ser Gly Leu Gly Glu Pro Lys Phe Glu 130 135 140	432
55	att gac ctg aat ccc ttt tcg ggt gcc tgg ggt cgg cct cag cgg gat Ile Asp Leu Asn Pro Phe Ser Gly Ala Trp Gly Arg Pro Gln Arg Asp 145 150 155 160	480
60	ggc cca gcg ctg cga gcg acc gct atg atc acc tac gcc aac tac ctg Gly Pro Ala Leu Arg Ala Thr Ala Met Ile Thr Tyr Ala Asn Tyr Leu 165 170 175	528
65	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
	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
	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
	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	720

ES 2 800 477 T3

	225		230		235		240	
5	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						
10	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						
15	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						
20	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						
25	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						
30	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						
35	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						
40	tggt 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						
45	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						
50	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						
55	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						
60	gcg gac ggg ttc atc cag tta gtg cag cag tac act cct tct aat gga Ala Asp Gly Phe Ile Gln Leu Val Gln Gln Tyr Thr Pro Ser Asn Gly 420 425 430	1296						
65	tct ctg gcc gag caa tac gat cgc aat acg gct gct cct ctc tct gca Ser Leu Ala Glu Gln Tyr Asp Arg Asn Thr Ala Ala Pro Leu Ser Ala 435 440 445	1344						
70	aac gat ctg act tgg tca ttt gcc tct ttc ttg acg gct acg caa cgc Asn Asp Leu Thr Trp Ser Phe Ala Ser Phe Leu Thr Ala Thr Gln Arg 450 455 460	1392						
75	cgc gat gcc gtg gtt cct ccc tcc tgg ggc gca aag tcg gca aac aaa Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Ser Trp Gly Ala Lys Ser Ala Asn Lys 465 470 475 480	1440						
80	gtc cca acc act tgt tca gcc tcc cct gtt gtg ggt act tat aag gcg Val Pro Thr Thr Cys Ser Ala Ser Pro Val Val Gly Thr Tyr Lys Ala 485 490 495	1488						
85	ccc acg gca act ttc tca tcc aag act aag tgc gtc ccc gct aaa gat	1536						

ES 2 800 477 T3

	Pro	Thr	Ala	Thr	Phe	Ser	Ser	Lys	Thr	Lys	Cys	Val	Pro	Ala	Lys	Asp	
				500					505					510			
5	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				
10	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					
15	aag	aaa	ggc	ttc	cca	ctc	acc	gca	aac	ctc	tac	acg	caa	gat	caa	aac	1680
	Lys	Lys	Gly	Phe	Pro	Leu	Thr	Ala	Asn	Leu	Tyr	Thr	Gln	Asp	Gln	Asn	
	545					550				555					560		
	ttg	tgg	ttc	gcc	agt	gtc	gag	ttc	atc	cca	gca	ggc	aca	ccc	ttt	gag	1728
	Leu	Trp	Phe	Ala	Ser	Val	Glu	Phe	Ile	Pro	Ala	Gly	Thr	Pro	Phe	Glu	
					565					570					575		
20	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			
25	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				
30	cac	tcc	aac	gac	gtg	tgg	cag	ttt	tga								1851
	His	Ser	Asn	Asp	Val	Trp	Gln	Phe									
		610					615										
35	<210>	9															
	<211>	616															
	<212>	PRT															
	<213>	Penicillium oxalicum															
	<400>	9															
40	Met	Arg	Leu	Thr	Leu	Leu	Ser	Gly	Val	Ala	Gly	Val	Leu	Cys	Ala	Gly	
	1				5					10					15		
45	Gln	Leu	Thr	Ala	Ala	Arg	Pro	Asp	Pro	Lys	Gly	Gly	Asn	Leu	Thr	Pro	
				20					25					30			
50	Phe	Ile	His	Lys	Glu	Gly	Glu	Arg	Ser	Leu	Gln	Gly	Ile	Leu	Asp	Asn	
			35					40					45				
	Leu	Gly	Gly	Arg	Gly	Lys	Lys	Thr	Pro	Gly	Thr	Ala	Ala	Gly	Leu	Phe	
		50				55						60					
55	Ile	Ala	Ser	Pro	Asn	Thr	Glu	Asn	Pro	Asn	Tyr	Tyr	Tyr	Thr	Trp	Thr	
	65					70					75					80	
60	Arg	Asp	Ser	Ala	Leu	Thr	Ala	Lys	Cys	Leu	Ile	Asp	Leu	Phe	Glu	Asp	
					85					90					95		
65	Ser	Arg	Ala	Lys	Phe	Pro	Ile	Asp	Arg	Lys	Tyr	Leu	Glu	Thr	Gly	Ile	
			100						105					110			

ES 2 800 477 T3

	Arg	Asp	Tyr	Val	Ser	Ser	Gln	Ala	Ile	Leu	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	Pro
			115					120					125			
5	Ser	Gly	Thr	Leu	Lys	Asp	Gly	Ser	Gly	Leu	Gly	Glu	Pro	Lys	Phe	Glu
		130					135					140				
10	Ile	Asp	Leu	Asn	Pro	Phe	Ser	Gly	Ala	Trp	Gly	Arg	Pro	Gln	Arg	Asp
	145					150					155					160
15	Gly	Pro	Ala	Leu	Arg	Ala	Thr	Ala	Met	Ile	Thr	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Leu
					165					170					175	
20	Ile	Ser	His	Gly	Gln	Lys	Ser	Asp	Val	Ser	Gln	Val	Met	Trp	Pro	Ile
				180					185					190		
25	Ile	Ala	Asn	Asp	Leu	Ala	Tyr	Val	Gly	Gln	Tyr	Trp	Asn	Asn	Thr	Gly
			195					200					205			
30	Phe	Asp	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Asp	Gly	Ser	Ser	Phe	Phe	Thr	Ile	Ala
		210					215					220				
35	Val	Gln	His	Arg	Ala	Leu	Val	Glu	Gly	Ser	Gln	Leu	Ala	Lys	Lys	Leu
	225					230					235					240
40	Gly	Lys	Ser	Cys	Asp	Ala	Cys	Asp	Ser	Gln	Pro	Pro	Gln	Ile	Leu	Cys
					245					250					255	
45	Phe	Leu	Gln	Ser	Phe	Trp	Asn	Gly	Lys	Tyr	Ile	Thr	Ser	Asn	Ile	Asn
				260					265					270		
50	Thr	Gln	Ala	Ser	Arg	Ser	Gly	Ile	Asp	Leu	Asp	Ser	Val	Leu	Gly	Ser
			275					280					285			
55	Ile	His	Thr	Phe	Asp	Pro	Glu	Ala	Ala	Cys	Asp	Asp	Ala	Thr	Phe	Gln
		290					295					300				
60	Pro	Cys	Ser	Ala	Arg	Ala	Leu	Ala	Asn	His	Lys	Val	Tyr	Val	Asp	Ser
	305					310					315					320
65	Phe	Arg	Ser	Ile	Tyr	Lys	Ile	Asn	Ala	Gly	Leu	Ala	Glu	Gly	Ser	Ala
					325					330					335	
70	Ala	Asn	Val	Gly	Arg	Tyr	Pro	Glu	Asp	Val	Tyr	Gln	Gly	Gly	Asn	Pro
				340					345					350		
75	Trp	Tyr	Leu	Ala	Thr	Leu	Gly	Ala	Ser	Glu	Leu	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu
			355					360						365		
80	Tyr	Gln	Trp	Asp	Arg	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Leu
		370					375					380				

ES 2 800 477 T3

	Ser	Phe	Phe	Lys	Asp	Phe	Asp	Ala	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Ser	Tyr	Ser	385	390	395	400
5	Arg	Asn	Ser	Lys	Thr	Tyr	Lys	Lys	Leu	Thr	Gln	Ser	Ile	Lys	Ser	Tyr	405	410	415	
10	Ala	Asp	Gly	Phe	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Gln	Tyr	Thr	Pro	Ser	Asn	Gly	420	425	430	
15	Ser	Leu	Ala	Glu	Gln	Tyr	Asp	Arg	Asn	Thr	Ala	Ala	Pro	Leu	Ser	Ala	435	440	445	
20	Asn	Asp	Leu	Thr	Trp	Ser	Phe	Ala	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Thr	Gln	Arg	450	455	460	
25	Arg	Asp	Ala	Val	Val	Pro	Pro	Ser	Trp	Gly	Ala	Lys	Ser	Ala	Asn	Lys	465	470	475	480
30	Val	Pro	Thr	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Pro	Val	Val	Gly	Thr	Tyr	Lys	Ala	485	490	495	
35	Pro	Thr	Ala	Thr	Phe	Ser	Ser	Lys	Thr	Lys	Cys	Val	Pro	Ala	Lys	Asp	500	505	510	
40	Ile	Val	Pro	Ile	Thr	Phe	Tyr	Leu	Ile	Glu	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Glu	515	520	525	
45	Asn	Val	Phe	Met	Ser	Gly	Asn	Ile	Thr	Ala	Leu	Gly	Asn	Trp	Asp	Ala	530	535	540	
50	Lys	Lys	Gly	Phe	Pro	Leu	Thr	Ala	Asn	Leu	Tyr	Thr	Gln	Asp	Gln	Asn	545	550	555	560
55	Leu	Trp	Phe	Ala	Ser	Val	Glu	Phe	Ile	Pro	Ala	Gly	Thr	Pro	Phe	Glu	565	570	575	
60	Tyr	Lys	Tyr	Tyr	Lys	Val	Glu	Pro	Asn	Gly	Asp	Ile	Thr	Trp	Glu	Lys	580	585	590	
65	Gly	Pro	Asn	Arg	Val	Phe	Val	Ala	Pro	Thr	Gly	Cys	Pro	Val	Gln	Pro	595	600	605	
	His	Ser	Asn	Asp	Val	Trp	Gln	Phe									610	615		
	<210>	10																		
	<211>	4014																		
	<212>	ADN																		
	<213>	Thermococcus hydrothermalis																		

ES 2 800 477 T3

	<220>		
	<221>	CDS	
	<222>	(1)..(4011)	
5	<220>		
	<221>	misc_signal	
	<222>	(1)..(81)	
10	<220>		
	<221>	mat_peptide	
	<222>	(82)..(4014)	
	<400>	10	
15	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		
20	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		
25	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		
30	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		
35	aac aac tac tgg aag atg gcc cac tac ctg agc cag tac ccg gag gtt		240
	Asn Asn Tyr Trp Lys Met Ala His Tyr Leu Ser Gln Tyr Pro Glu Val		
	40 45 50		
40	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		
45	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		
50	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		
55	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		
60	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		
65	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		
70	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		
75	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		
80	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		

ES 2 800 477 T3

				185					190					195					
5	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						
10	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							
15	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				
20	gcc	cac	ccg	ata	ggc	ccg	ata	ctc	aac	gac	ttc	ggc	tgg	gac	agc	gac	864		
	Ala	His	Pro	Ile	Gly	Pro	Ile	Leu	Asn	Asp	Phe	Gly	Trp	Asp	Ser	Asp			
					250					255					260				
25	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					
30	ggc	ggc	ggc	acc	gcg	gtt	cca	aaa	ggc	gga	tgg	gcg	gct	gag	agc	gcc	960		
	Gly	Gly	Gly	Thr	Ala	Val	Pro	Lys	Gly	Gly	Trp	Ala	Ala	Glu	Ser	Ala			
			280					285					290						
35	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							
40	gtc	atg	acc	gac	cag	atg	gtt	ctc	gga	aag	ctc	ggc	att	gag	gga	acc	1056		
	Val	Met	Thr	Asp	Gln	Met	Val	Leu	Gly	Lys	Leu	Gly	Ile	Glu	Gly	Thr			
	310					315					320				325				
45	gtc	gag	aac	tac	cac	aag	ccc	tgg	gtg	gcc	gag	ttc	aac	gga	aag	aag	1104		
	Val	Glu	Asn	Tyr	His	Lys	Pro	Trp	Val	Ala	Glu	Phe	Asn	Gly	Lys	Lys			
					330				335					340					
50	ata	tac	ctc	ttc	cca	aga	aat	cac	gat	cta	agt	gac	aga	gtt	ggc	ttt	1152		
	Ile	Tyr	Leu	Phe	Pro	Arg	Asn	His	Asp	Leu	Ser	Asp	Arg	Val	Gly	Phe			
				345					350					355					
55	acc	tac	agc	gga	atg	aac	cag	cag	cag	gcc	gtt	gag	gac	ttc	gtc	aac	1200		
	Thr	Tyr	Ser	Gly	Met	Asn	Gln	Gln	Gln	Ala	Val	Glu	Asp	Phe	Val	Asn			
			360				365						370						
60	gag	ctc	ctc	aag	ctc	cag	aag	cag	aac	tac	gat	ggc	tcg	ctg	gtt	tac	1248		
	Glu	Leu	Leu	Lys	Leu	Gln	Lys	Gln	Asn	Tyr	Asp	Gly	Ser	Leu	Val	Tyr			
		375				380						385							
65	gtg	gtc	acg	ctc	gac	ggc	gag	aac	ccc	gtg	gag	aac	tac	ccc	tac	gac	1296		
	Val	Val	Thr	Leu	Asp	Gly	Glu	Asn	Pro	Val	Glu	Asn	Tyr	Pro	Tyr	Asp			
	390				395				400					405					
70	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					
75	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						
80	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						
85	gac	ctc	acc	gga	gac	aac	gtt	aac	gcc	ctc	ctc	aag	gcc	cag	agc	ctc	1488		

ES 2 800 477 T3

	Asp	Leu	Thr	Gly	Asp	Asn	Val	Asn	Ala	Leu	Leu	Lys	Ala	Gln	Ser	Leu	
	455						460					465					
5	ggc	gaa	ctc	tac	gac	atg	acc	ggc	gtt	aag	gag	gag	atg	cag	tgg	ccc	1536
	Gly	Glu	Leu	Tyr	Asp	Met	Thr	Gly	Val	Lys	Glu	Glu	Met	Gln	Trp	Pro	
	470					475					480					485	
10	gag	agc	agc	tgg	ata	gac	gga	acc	ctc	tcc	acg	tgg	ata	ggc	gag	ccc	1584
	Glu	Ser	Ser	Trp	Ile	Asp	Gly	Thr	Leu	Ser	Thr	Trp	Ile	Gly	Glu	Pro	
					490					495					500		
15	cag	gag	aac	tac	ggc	tgg	tac	tgg	ctc	tac	atg	gcc	agg	aag	gcc	ctt	1632
	Gln	Glu	Asn	Tyr	Gly	Trp	Tyr	Trp	Leu	Tyr	Met	Ala	Arg	Lys	Ala	Leu	
				505					510					515			
	atg	gag	aac	aag	gat	aaa	atg	agc	cag	gcg	gac	tgg	gag	aag	gcc	tac	1680
	Met	Glu	Asn	Lys	Asp	Lys	Met	Ser	Gln	Ala	Asp	Trp	Glu	Lys	Ala	Tyr	
			520					525					530				
20	gag	tac	ctg	ctc	cgc	gcc	gag	gca	agc	gac	tgg	ttc	tgg	tgg	tac	gga	1728
	Glu	Tyr	Leu	Leu	Arg	Ala	Glu	Ala	Ser	Asp	Trp	Phe	Trp	Trp	Tyr	Gly	
		535					540					545					
25	agc	gac	cag	gac	agc	ggc	cag	gac	tac	acc	ttc	gac	cgc	tac	ctg	aag	1776
	Ser	Asp	Gln	Asp	Ser	Gly	Gln	Asp	Tyr	Thr	Phe	Asp	Arg	Tyr	Leu	Lys	
	550					555					560					565	
30	acc	tac	ctc	tac	gag	atg	tac	aag	ctg	gca	gga	gtc	gag	ccg	ccg	agc	1824
	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Met	Tyr	Lys	Leu	Ala	Gly	Val	Glu	Pro	Pro	Ser	
					570					575					580		
35	tac	ctc	ttc	ggc	aac	tac	ttc	ccg	gac	gga	gag	ccc	tac	acc	acg	agg	1872
	Tyr	Leu	Phe	Gly	Asn	Tyr	Phe	Pro	Asp	Gly	Glu	Pro	Tyr	Thr	Thr	Arg	
			585						590					595			
	ggc	ctg	gtc	gga	ctc	aag	gac	ggc	gag	atg	aag	aac	ttc	tcc	agc	atg	1920
	Gly	Leu	Val	Gly	Leu	Lys	Asp	Gly	Glu	Met	Lys	Asn	Phe	Ser	Ser	Met	
			600					605					610				
40	tcc	ccg	ctg	gca	aag	ggc	gtg	agc	gtc	tat	ttc	gac	ggc	gag	ggg	ata	1968
	Ser	Pro	Leu	Ala	Lys	Gly	Val	Ser	Val	Tyr	Phe	Asp	Gly	Glu	Gly	Ile	
		615					620					625					
45	cac	ttc	ata	gtg	aaa	ggg	aac	ctg	gac	agg	ttc	gag	gtg	agc	atc	tgg	2016
	His	Phe	Ile	Val	Lys	Gly	Asn	Leu	Asp	Arg	Phe	Glu	Val	Ser	Ile	Trp	
	630					635					640					645	
50	gag	aag	gat	gag	cgc	gtt	ggc	aac	acg	ttc	acc	cgc	ctc	caa	gag	aag	2064
	Glu	Lys	Asp	Glu	Arg	Val	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Arg	Leu	Gln	Glu	Lys	
					650					655					660		
55	ccg	gac	gag	ttg	agc	tat	ttc	atg	ttc	cca	ttc	tca	agg	gac	agc	gtt	2112
	Pro	Asp	Glu	Leu	Ser	Tyr	Phe	Met	Phe	Pro	Phe	Ser	Arg	Asp	Ser	Val	
				665					670					675			
	ggt	ctc	ctc	ata	acc	aag	cac	gtc	gtg	tac	gag	aac	gga	aag	gcc	gag	2160
	Gly	Leu	Leu	Ile	Thr	Lys	His	Val	Val	Tyr	Glu	Asn	Gly	Lys	Ala	Glu	
			680					685					690				
60	ata	tac	ggc	gcc	acc	gac	tac	gag	aag	agc	gag	aag	ctt	ggg	gaa	gcc	2208
	Ile	Tyr	Gly	Ala	Thr	Asp	Tyr	Glu	Lys	Ser	Glu	Lys	Leu	Gly	Glu	Ala	
		695					700					705					
65	acc	gtc	aag	aac	acg	agc	gaa	gga	atc	gaa	gtc	gtc	ctt	ccc	ttt	gac	2256
	Thr	Val	Lys	Asn	Thr	Ser	Glu	Gly	Ile	Glu	Val	Val	Leu	Pro	Phe	Asp	
	710					715					720					725	

ES 2 800 477 T3

	tac ata gaa aac ccc tcc gac ttc tac ttc gct gtc tcg acg gtc aaa	2304
	Tyr Ile Glu Asn Pro Ser Asp Phe Tyr Phe Ala Val Ser Thr Val Lys	
	730 735 740	
5	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	
10	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	
15	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	
20	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	
25	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	
30	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	
35	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	
40	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	
45	gcc ttc agg ata gcg ggc tgg gac tac gga aac ctc atc atc ctg ccg	2736
	Ala Phe Arg Ile Ala Gly Trp Asp Tyr Gly Asn Leu Ile Ile Leu Pro	
	870 875 880 885	
50	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	
55	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	
60	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	
65	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	
70	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	
75	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	
80	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	

ES 2 800 477 T3

5	aag gcg ctg cta ctc ctc aag cag ggc atc gtt gtg acc gac ccg Lys Ala Leu Leu Leu Leu Lys Gln Gly Ile Val Val Thr Asp Pro 1000 1005 1010	3117
	gag gga gac gac cac ggg ccg gga acg tac acc tat ccg acg gac Glu Gly Asp Asp His Gly Pro Gly Thr Tyr Thr Tyr Pro Thr Asp 1015 1020 1025	3162
	aaa gtt ttc aag ccc ggt gtt ttc gac ctc ctc aag ttc aag gtg Lys Val Phe Lys Pro Gly Val Phe Asp Leu Leu Lys Phe Lys Val 1030 1035 1040	3207
	acc gag gga agc gac gac tgg acg ctg gag ttc cac ttc aaa gac Thr Glu Gly Ser Asp Asp Trp Thr Leu Glu Phe His Phe Lys Asp 1045 1050 1055	3252
	ctc ggt gga aac ccg tgg aac ggg ccg aac ggc ttc agc ctg cag Leu Gly Gly Asn Pro Trp Asn Gly Pro Asn Gly Phe Ser Leu Gln 1060 1065 1070	3297
25	ata atc gag gta tac ttc gac ttc aag gag ggc ggg aac gtc tcg Ile Ile Glu Val Tyr Phe Asp Phe Lys Glu Gly Gly Asn Val Ser 1075 1080 1085	3342
	gcc att aag atg ttc ccg gat ggg ccc gga agc aac gtc cgt ctt Ala Ile Lys Met Phe Pro Asp Gly Pro Gly Ser Asn Val Arg Leu 1090 1095 1100	3387
	gat cca aat cac cca tgg gac ctg gcg ctt agg ata gcc ggc tgg Asp Pro Asn His Pro Trp Asp Leu Ala Leu Arg Ile Ala Gly Trp 1105 1110 1115	3432
	gac tac gga aac ctg ata att ctg ccc gac gga acc gcc tac caa Asp Tyr Gly Asn Leu Ile Ile Leu Pro Asp Gly Thr Ala Tyr Gln 1120 1125 1130	3477
	ggc gag atg cag att tcc gca gat ccg gtt aag aac gcc ata ata Gly Glu Met Gln Ile Ser Ala Asp Pro Val Lys Asn Ala Ile Ile 1135 1140 1145	3522
45	gtc aag gtt cca aag aag tac ctg aac ata tcc gac tac gga ctc Val Lys Val Pro Lys Lys Tyr Leu Asn Ile Ser Asp Tyr Gly Leu 1150 1155 1160	3567
	tac acc gcc gtc atc gtg ggt tcc caa gac ggg tac ggc ccg gac Tyr Thr Ala Val Ile Val Gly Ser Gln Asp Gly Tyr Gly Pro Asp 1165 1170 1175	3612
	aag tgg agg ccc gtg gcc gct gag gcc gag cag tgg aag ctc gga Lys Trp Arg Pro Val Ala Ala Glu Ala Glu Gln Trp Lys Leu Gly 1180 1185 1190	3657
	ggc gca gac ccc cag gcg gtc ata gac aac ctc gta cca agg gtc Gly Ala Asp Pro Gln Ala Val Ile Asp Asn Leu Val Pro Arg Val 1195 1200 1205	3702
	gtt gat gaa ctc gtg ccg gag ggc ttc aag cca acg cag gag gag Val Asp Glu Leu Val Pro Glu Gly Phe Lys Pro Thr Gln Glu Glu 1210 1215 1220	3747
65	cag ctg agc agc tac gac ctt gag aag aag acc ctg gcg acg gtg Gln Leu Ser Ser Tyr Asp Leu Glu Lys Lys Thr Leu Ala Thr Val 1225 1230 1235	3792
	ctc atg gta ccg ctc gtc aat ggg act ggc ggc gag gaa cca acg Leu Met Val Pro Leu Val Asn Gly Thr Gly Gly Glu Glu Pro Thr 1240 1245 1250	3837

ES 2 800 477 T3

	1240	1245	1250	
5	ccg acg gag Pro Thr Glu 1255	agc cca acg gaa acg Ser Pro Thr Glu Thr 1260	acg aca acc aca ccc Thr Thr Thr Thr Pro Ser Glu 1265	agc gaa 3882
10	aca acc acc Thr Thr Thr 1270	aca act tca acg acc Thr Thr Ser Thr Thr 1275	acc ggc cca agc tca Thr Gly Pro Ser Ser Thr Thr 1280	acg acc 3927
15	acc agc aca Thr Ser Thr 1285	ccc ggc gga gga atc Pro Gly Gly Gly Ile 1290	tgc ggc cca ggc att Cys Gly Pro Gly Ile 1295	ata gcg 3972
20	ggc ctg gcc Gly Leu Ala 1300	ctg ata ccg ctc ctc Leu Ile Pro Leu Leu 1305	ctc aag agg agg aac tga Leu Lys Arg Arg Asn 1310	4014
25	<210> 11 <211> 1337 <212> PRT <213> Thermococcus hydrothermalis			
30	Met Arg Arg Val Val Ala Leu Phe Ile Ala Ile Leu Met Leu Gly Ser -25 -20 -15			
35	Ile Val Gly Ala Asn Val Lys Ser Val Gly Ala Ala 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 Val Gln Asp Val Tyr Thr Arg Pro Trp Val Arg Leu His Ala Ala 25 30 35			
50	Asn Asn Tyr Trp Lys Met Ala His Tyr Leu Ser Gln Tyr Pro Glu Val 40 45 50			
55	His Ala Thr 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 Ile Thr Glu Lys Ile 70 75 80 85			
65	Ala Asn Gly Glu Pro Leu Thr Val Asp Glu Lys Trp Phe Met Leu Gln 90 95 100			
	Ala Pro Gly Gly Phe Phe Asp Asn Thr Ile Pro Trp Asn Gly Glu Pro 105 110 115			
	Ile Thr Asp Pro Asn Gly Asn Pro Ile Arg Asp Phe Trp Asp Arg Tyr 120 125 130			
	Thr Glu Leu Lys Asn Lys Met Leu Ser Ala Lys Ala Lys Tyr Ala Asn			

ES 2 800 477 T3

[illegible]

ES 2 800 477 T3

	Gly	Glu	Leu	Phe	Leu	Thr	Glu	Leu	Tyr	Lys	Lys	Leu	Thr	Glu	Leu	Gln	
				410						415					420		
5	Glu	Gln	Gly	Leu	Ile	Arg	Thr	Leu	Thr	Pro	Ser	Glu	Tyr	Ile	Gln	Leu	
				425					430					435			
10	Tyr	Gly	Asp	Lys	Ala	Asn	Lys	Leu	Thr	Pro	Arg	Met	Met	Glu	Arg	Leu	
			440					445					450				
15	Asp	Leu	Thr	Gly	Asp	Asn	Val	Asn	Ala	Leu	Leu	Lys	Ala	Gln	Ser	Leu	
		455					460					465					
20	Gly	Glu	Leu	Tyr	Asp	Met	Thr	Gly	Val	Lys	Glu	Glu	Met	Gln	Trp	Pro	
	470					475					480					485	
25	Glu	Ser	Ser	Trp	Ile	Asp	Gly	Thr	Leu	Ser	Thr	Trp	Ile	Gly	Glu	Pro	
					490					495					500		
30	Gln	Glu	Asn	Tyr	Gly	Trp	Tyr	Trp	Leu	Tyr	Met	Ala	Arg	Lys	Ala	Leu	
				505					510					515			
35	Met	Glu	Asn	Lys	Asp	Lys	Met	Ser	Gln	Ala	Asp	Trp	Glu	Lys	Ala	Tyr	
			520					525					530				
40	Glu	Tyr	Leu	Leu	Arg	Ala	Glu	Ala	Ser	Asp	Trp	Phe	Trp	Trp	Tyr	Gly	
		535					540					545					
45	Ser	Asp	Gln	Asp	Ser	Gly	Gln	Asp	Tyr	Thr	Phe	Asp	Arg	Tyr	Leu	Lys	
	550					555					560					565	
50	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Glu	Met	Tyr	Lys	Leu	Ala	Gly	Val	Glu	Pro	Pro	Ser	
					570					575					580		
55	Tyr	Leu	Phe	Gly	Asn	Tyr	Phe	Pro	Asp	Gly	Glu	Pro	Tyr	Thr	Thr	Arg	
				585					590					595			
60	Gly	Leu	Val	Gly	Leu	Lys	Asp	Gly	Glu	Met	Lys	Asn	Phe	Ser	Ser	Met	
			600					605					610				
65	Ser	Pro	Leu	Ala	Lys	Gly	Val	Ser	Val	Tyr	Phe	Asp	Gly	Glu	Gly	Ile	
		615					620					625					
70	His	Phe	Ile	Val	Lys	Gly	Asn	Leu	Asp	Arg	Phe	Glu	Val	Ser	Ile	Trp	
	630					635					640					645	
75	Glu	Lys	Asp	Glu	Arg	Val	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Arg	Leu	Gln	Glu	Lys	
					650					655					660		
80	Pro	Asp	Glu	Leu	Ser	Tyr	Phe	Met	Phe	Pro	Phe	Ser	Arg	Asp	Ser	Val	
				665					670					675			

ES 2 800 477 T3

	Gly	Leu	Leu	Ile	Thr	Lys	His	Val	Val	Tyr	Glu	Asn	Gly	Lys	Ala	Glu	
		680						685					690				
5	Ile	Tyr	Gly	Ala	Thr	Asp	Tyr	Glu	Lys	Ser	Glu	Lys	Leu	Gly	Glu	Ala	
		695					700					705					
10	Thr	Val	Lys	Asn	Thr	Ser	Glu	Gly	Ile	Glu	Val	Val	Leu	Pro	Phe	Asp	
	710					715					720					725	
15	Tyr	Ile	Glu	Asn	Pro	Ser	Asp	Phe	Tyr	Phe	Ala	Val	Ser	Thr	Val	Lys	
					730					735					740		
20	Asp	Gly	Asp	Leu	Glu	Val	Ile	Ser	Thr	Pro	Val	Glu	Leu	Lys	Leu	Pro	
				745					750					755			
25	Thr	Glu	Val	Lys	Gly	Val	Val	Ile	Ala	Asp	Ile	Thr	Asp	Pro	Glu	Gly	
		760						765					770				
30	Asp	Asp	His	Gly	Pro	Gly	Asn	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Thr	Asp	Lys	Val	Phe	
	775						780					785					
35	Lys	Pro	Gly	Val	Phe	Asp	Leu	Leu	Arg	Phe	Arg	Met	Leu	Glu	Gln	Thr	
	790					795					800					805	
40	Glu	Ser	Tyr	Val	Met	Glu	Phe	Tyr	Phe	Lys	Asp	Leu	Gly	Gly	Asn	Pro	
				810						815					820		
45	Trp	Asn	Gly	Pro	Asn	Gly	Phe	Ser	Leu	Gln	Ile	Ile	Glu	Val	Tyr	Leu	
			825						830					835			
50	Asp	Phe	Lys	Asp	Gly	Gly	Asn	Ser	Ser	Ala	Ile	Lys	Met	Phe	Pro	Asp	
		840						845					850				
55	Gly	Pro	Gly	Ala	Asn	Val	Asn	Leu	Asp	Pro	Glu	His	Pro	Trp	Asp	Val	
	855						860					865					
60	Ala	Phe	Arg	Ile	Ala	Gly	Trp	Asp	Tyr	Gly	Asn	Leu	Ile	Ile	Leu	Pro	
	870					875					880					885	
65	Asn	Gly	Thr	Ala	Ile	Gln	Gly	Glu	Met	Gln	Ile	Ser	Ala	Asp	Pro	Val	
				890						895					900		
70	Lys	Asn	Ala	Ile	Ile	Val	Lys	Val	Pro	Lys	Lys	Tyr	Ile	Ala	Ile	Asn	
			905						910					915			
75	Glu	Asp	Tyr	Gly	Leu	Trp	Gly	Asp	Val	Leu	Val	Gly	Ser	Gln	Asp	Gly	
		920						925					930				
80	Tyr	Gly	Pro	Asp	Lys	Trp	Arg	Thr	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	Glu	Gln	Trp	
	935						940					945					

ES 2 800 477 T3

5	Lys 950	Leu	Gly	Gly	Ala	Asp 955	Pro	Gln	Ala	Val	Ile 960	Asn	Gly	Val	Ala	Pro 965
10	Arg	Val	Ile	Asp 970	Glu	Leu	Val	Pro	Gln	Gly 975	Phe	Glu	Pro	Thr	Gln 980	Glu
15	Glu	Gln	Leu	Ser 985	Ser	Tyr	Asp	Ala	Asn 990	Asp	Met	Lys	Leu	Ala 995	Thr	Val
20	Lys	Ala	Leu 1000	Leu	Leu	Leu	Lys	Gln 1005	Gly	Ile	Val	Val	Thr 1010	Asp	Pro	
25	Glu	Gly	Asp 1015	Asp	His	Gly	Pro	Gly 1020	Thr	Tyr	Thr	Tyr	Pro 1025	Thr	Asp	
30	Lys	Val	Phe 1030	Lys	Pro	Gly	Val	Phe 1035	Asp	Leu	Leu	Lys	Phe 1040	Lys	Val	
35	Thr	Glu	Gly 1045	Ser	Asp	Asp	Trp	Thr 1050	Leu	Glu	Phe	His	Phe 1055	Lys	Asp	
40	Leu	Gly	Gly 1060	Asn	Pro	Trp	Asn	Gly 1065	Pro	Asn	Gly	Phe	Ser 1070	Leu	Gln	
45	Ile	Ile	Glu 1075	Val	Tyr	Phe	Asp	Phe 1080	Lys	Glu	Gly	Gly	Asn 1085	Val	Ser	
50	Ala	Ile	Lys 1090	Met	Phe	Pro	Asp	Gly 1095	Pro	Gly	Ser	Asn	Val 1100	Arg	Leu	
55	Asp	Pro	Asn 1105	His	Pro	Trp	Asp	Leu 1110	Ala	Leu	Arg	Ile	Ala 1115	Gly	Trp	
60	Asp	Tyr	Gly 1120	Asn	Leu	Ile	Ile	Leu 1125	Pro	Asp	Gly	Thr	Ala 1130	Tyr	Gln	
65	Gly	Glu	Met 1135	Gln	Ile	Ser	Ala	Asp 1140	Pro	Val	Lys	Asn	Ala 1145	Ile	Ile	
	Val	Lys	Val 1150	Pro	Lys	Lys	Tyr	Leu 1155	Asn	Ile	Ser	Asp	Tyr 1160	Gly	Leu	
	Tyr	Thr	Ala 1165	Val	Ile	Val	Gly	Ser 1170	Gln	Asp	Gly	Tyr	Gly 1175	Pro	Asp	
	Lys	Trp	Arg 1180	Pro	Val	Ala	Ala	Glu 1185	Ala	Glu	Gln	Trp	Lys 1190	Leu	Gly	
	Gly	Ala	Asp	Pro	Gln	Ala	Val	Ile	Asp	Asn	Leu	Val	Pro	Arg	Val	

ES 2 800 477 T3

[illegible]

ES 2 800 477 T3

	Asn	Asn	Tyr	Trp	Lys	Met	Ala	Asn	Tyr	Leu	Ser	Lys	Tyr	Pro	Asp	Val
			40					45					50			
5	His	Val	Ala	Ile	Asp	Leu	Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Ala	Gln	Leu	Ala	Asp
		55					60					65				
10	Tyr	Met	Asn	Gly	Lys	Lys	Asp	Thr	Tyr	Gln	Ile	Val	Thr	Glu	Lys	Ile
	70					75					80					85
15	Ala	Asn	Gly	Glu	Pro	Leu	Thr	Leu	Glu	Asp	Lys	Trp	Phe	Met	Leu	Gln
					90					95					100	
20	Ala	Pro	Gly	Gly	Phe	Phe	Asp	His	Thr	Ile	Pro	Trp	Asn	Gly	Glu	Pro
				105					110					115		
25	Val	Ala	Asp	Glu	Asn	Gly	Asn	Pro	Tyr	Arg	Glu	Gln	Trp	Asp	Arg	Tyr
			120					125					130			
30	Ala	Glu	Leu	Lys	Asp	Lys	Arg	Asn	Asn	Ala	Phe	Lys	Lys	Tyr	Ala	Asn
			135				140					145				
35	Leu	Pro	Leu	Asn	Glu	Gln	Lys	Val	Lys	Ile	Thr	Ala	Glu	Phe	Thr	Glu
	150					155					160					165
40	Gln	Asp	Tyr	Ile	Asp	Leu	Ala	Val	Leu	Phe	Asn	Leu	Ala	Trp	Ile	Asp
					170					175					180	
45	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Ile	Asn	Thr	Pro	Glu	Leu	Lys	Ala	Leu	Tyr	Asp	Lys
				185					190					195		
50	Val	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr	Thr	Lys	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Val	Leu	Lys
			200					205					210			
55	His	Gln	Met	Trp	Leu	Leu	Asn	His	Thr	Phe	Glu	Glu	His	Glu	Lys	Ile
			215				220					225				
60	Asn	Tyr	Leu	Leu	Gly	Asn	Gly	Asn	Val	Glu	Val	Thr	Val	Val	Pro	Tyr
	230					235					240					245
65	Ala	His	Pro	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Asn	Asp	Phe	Gly	Trp	Tyr	Glu	Asp
					250					255					260	
70	Phe	Asp	Ala	His	Val	Lys	Lys	Ala	His	Glu	Leu	Tyr	Lys	Lys	Tyr	Leu
				265					270					275		
75	Gly	Asp	Asn	Arg	Val	Glu	Pro	Gln	Gly	Gly	Trp	Ala	Ala	Glu	Ser	Ala
			280					285					290			
80	Leu	Asn	Asp	Lys	Thr	Leu	Glu	Ile	Leu	Thr	Asn	Asn	Gly	Trp	Lys	Trp
		295					300					305				

ES 2 800 477 T3

	Val Met Thr Asp Gln Met Val Leu Asp Ile Leu Gly Ile Pro Asn Thr	
	310	315 320 325
5	Val Glu Asn Tyr Tyr Lys Pro Trp Val Ala Glu Phe Asn Gly Lys Lys	
		330 335 340
10	Ile Tyr Leu Phe Pro Arg Asn His Asp Leu Ser Asp Arg Val Gly Phe	
		345 350 355
15	Arg Tyr Ser Gly Met Asn Gln Tyr Gln Ala Val Glu Asp Phe Val Asn	
		360 365 370
20	Glu Leu Leu Lys Val Gln Lys Glu Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Val Tyr	
		375 380 385
25	Val Val Thr Leu Asp Gly Glu Asn Pro Trp Glu His Tyr Pro Phe Asp	
		390 395 400 405
30	Gly Lys Ile Phe Leu Glu Glu Leu Tyr Lys Lys Leu Thr Glu Leu Gln	
		410 415 420
35	Lys Gln Gly Leu Ile Arg Thr Val Thr Pro Ser Glu Tyr Ile Gln Met	
		425 430 435
40	Tyr Gly Asp Lys Ala Asn Lys Leu Thr Pro Arg Met Met Glu Arg Leu	
		440 445 450
45	Asp Leu Thr Gly Asp Asn Val Asn Ala Leu Leu Lys Ala Gln Ser Leu	
		455 460 465
50	Gly Glu Leu Tyr Asp Met Thr Gly Val Lys Glu Glu Met Gln Trp Pro	
		470 475 480 485
55	Glu Ser Ser Trp Ile Asp Gly Thr Leu Ser Thr Trp Ile Gly Glu Pro	
		490 495 500
60	Gln Glu Asn Tyr Gly Trp Tyr Trp Leu Tyr Met Ala Arg Lys Ala Leu	
		505 510 515
65	Met Glu Asn Lys Asp Lys Met Ser Gln Ala Asp Trp Glu Lys Ala Tyr	
		520 525 530
70	Glu Tyr Leu Leu Arg Ala Glu Ala Ser Asp Trp Phe Trp Trp Tyr Gly	
		535 540 545
75	Ser Asp Gln Asp Ser Gly Gln Asp Tyr Thr Phe Asp Arg Tyr Leu Lys	
		550 555 560 565
80	Thr Tyr Leu Tyr Glu Met Tyr Lys Leu Ala Gly Val Glu Pro Pro Ser	
		570 575 580

ES 2 800 477 T3

Tyr Leu Phe Gly Asn Tyr Phe Pro Asp Gly Glu Pro Tyr Thr Thr Arg
 585 590 595
 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
 65
 <210> 13
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> Pyrococcus furiosus
 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(412)
 <223> Proteasa de pyrococcus furiosus (Pfu)
 <400> 13

ES 2 800 477 T3

	Ala	Glu	Leu	Glu	Gly	Leu	Asp	Glu	Ser	Ala	Ala	Gln	Val	Met	Ala	Thr	
	1				5					10					15		
5	Tyr	Val	Trp	Asn	Leu	Gly	Tyr	Asp	Gly	Ser	Gly	Ile	Thr	Ile	Gly	Ile	
				20					25					30			
10	Ile	Asp	Thr	Gly	Ile	Asp	Ala	Ser	His	Pro	Asp	Leu	Gln	Gly	Lys	Val	
			35					40					45				
15	Ile	Gly	Trp	Val	Asp	Phe	Val	Asn	Gly	Arg	Ser	Tyr	Pro	Tyr	Asp	Asp	
		50					55					60					
20	His	Gly	His	Gly	Thr	His	Val	Ala	Ser	Ile	Ala	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	
	65					70					75					80	
25	Ala	Ser	Asn	Gly	Lys	Tyr	Lys	Gly	Met	Ala	Pro	Gly	Ala	Lys	Leu	Ala	
					85					90					95		
30	Gly	Ile	Lys	Val	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly	Ser	Gly	Ser	Ile	Ser	Thr	Ile	
				100					105					110			
35	Ile	Lys	Gly	Val	Glu	Trp	Ala	Val	Asp	Asn	Lys	Asp	Lys	Tyr	Gly	Ile	
		115						120					125				
40	Lys	Val	Ile	Asn	Leu	Ser	Leu	Gly	Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Asp	Gly	Thr	
		130					135					140					
45	Asp	Ala	Leu	Ser	Gln	Ala	Val	Asn	Ala	Ala	Trp	Asp	Ala	Gly	Leu	Val	
	145					150					155					160	
50	Val	Val	Val	Ala	Ala	Gly	Asn	Ser	Gly	Pro	Asn	Lys	Tyr	Thr	Ile	Gly	
					165					170					175		
55	Ser	Pro	Ala	Ala	Ala	Ser	Lys	Val	Ile	Thr	Val	Gly	Ala	Val	Asp	Lys	
				180					185					190			
60	Tyr	Asp	Val	Ile	Thr	Ser	Phe	Ser	Ser	Arg	Gly	Pro	Thr	Ala	Asp	Gly	
			195					200					205				
65	Arg	Leu	Lys	Pro	Glu	Val	Val	Ala	Pro	Gly	Asn	Trp	Ile	Ile	Ala	Ala	
		210					215					220					
70	Arg	Ala	Ser	Gly	Thr	Ser	Met	Gly	Gln	Pro	Ile	Asn	Asp	Tyr	Tyr	Thr	
	225					230					235					240	
75	Ala	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Met	Ala	Thr	Pro	His	Val	Ala	Gly	Ile	Ala	
					245					250					255		
80	Ala	Leu	Leu	Leu	Gln	Ala	His	Pro	Ser	Trp	Thr	Pro	Asp	Lys	Val	Lys	
				260					265					270			

ES 2 800 477 T3

Thr Ala Leu Ile Glu Thr Ala Asp Ile Val Lys Pro Asp Glu Ile Ala
 275 280 285
 5
 Asp Ile Ala Tyr Gly Ala Gly Arg Val Asn Ala Tyr Lys Ala Ile Asn
 290 295 300
 10
 Tyr Asp Asn Tyr Ala Lys Leu Val Phe Thr Gly Tyr Val Ala Asn Lys
 305 310 315 320
 15
 Gly Ser Gln Thr His Gln Phe Val Ile Ser Gly Ala Ser Phe Val Thr
 325 330 335
 20
 Ala Thr Leu Tyr Trp Asp Asn Ala Asn Ser Asp Leu Asp Leu Tyr Leu
 340 345 350
 25
 Tyr Asp Pro Asn Gly Asn Gln Val Asp Tyr Ser Tyr Thr Ala Tyr Tyr
 355 360 365
 30
 Gly Phe Glu Lys Val Gly Tyr Tyr Asn Pro Thr Asp Gly Thr Trp Thr
 370 375 380
 35
 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
 <210> 14
 <211> 595
 <212> PRT
 <213> Penicillium oxalicum
 45
 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..(595)
 <223> Secuencia de glucoamilasa de Penicillium oxalicum madura
 50
 <400> 14
 Arg Pro Asp Pro Lys Gly Gly Asn Leu Thr Pro Phe Ile His Lys Glu
 1 5 10 15
 55
 Gly Glu Arg Ser Leu Gln Gly Ile Leu Asp Asn Leu Gly Gly Arg Gly
 20 25 30
 60
 Lys Lys Thr Pro Gly Thr Ala Ala Gly Leu Phe Ile Ala Ser Pro Asn
 35 40 45
 65
 Thr Glu Asn Pro Asn Tyr Tyr Tyr Thr Trp Thr Arg Asp Ser Ala Leu
 50 55 60
 Thr Ala Lys Cys Leu Ile Asp Leu Phe Glu Asp Ser Arg Ala Lys Phe

ES 2 800 477 T3

	65					70											75													80
5	Pro	Ile	Asp	Arg	Lys	Tyr	Leu	Glu	Thr	Gly	Ile	Arg	Asp	Tyr	Lys	Ser														
					85					90					95															
10	Ser	Gln	Ala	Ile	Leu	Gln	Ser	Val	Ser	Asn	Pro	Ser	Gly	Thr	Leu	Lys														
				100					105					110																
15	Asp	Gly	Ser	Gly	Leu	Gly	Glu	Pro	Lys	Phe	Glu	Ile	Asp	Leu	Asn	Pro														
			115					120					125																	
20	Phe	Ser	Gly	Ala	Trp	Gly	Arg	Pro	Gln	Arg	Asp	Gly	Pro	Ala	Leu	Arg														
		130					135					140																		
25	Ala	Thr	Ala	Met	Ile	Thr	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Leu	Ile	Ser	His	Gly	Gln														
		145				150					155																			
30	Lys	Ser	Asp	Val	Ser	Gln	Val	Met	Trp	Pro	Ile	Ile	Ala	Asn	Asp	Leu														
				165					170						175															
35	Ala	Tyr	Val	Gly	Gln	Tyr	Trp	Asn	Asn	Thr	Gly	Phe	Asp	Leu	Trp	Glu														
			180					185						190																
40	Glu	Val	Asp	Gly	Ser	Ser	Phe	Phe	Thr	Ile	Ala	Val	Gln	His	Arg	Ala														
		195						200					205																	
45	Leu	Val	Glu	Gly	Ser	Gln	Leu	Ala	Lys	Lys	Leu	Gly	Lys	Ser	Cys	Asp														
		210				215						220																		
50	Ala	Cys	Asp	Ser	Gln	Pro	Pro	Gln	Ile	Leu	Cys	Phe	Leu	Gln	Ser	Phe														
		225				230					235																			
55	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														
			260					265					270																	
65	Pro	Glu	Ala	Ala	Cys	Asp	Asp	Ala	Thr	Phe	Gln	Pro	Cys	Ser	Ala	Arg														
		275					280					285																		
70	Ala	Leu	Ala	Asn	His	Lys	Val	Tyr	Val	Asp	Ser	Phe	Arg	Ser	Ile	Tyr														
		290				295						300																		
75	Lys	Ile	Asn	Ala	Gly	Leu	Ala	Glu	Gly	Ser	Ala	Ala	Asn	Val	Gly	Arg														
		305				310					315																			
80	Tyr	Pro	Glu	Asp	Val	Tyr	Gln	Gly	Gly	Asn	Pro	Trp	Tyr	Leu	Ala	Thr														
				325						330					335															

ES 2 800 477 T3

	Leu	Gly	Ala	Ser	Glu	Leu	Leu	Tyr	Asp	Ala	Leu	Tyr	Gln	Trp	Asp	Arg	
				340					345					350			
5	Leu	Gly	Lys	Leu	Glu	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Leu	Ser	Phe	Phe	Lys	Asp	
			355					360					365				
10	Phe	Asp	Ala	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Ser	Tyr	Ser	Arg	Asn	Ser	Lys	Thr	
		370					375					380					
15	Tyr	Lys	Lys	Leu	Thr	Gln	Ser	Ile	Lys	Ser	Tyr	Ala	Asp	Gly	Phe	Ile	
	385					390					395					400	
20	Gln	Leu	Val	Gln	Gln	Tyr	Thr	Pro	Ser	Asn	Gly	Ser	Leu	Ala	Glu	Gln	
					405					410					415		
25	Tyr	Asp	Arg	Asn	Thr	Ala	Ala	Pro	Leu	Ser	Ala	Asn	Asp	Leu	Thr	Trp	
				420					425					430			
30	Ser	Phe	Ala	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Thr	Gln	Arg	Arg	Asp	Ala	Val	Val	
			435					440					445				
35	Pro	Pro	Ser	Trp	Gly	Ala	Lys	Ser	Ala	Asn	Lys	Val	Pro	Thr	Thr	Cys	
		450					455					460					
40	Ser	Ala	Ser	Pro	Val	Val	Gly	Thr	Tyr	Lys	Ala	Pro	Thr	Ala	Thr	Phe	
	465					470					475					480	
45	Ser	Ser	Lys	Thr	Lys	Cys	Val	Pro	Ala	Lys	Asp	Ile	Val	Pro	Ile	Thr	
					485					490					495		
50	Phe	Tyr	Leu	Ile	Glu	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Asn	Val	Phe	Met	Ser	
				500					505					510			
55	Gly	Asn	Ile	Thr	Ala	Leu	Gly	Asn	Trp	Asp	Ala	Lys	Lys	Gly	Phe	Pro	
			515					520					525				
60	Leu	Thr	Ala	Asn	Leu	Tyr	Thr	Gln	Asp	Gln	Asn	Leu	Trp	Phe	Ala	Ser	
		530					535					540					
65	Val	Glu	Phe	Ile	Pro	Ala	Gly	Thr	Pro	Phe	Glu	Tyr	Lys	Tyr	Tyr	Lys	
	545					550					555					560	
70	Val	Glu	Pro	Asn	Gly	Asp	Ile	Thr	Trp	Glu	Lys	Gly	Pro	Asn	Arg	Val	
					565					570					575		
75	Phe	Val	Ala	Pro	Thr	Gly	Cys	Pro	Val	Gln	Pro	His	Ser	Asn	Asp	Val	
				580					585					590			
80	Trp	Gln	Phe														
			595														

ES 2 800 477 T3

5	<210> 15 <211> 49 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Cebador Prot F	
10	<400> 15 aacgacggta cccgggggatc ggatccatgc ggctcgttgc ttccctaac	49
15	<210> 16 <211> 48 <212> ADN <213> secuencia artificial <220> <223> Cebador Prot R	
20	<400> 16 ctaattacat gatgcggccc ttaattaatt agcaaccaag gtatatgg	48
25	<210> 17 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador AM34	
35	<400> 17 taggagttta gtgaacttgc	20
40	<210> 18 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> cebador AM35	
45	<400> 18 ttcgagcgtc ccaaaacc	18
50	<210> 19 <211> 25 <212> ADN <213> Cebador artificial	
55	<220> <223> Cebador sentido	
60	<400> 19 atgcgtctca ctctattatc aggtg	25
65	<210> 20 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	

ES 2 800 477 T3

	<223> Cebador F	
5	<400> 20 acacaactgg ggatccacca tgcgtctcac tctattatc	39
10	<210> 21 <211> 37 <212> ADN <213> Cebador artificial	
15	<220> <223> Cebador R <400> 21 agatctcgag aagcttaaaa ctgccacacg tcgttgg	37
20	<210> 22 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador <400> 22 gcagtctttc caattgac	18
30	<210> 23 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador <400> 23 aattggaaag actgcccg	18
45	<210> 24 <211> 39 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador <400> 24 acacaactgg ggatccacca tgcgtctcac tctattatc	39
55	<210> 25 <211> 37 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador <400> 25 agatctcgag aagcttaaaa ctgccacacg tcgttgg	37
65	<210> 26	

ES 2 800 477 T3

<211> 574
 <212> PRT
 <213> Trametes cingulata

5 <400> 26

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

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

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

20 Ser Asn Gly Ala Lys Ala Gly Ile Val Ile Ala Ser Pro Ser Thr Ser
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

Trp Leu Leu Asp Asn Lys Asn Thr Thr Tyr Val Thr Asn Thr Leu Trp
 165 170 175

50 Pro Ile Ile Lys Leu Asp Leu Asp Tyr Val Ala Ser Asn Trp Asn Gln
 180 185 190

55 Ser Thr Phe Asp Leu Trp Glu Glu Ile Asn Ser Ser Ser Phe Phe Thr
 195 200 205

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

65 Arg Ile Gly Gln Thr Ser Val Val Ser Gly Tyr Thr Thr Gln Ala Asn
 225 230 235 240

Asn Leu Leu Cys Phe Leu Gln Ser Tyr Trp Asn Pro Thr Gly Gly Tyr

ES 2 800 477 T3

				245					250					255			
5	Ile	Thr	Ala	Asn	Thr	Gly	Gly	Gly	Arg	Ser	Gly	Lys	Asp	Ala	Asn	Thr	
				260					265					270			
10	Val	Leu	Thr	Ser	Ile	His	Thr	Phe	Asp	Pro	Ala	Ala	Gly	Cys	Asp	Ala	
			275					280					285				
15	Val	Thr	Phe	Gln	Pro	Cys	Ser	Asp	Lys	Ala	Leu	Ser	Asn	Leu	Lys	Val	
		290					295					300					
20	Tyr	Val	Asp	Ala	Phe	Arg	Ser	Ile	Tyr	Ser	Ile	Asn	Ser	Gly	Ile	Ala	
	305					310					315					320	
25	Ser	Asn	Ala	Ala	Val	Ala	Thr	Gly	Arg	Tyr	Pro	Glu	Asp	Ser	Tyr	Met	
					325					330					335		
30	Gly	Gly	Asn	Pro	Trp	Tyr	Leu	Thr	Thr	Ser	Ala	Val	Ala	Glu	Gln	Leu	
			340						345					350			
35	Tyr	Asp	Ala	Leu	Ile	Val	Trp	Asn	Lys	Leu	Gly	Ala	Leu	Asn	Val	Thr	
		355						360					365				
40	Ser	Thr	Ser	Leu	Pro	Phe	Phe	Gln	Gln	Phe	Ser	Ser	Gly	Val	Thr	Val	
		370					375					380					
45	Gly	Thr	Tyr	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Thr	Phe	Lys	Thr	Leu	Thr	Ser	Ala	
	385				390						395					400	
50	Ile	Lys	Thr	Phe	Ala	Asp	Gly	Phe	Leu	Ala	Val	Asn	Ala	Lys	Tyr	Thr	
				405					410						415		
55	Pro	Ser	Asn	Gly	Gly	Leu	Ala	Glu	Gln	Tyr	Ser	Arg	Ser	Asn	Gly	Ser	
			420						425					430			
60	Pro	Val	Ser	Ala	Val	Asp	Leu	Thr	Trp	Ser	Tyr	Ala	Ala	Ala	Leu	Thr	
		435						440					445				
65	Ser	Phe	Ala	Ala	Arg	Ser	Gly	Lys	Thr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Gly	Ala	Ala	
	450						455					460					
70	Gly	Leu	Thr	Val	Pro	Thr	Thr	Cys	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ala	Gly	Thr	
	465					470					475					480	
75	Val	Ala	Val	Thr	Phe	Asn	Val	Gln	Ala	Thr	Thr	Val	Phe	Gly	Glu	Asn	
					485					490					495		
80	Ile	Tyr	Ile	Thr	Gly	Ser	Val	Pro	Ala	Leu	Gln	Asn	Trp	Ser	Pro	Asp	
			500						505					510			

ES 2 800 477 T3

	Asn	Ala	Leu	Ile	Leu	Ser	Ala	Ala	Asn	Tyr	Pro	Thr	Trp	Ser	Ile	Thr	
			515					520					525				
5	Val	Asn	Leu	Pro	Ala	Ser	Thr	Thr	Ile	Glu	Tyr	Lys	Tyr	Ile	Arg	Lys	
		530					535					540					
10	Phe	Asn	Gly	Ala	Val	Thr	Trp	Glu	Ser	Asp	Pro	Asn	Asn	Ser	Ile	Thr	
	545					550					555					560	
15	Thr	Pro	Ala	Ser	Gly	Thr	Phe	Thr	Gln	Asn	Asp	Thr	Trp	Arg			
					565					570							
20	<210>	27															
	<211>	583															
	<212>	PRT															
	<213>	Rhizomucor pusillus															
	<400>	27															
25	Ala	Thr	Ser	Asp	Asp	Trp	Lys	Gly	Lys	Ala	Ile	Tyr	Gln	Leu	Leu	Thr	
	1				5					10					15		
30	Asp	Arg	Phe	Gly	Arg	Ala	Asp	Asp	Ser	Thr	Ser	Asn	Cys	Ser	Asn	Leu	
				20					25					30			
35	Ser	Asn	Tyr	Cys	Gly	Gly	Thr	Tyr	Glu	Gly	Ile	Thr	Lys	His	Leu	Asp	
			35					40					45				
40	Tyr	Ile	Ser	Gly	Met	Gly	Phe	Asp	Ala	Ile	Trp	Ile	Ser	Pro	Ile	Pro	
		50					55					60					
45	Lys	Asn	Ser	Asp	Gly	Gly	Tyr	His	Gly	Tyr	Trp	Ala	Thr	Asp	Phe	Tyr	
	65					70					75					80	
50	Gln	Leu	Asn	Ser	Asn	Phe	Gly	Asp	Glu	Ser	Gln	Leu	Lys	Ala	Leu	Ile	
					85					90					95		
55	Gln	Ala	Ala	His	Glu	Arg	Asp	Met	Tyr	Val	Met	Leu	Asp	Val	Val	Ala	
				100				105						110			
60	Asn	His	Ala	Gly	Pro	Thr	Ser	Asn	Gly	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Gly	
			115					120					125				
65	Asp	Ala	Ser	Leu	Tyr	His	Pro	Lys	Cys	Thr	Ile	Asp	Tyr	Asn	Asp	Gln	
		130					135					140					
70	Thr	Ser	Ile	Glu	Gln	Cys	Trp	Val	Ala	Asp	Glu	Leu	Pro	Asp	Ile	Asp	
	145					150					155					160	
75	Thr	Glu	Asn	Ser	Asp	Asn	Val	Ala	Ile	Leu	Asn	Asp	Ile	Val	Ser	Gly	
					165					170					175		

ES 2 800 477 T3

	Trp	Val	Gly	Asn	Tyr	Ser	Phe	Asp	Gly	Ile	Arg	Ile	Asp	Thr	Val	Lys	
				180					185					190			
5	His	Ile	Arg	Lys	Asp	Phe	Trp	Thr	Gly	Tyr	Ala	Glu	Ala	Ala	Gly	Val	
			195					200					205				
10	Phe	Ala	Thr	Gly	Glu	Val	Phe	Asn	Gly	Asp	Pro	Ala	Tyr	Val	Gly	Pro	
		210					215					220					
15	Tyr	Gln	Lys	Tyr	Leu	Pro	Ser	Leu	Ile	Asn	Tyr	Pro	Met	Tyr	Tyr	Ala	
	225					230					235					240	
20	Leu	Asn	Asp	Val	Phe	Val	Ser	Lys	Ser	Lys	Gly	Phe	Ser	Arg	Ile	Ser	
					245					250					255		
25	Glu	Met	Leu	Gly	Ser	Asn	Arg	Asn	Ala	Phe	Glu	Asp	Thr	Ser	Val	Leu	
				260					265					270			
30	Thr	Thr	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Asn	Pro	Arg	Phe	Leu	Asn	Ser	Gln	
			275					280					285				
35	Ser	Asp	Lys	Ala	Leu	Phe	Lys	Asn	Ala	Leu	Thr	Tyr	Val	Leu	Leu	Gly	
		290					295					300					
40	Glu	Gly	Ile	Pro	Ile	Val	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Glu	Gln	Gly	Phe	Ser	Gly	
	305					310					315					320	
45	Gly	Ala	Asp	Pro	Ala	Asn	Arg	Glu	Val	Leu	Trp	Thr	Thr	Asn	Tyr	Asp	
					325					330					335		
50	Thr	Ser	Ser	Asp	Leu	Tyr	Gln	Phe	Ile	Lys	Thr	Val	Asn	Ser	Val	Arg	
				340					345					350			
55	Met	Lys	Ser	Asn	Lys	Ala	Val	Tyr	Met	Asp	Ile	Tyr	Val	Gly	Asp	Asn	
			355					360					365				
60	Ala	Tyr	Ala	Phe	Lys	His	Gly	Asp	Ala	Leu	Val	Val	Leu	Asn	Asn	Tyr	
		370					375					380					
65	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Gln	Val	Ser	Phe	Ser	Val	Ser	Gly	Lys	Phe	
	385					390					395					400	
70	Asp	Ser	Gly	Ala	Ser	Leu	Met	Asp	Ile	Val	Ser	Asn	Ile	Thr	Thr	Thr	
					405					410					415		
75	Val	Ser	Ser	Asp	Gly	Thr	Val	Thr	Phe	Asn	Leu	Lys	Asp	Gly	Leu	Pro	
				420					425					430			
80	Ala	Ile	Phe	Thr	Ser	Ala	Thr	Gly	Gly	Thr	Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Pro	
			435					440					445				

ES 2 800 477 T3

	Thr Gly Ser Gly Ser Val Thr Ser Thr Ser Lys Thr Thr Ala Thr Ala	450	455	460
5	Ser Lys Thr Ser Thr Ser Thr Ser Ser Thr Ser Cys Thr Thr Pro Thr	465	470	475
10	Ala Val Ala Val Thr Phe Asp Leu Thr Ala Thr Thr Thr Tyr Gly Glu		485	490
15	Asn Ile Tyr Leu Val Gly Ser Ile Ser Gln Leu Gly Asp Trp Glu Thr		500	505
20	Ser Asp Gly Ile Ala Leu Ser Ala Asp Lys Tyr Thr Ser Ser Asp Pro		515	520
25	Leu Trp Tyr Val Thr Val Thr Leu Pro Ala Gly Glu Ser Phe Glu Tyr		530	535
30	Lys Phe Ile Arg Ile Glu Ser Asp Asp Ser Val Glu Trp Glu Ser Asp		545	550
35	Pro Asn Arg Glu Tyr Thr Val Pro Gln Ala Cys Gly Thr Ser Thr Ala		565	570
40	Thr Val Thr Asp Thr Trp Arg		580	
	<210> 28			
	<211> 618			
	<212> PRT			
	<213> Talaromyces emersonii			
	<400> 28			
45	Met Ala Ser Leu Val Ala Gly Ala Leu Cys Ile Leu Gly Leu Thr Pro		5	10
50	Ala Ala Phe Ala Arg Ala Pro Val Ala Ala Arg Ala Thr Gly Ser Leu		20	25
55	Asp Ser Phe Leu Ala Thr Glu Thr Pro Ile Ala Leu Gln Gly Val Leu		35	40
60	Asn Asn Ile Gly Pro Asn Gly Ala Asp Val Ala Gly Ala Ser Ala Gly		50	55
65	Ile Val Val Ala Ser Pro Ser Arg Ser Asp Pro Asn Tyr Phe Tyr Ser		65	70
	Trp Thr Arg Asp Ala Ala Leu Thr Ala Lys Tyr Leu Val Asp Ala Phe		85	90

ES 2 800 477 T3

	Ile	Ala	Gly	Asn	Lys	Asp	Leu	Glu	Gln	Thr	Ile	Gln	Gln	Tyr	Ile	Ser	
				100					105					110			
5	Ala	Gln	Ala	Lys	Val	Gln	Thr	Ile	Ser	Asn	Pro	Ser	Gly	Asp	Leu	Ser	
			115					120					125				
10	Thr	Gly	Gly	Leu	Gly	Glu	Pro	Lys	Phe	Asn	Val	Asn	Glu	Thr	Ala	Phe	
		130					135					140					
15	Thr	Gly	Pro	Trp	Gly	Arg	Pro	Gln	Arg	Asp	Gly	Pro	Ala	Leu	Arg	Ala	
	145					150					155					160	
20	Thr	Ala	Leu	Ile	Ala	Tyr	Ala	Asn	Tyr	Leu	Ile	Asp	Asn	Gly	Glu	Ala	
					165					170					175		
25	Ser	Thr	Ala	Asp	Glu	Ile	Ile	Trp	Pro	Ile	Val	Gln	Asn	Asp	Leu	Ser	
				180					185					190			
30	Tyr	Ile	Thr	Gln	Tyr	Trp	Asn	Ser	Ser	Thr	Phe	Asp	Leu	Trp	Glu	Glu	
			195					200					205				
35	Val	Glu	Gly	Ser	Ser	Phe	Phe	Thr	Thr	Ala	Val	Gln	His	Arg	Ala	Leu	
		210					215					220					
40	Val	Glu	Gly	Asn	Ala	Leu	Ala	Thr	Arg	Leu	Asn	His	Thr	Cys	Ser	Asn	
	225					230					235					240	
45	Cys	Val	Ser	Gln	Ala	Pro	Gln	Val	Leu	Cys	Phe	Leu	Gln	Ser	Tyr	Trp	
					245					250					255		
50	Thr	Gly	Ser	Tyr	Val	Leu	Ala	Asn	Phe	Gly	Gly	Ser	Gly	Arg	Ser	Gly	
				260					265					270			
55	Lys	Asp	Val	Asn	Ser	Ile	Leu	Gly	Ser	Ile	His	Thr	Phe	Asp	Pro	Ala	
			275					280					285				
60	Gly	Gly	Cys	Asp	Asp	Ser	Thr	Phe	Gln	Pro	Cys	Ser	Ala	Arg	Ala	Leu	
		290					295					300					
65	Ala	Asn	His	Lys	Val	Val	Thr	Asp	Ser	Phe	Arg	Ser	Ile	Tyr	Ala	Ile	
	305					310					315					320	
70	Asn	Ser	Gly	Ile	Ala	Glu	Gly	Ser	Ala	Val	Ala	Val	Gly	Arg	Tyr	Pro	
					325					330					335		
75	Glu	Asp	Val	Tyr	Gln	Gly	Gly	Asn	Pro	Trp	Tyr	Leu	Ala	Thr	Ala	Ala	
				340					345					350			
80	Ala	Ala	Glu	Gln	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ile	Tyr	Gln	Trp	Lys	Lys	Ile	Gly	
			355					360					365				

ES 2 800 477 T3

5 Ser Ile Ser Ile Thr Asp Val Ser Leu Pro Phe Phe Gln Asp Ile Tyr
 370 375 380
 Pro Ser Ala Ala Val Gly Thr Tyr Asn Ser Gly Ser Thr Thr Phe Asn
 385 390 395 400
 10 Asp Ile Ile Ser Ala Val Gln Thr Tyr Gly Asp Gly Tyr Leu Ser Ile
 405 410 415
 15 Val Glu Lys Tyr Thr Pro Ser Asp Gly Ser Leu Thr Glu Gln Phe Ser
 420 425 430
 20 Arg Thr Asp Gly Thr Pro Leu Ser Ala Ser Ala Leu Thr Trp Ser Tyr
 435 440 445
 25 Ala Ser Leu Leu Thr Ala Ser Ala Arg Arg Gln Ser Val Val Pro Ala
 450 455 460
 Ser Trp Gly Glu Ser Ser Ala Ser Ser Val Pro Ala Val Cys Ser Ala
 465 470 475 480
 30 Thr Ser Ala Thr Gly Pro Tyr Ser Thr Ala Thr Asn Thr Val Trp Pro
 485 490 495
 35 Ser Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr Thr Thr Ser Ser Ala Pro Cys Thr
 500 505 510
 40 Thr Pro Thr Ser Val Ala Val Thr Phe Asp Glu Ile Val Ser Thr Ser
 515 520 525
 45 Tyr Gly Glu Thr Ile Tyr Leu Ala Gly Ser Ile Pro Glu Leu Gly Asn
 530 535 540
 Trp Ser Thr Ala Ser Ala Ile Pro Leu Arg Ala Asp Ala Tyr Thr Asn
 545 550 555 560
 50 Ser Asn Pro Leu Trp Tyr Val Thr Val Asn Leu Pro Pro Gly Thr Ser
 565 570 575
 55 Phe Glu Tyr Lys Phe Phe Lys Asn Gln Thr Asp Gly Thr Ile Val Trp
 580 585 590
 60 Glu Asp Asp Pro Asn Arg Ser Tyr Thr Val Pro Ala Tyr Cys Gly Gln
 595 600 605
 65 Thr Thr Ala Ile Leu Asp Asp Ser Trp Gln
 610 615
 <210> 29

ES 2 800 477 T3

<211> 863
 <212> PRT
 <213> Aspergillus fumigatus

5 <400> 29

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

10 Ala Asn Ala Gln Glu Leu Ala Phe Ser Pro Pro Phe Tyr Pro Ser Pro
 20 25 30

15 Trp Ala Asp Gly Gln Gly Glu Trp Ala Asp Ala His Arg Arg Ala Val
 35 40 45

20 Glu Ile Val Ser Gln Met Thr Leu Ala Glu Lys Val Asn Leu Thr Thr
 50 55 60

25 Gly Thr Gly Trp Glu Met Asp Arg Cys Val Gly Gln Thr Gly Ser Val
 65 70 75 80

Pro Arg Leu Gly Ile Asn Trp Gly Leu Cys Gly Gln Asp Ser Pro Leu
 85 90 95

30 Gly Ile Arg Phe Ser Asp Leu Asn Ser Ala Phe Pro Ala Gly Thr Asn
 100 105 110

35 Val Ala Ala Thr Trp Asp Lys Thr Leu Ala Tyr Leu Arg Gly Lys Ala
 115 120 125

40 Met Gly Glu Glu Phe Asn Asp Lys Gly Val Asp Ile Leu Leu Gly Pro
 130 135 140

45 Ala Ala Gly Pro Leu Gly Lys Tyr Pro Asp Gly Gly Arg Ile Trp Glu
 145 150 155 160

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

Gly Val Gly Ala Val Met Cys Ser Tyr Asn Gln Ile Asn Asn Ser Tyr

ES 2 800 477 T3

				245					250					255			
5	Gly	Cys	Gln	Asn	Ser	Gln	Thr	Leu	Asn	Lys	Leu	Leu	Lys	Ala	Glu	Leu	
				260					265					270			
10	Gly	Phe	Gln	Gly	Phe	Val	Met	Ser	Asp	Trp	Ser	Ala	His	His	Ser	Gly	
			275					280					285				
15	Val	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	Gly	Leu	Asp	Met	Ser	Met	Pro	Gly	Asp	Ile	
		290					295					300					
20	Ser	Phe	Asp	Asp	Gly	Leu	Ser	Phe	Trp	Gly	Thr	Asn	Leu	Thr	Val	Ser	
	305					310					315					320	
25	Val	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Pro	Ala	Trp	Arg	Val	Asp	Asp	Met	Ala	Val	
					325					330					335		
30	Arg	Ile	Met	Thr	Ala	Tyr	Tyr	Lys	Val	Gly	Arg	Asp	Arg	Leu	Arg	Ile	
				340					345					350			
35	Pro	Pro	Asn	Phe	Ser	Ser	Trp	Thr	Arg	Asp	Glu	Tyr	Gly	Trp	Glu	His	
			355					360					365				
40	Ser	Ala	Val	Ser	Glu	Gly	Ala	Trp	Thr	Lys	Val	Asn	Asp	Phe	Val	Asn	
		370					375					380					
45	Val	Gln	Arg	Ser	His	Ser	Gln	Ile	Ile	Arg	Glu	Ile	Gly	Ala	Ala	Ser	
						390					395					400	
50	Thr	Val	Leu	Leu	Lys	Asn	Thr	Gly	Ala	Leu	Pro	Leu	Thr	Gly	Lys	Glu	
					405					410					415		
55	Val	Lys	Val	Gly	Val	Leu	Gly	Glu	Asp	Ala	Gly	Ser	Asn	Pro	Trp	Gly	
				420					425					430			
60	Ala	Asn	Gly	Cys	Pro	Asp	Arg	Gly	Cys	Asp	Asn	Gly	Thr	Leu	Ala	Met	
			435					440					445				
65	Ala	Trp	Gly	Ser	Gly	Thr	Ala	Asn	Phe	Pro	Tyr	Leu	Val	Thr	Pro	Glu	
		450					455					460					
70	Gln	Ala	Ile	Gln	Arg	Glu	Val	Ile	Ser	Asn	Gly	Gly	Asn	Val	Phe	Ala	
						470					475					480	
75	Val	Thr	Asp	Asn	Gly	Ala	Leu	Ser	Gln	Met	Ala	Asp	Val	Ala	Ser	Gln	
					485					490					495		
80	Ser	Ser	Val	Ser	Leu	Val	Phe	Val	Asn	Ala	Asp	Ser	Gly	Glu	Gly	Phe	
				500					505					510			

ES 2 800 477 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	Arg	Asn	Glu	Thr	Pro	Ile	Tyr	Glu	Phe	Gly	His	Gly	Leu	Ser	Tyr	Thr
					645					650					655	
45	Thr	Phe	Gly	Tyr	Ser	His	Leu	Arg	Val	Gln	Ala	Leu	Asn	Ser	Ser	Ser
				660					665					670		
50	Ser	Ala	Tyr	Val	Pro	Thr	Ser	Gly	Glu	Thr	Lys	Pro	Ala	Pro	Thr	Tyr
			675					680					685			
55	Gly	Glu	Ile	Gly	Ser	Ala	Ala	Asp	Tyr	Leu	Tyr	Pro	Glu	Gly	Leu	Lys
		690					695					700				
60	Arg	Ile	Thr	Lys	Phe	Ile	Tyr	Pro	Trp	Leu	Asn	Ser	Thr	Asp	Leu	Glu
	705					710					715					720
65	Asp	Ser	Ser	Asp	Asp	Pro	Asn	Tyr	Gly	Trp	Glu	Asp	Ser	Glu	Tyr	Ile
					725					730					735	
70	Pro	Glu	Gly	Ala	Arg	Asp	Gly	Ser	Pro	Gln	Pro	Leu	Leu	Lys	Ala	Gly
				740					745					750		
75	Gly	Ala	Pro	Gly	Gly	Asn	Pro	Thr	Leu	Tyr	Gln	Asp	Leu	Val	Arg	Val
			755					760					765			
80	Ser	Ala	Thr	Ile	Thr	Asn	Thr	Gly	Asn	Val	Ala	Gly	Tyr	Glu	Val	Pro
		770					775					780				

ES 2 800 477 T3

Gln Leu Tyr Val Ser Leu Gly Gly Pro Asn Glu Pro Arg Val Val Leu
 785 790 795 800
 5
 Arg Lys Phe Asp Arg Ile Phe Leu Ala Pro Gly Glu Gln Lys Val Trp
 805 810 815
 10
 Thr Thr Thr Leu Asn Arg Arg Asp Leu Ala Asn Trp Asp Val Glu Ala
 820 825 830
 15
 Gln Asp Trp Val Ile Thr Lys Tyr Pro Lys Lys Val His Val Gly Ser
 835 840 845
 20
 Ser Ser Arg Lys Leu Pro Leu Arg Ala Pro Leu Pro Arg Val Tyr
 850 855 860
 25
 <210> 30
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Thermoascus aurantiacus
 <400> 30
 30
 Met Ser Phe Ser Lys Ile Ile Ala Thr Ala Gly Val Leu Ala Ser Ala
 1 5 10 15
 35
 Ser Leu Val Ala Gly His Gly Phe Val Gln Asn Ile Val Ile Asp Gly
 20 25 30
 40
 Lys Lys Tyr Tyr Gly Gly Tyr Leu Val Asn Gln Tyr Pro Tyr Met Ser
 35 40 45
 45
 Asn Pro Pro Glu Val Ile Ala Trp Ser Thr Thr Ala Thr Asp Leu Gly
 50 55 60
 50
 Phe Val Asp Gly Thr Gly Tyr Gln Thr Pro Asp Ile Ile Cys His Arg
 65 70 75 80
 55
 Gly Ala Lys Pro Gly Ala Leu Thr Ala Pro Val Ser Pro Gly Gly Thr
 85 90 95
 60
 Val Glu Leu Gln Trp Thr Pro Trp Pro Asp Ser His His Gly Pro Val
 100 105 110
 65
 Ile Asn Tyr Leu Ala Pro Cys Asn Gly Asp Cys Ser Thr Val Asp Lys
 115 120 125
 70
 Thr Gln Leu Glu Phe Phe Lys Ile Ala Glu Ser Gly Leu Ile Asn Asp
 130 135 140
 75
 Asp Asn Pro Pro Gly Ile Trp Ala Ser Asp Asn Leu Ile Ala Ala Asn
 145 150 155 160

ES 2 800 477 T3

Asn Ser Trp Thr Val Thr Ile Pro Thr Thr Ile Ala Pro Gly Asn Tyr
 165 170 175
 5
 Val Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Gln Asn Gln Asp
 180 185 190
 10
 Gly Ala Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Ile Asn Leu Gln Val Thr Gly Gly
 195 200 205
 15
 Gly Ser Asp Asn Pro Ala Gly Thr Leu Gly Thr Ala Leu Tyr His Asp
 210 215 220
 20
 Thr Asp Pro Gly Ile Leu Ile Asn Ile Tyr Gln Lys Leu Ser Ser Tyr
 225 230 235 240
 25
 Ile Ile Pro Gly Pro Pro Leu Tyr Thr Gly
 245 250
 30
 <210> 31
 <211> 253
 <212> PRT
 <213> Penicillium emersonii
 <400> 31
 35
 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
 55
 Asp Leu Gly Phe Val Asp Gly Thr Gly Tyr Gln Gly Pro Asp Ile Ile
 65 70 75 80
 60
 Cys His Arg Asn Ala Thr Pro Ala Pro Leu Thr Ala Pro Val Ala Ala
 85 90 95
 65
 Gly Gly Thr Val Glu Leu Gln Trp Thr Pro Trp Pro Asp Ser His His
 100 105 110
 70
 Gly Pro Val Ile Thr Tyr Leu Ala Pro Cys Asn Gly Asn Cys Ser Thr
 115 120 125
 75
 Val Asp Lys Thr Thr Leu Glu Phe Phe Lys Ile Asp Gln Gln Gly Leu
 130 135 140

ES 2 800 477 T3

Ile Asp Asp Thr Ser Pro Pro Gly Thr Trp Ala Ser Asp Asn Leu Ile
 145 150 155 160
 5
 Ala Asn Asn Asn Ser Trp Thr Val Thr Ile Pro Asn Ser Val Ala Pro
 165 170 175
 10
 Gly Asn Tyr Val Leu Arg His Glu Ile Ile Ala Leu His Ser Ala Asn
 180 185 190
 15
 Asn Lys Asp Gly Ala Gln Asn Tyr Pro Gln Cys Ile Asn Ile Glu Val
 195 200 205
 20
 Thr Gly Gly Gly Ser Asp Ala Pro Glu Gly Thr Leu Gly Glu Asp Leu
 210 215 220
 25
 Tyr His Asp Thr Asp Pro Gly Ile Leu Val Asp Ile Tyr Glu Pro Ile
 225 230 235 240
 30
 Ala Thr Tyr Thr Ile Pro Gly Pro Pro Glu Pro Thr Phe
 245 250
 35
 <210> 32
 <211> 532
 <212> PRT
 <213> Aspergillus fumigatus
 40
 <400> 32
 Met Leu Ala Ser Thr Phe Ser Tyr Arg Met Tyr Lys Thr Ala Leu Ile
 1 5 10 15
 45
 Leu Ala Ala Leu Leu Gly Ser Gly Gln Ala Gln Gln Val Gly Thr Ser
 20 25 30
 50
 Gln Ala Glu Val His Pro Ser Met Thr Trp Gln Ser Cys Thr Ala Gly
 35 40 45
 55
 Gly Ser Cys Thr Thr Asn Asn Gly Lys Val Val Ile Asp Ala Asn Trp
 50 55 60
 60
 Arg Trp Val His Lys Val Gly Asp Tyr Thr Asn Cys Tyr Thr Gly Asn
 65 70 75 80
 65
 Thr Trp Asp Thr Thr Ile Cys Pro Asp Asp Ala Thr Cys Ala Ser Asn
 85 90 95
 70
 Cys Ala Leu Glu Gly Ala Asn Tyr Glu Ser Thr Tyr Gly Val Thr Ala
 100 105 110
 75
 Ser Gly Asn Ser Leu Arg Leu Asn Phe Val Thr Thr Ser Gln Gln Lys
 115 120 125

ES 2 800 477 T3

	Asn	Ile	Gly	Ser	Arg	Leu	Tyr	Met	Met	Lys	Asp	Asp	Ser	Thr	Tyr	Glu	
	130						135				140						
5	Met	Phe	Lys	Leu	Leu	Asn	Gln	Glu	Phe	Thr	Phe	Asp	Val	Asp	Val	Ser	
	145					150					155					160	
10	Asn	Leu	Pro	Cys	Gly	Leu	Asn	Gly	Ala	Leu	Tyr	Phe	Val	Ala	Met	Asp	
					165					170					175		
15	Ala	Asp	Gly	Gly	Met	Ser	Lys	Tyr	Pro	Thr	Asn	Lys	Ala	Gly	Ala	Lys	
				180					185					190			
20	Tyr	Gly	Thr	Gly	Tyr	Cys	Asp	Ser	Gln	Cys	Pro	Arg	Asp	Leu	Lys	Phe	
			195					200					205				
25	Ile	Asn	Gly	Gln	Ala	Asn	Val	Glu	Gly	Trp	Gln	Pro	Ser	Ser	Asn	Asp	
	210						215					220					
30	Ala	Asn	Ala	Gly	Thr	Gly	Asn	His	Gly	Ser	Cys	Cys	Ala	Glu	Met	Asp	
	225					230					235					240	
35	Ile	Trp	Glu	Ala	Asn	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Phe	Thr	Pro	His	Pro	Cys	
					245					250					255		
40	Asp	Thr	Pro	Gly	Gln	Val	Met	Cys	Thr	Gly	Asp	Ala	Cys	Gly	Gly	Thr	
				260					265					270			
45	Tyr	Ser	Ser	Asp	Arg	Tyr	Gly	Gly	Thr	Cys	Asp	Pro	Asp	Gly	Cys	Asp	
			275					280					285				
50	Phe	Asn	Ser	Phe	Arg	Gln	Gly	Asn	Lys	Thr	Phe	Tyr	Gly	Pro	Gly	Met	
	290						295					300					
55	Thr	Val	Asp	Thr	Lys	Ser	Lys	Phe	Thr	Val	Val	Thr	Gln	Phe	Ile	Thr	
	305					310					315					320	
60	Asp	Asp	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Lys	Glu	Ile	Lys	Arg	Phe	Tyr	
					325					330					335		
65	Val	Gln	Asn	Gly	Lys	Val	Ile	Pro	Asn	Ser	Glu	Ser	Thr	Trp	Thr	Gly	
				340					345					350			
70	Val	Ser	Gly	Asn	Ser	Ile	Thr	Thr	Glu	Tyr	Cys	Thr	Ala	Gln	Lys	Ser	
			355					360					365				
75	Leu	Phe	Gln	Asp	Gln	Asn	Val	Phe	Glu	Lys	His	Gly	Gly	Leu	Glu	Gly	
		370					375					380					
80	Met	Gly	Ala	Ala	Leu	Ala	Gln	Gly	Met	Val	Leu	Val	Met	Ser	Leu	Trp	
	385					390					395					400	

ES 2 800 477 T3

5 Asp Asp His Ser Ala Asn Met Leu Trp Leu Asp Ser Asn Tyr Pro Thr
 405 410 415
 Thr Ala Ser Ser Thr Thr Pro Gly Val Ala Arg Gly Thr Cys Asp Ile
 420 425 430
 10 Ser Ser Gly Val Pro Ala Asp Val Glu Ala Asn His Pro Asp Ala Tyr
 435 440 445
 15 Val Val Tyr Ser Asn Ile Lys Val Gly Pro Ile Gly Ser Thr Phe Asn
 450 455 460
 20 Ser Gly Gly Ser Asn Pro Gly Gly Gly Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr
 465 470 475 480
 25 Gln Pro Thr Thr Thr Thr Thr Thr Thr Ala Gly Asn Pro Gly Gly Thr Gly
 485 490 495
 Val Ala Gln His Tyr Gly Gln Cys Gly Gly Ile Gly Trp Thr Gly Pro
 500 505 510
 30 Thr Thr Cys Ala Ser Pro Tyr Thr Cys Gln Lys Leu Asn Asp Tyr Tyr
 515 520 525
 35 Ser Gln Cys Leu
 530
 40 <210> 33
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Aspergillus fumigatus
 45 <400> 33
 Met Lys His Leu Ala Ser Ser Ile Ala Leu Thr Leu Leu Leu Pro Ala
 1 5 10 15
 50 Val Gln Ala Gln Gln Thr Val Trp Gly Gln Cys Gly Gly Gln Gly Trp
 20 25 30
 55 Ser Gly Pro Thr Ser Cys Val Ala Gly Ala Ala Cys Ser Thr Leu Asn
 35 40 45
 60 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
 65 Pro Thr Thr Thr Gly Pro Thr Thr Ser Ala Pro Thr Val Thr Ala Ser
 85 90 95

ES 2 800 477 T3

5 Gly Asn Pro Phe Ser Gly Tyr Gln Leu Tyr Ala Asn Pro Tyr Tyr Ser
 100 105 110
 Ser Glu Val His Thr Leu Ala Met Pro Ser Leu Pro Ser Ser Leu Gln
 115 120 125
 10 Pro Lys Ala Ser Ala Val Ala Glu Val Pro Ser Phe Val Trp Leu Asp
 130 135 140
 15 Val Ala Ala Lys Val Pro Thr Met Gly Thr Tyr Leu Ala Asp Ile Gln
 145 150 155 160
 20 Ala Lys Asn Lys Ala Gly Ala Asn Pro Pro Ile Ala Gly Ile Phe Val
 165 170 175
 25 Val Tyr Asp Leu Pro Asp Arg Asp Cys Ala Ala Leu Ala Ser Asn Gly
 180 185 190
 Glu Tyr Ser Ile Ala Asn Asn Gly Val Ala Asn Tyr Lys Ala Tyr Ile
 195 200 205
 30 Asp Ala Ile Arg Ala Gln Leu Val Lys Tyr Ser Asp Val His Thr Ile
 210 215 220
 35 Leu Val Ile Glu Pro Asp Ser Leu Ala Asn Leu Val Thr Asn Leu Asn
 225 230 235 240
 40 Val Ala Lys Cys Ala Asn Ala Gln Ser Ala Tyr Leu Glu Cys Val Asp
 245 250 255
 45 Tyr Ala Leu Lys Gln Leu Asn Leu Pro Asn Val Ala Met Tyr Leu Asp
 260 265 270
 Ala Gly His Ala Gly Trp Leu Gly Trp Pro Ala Asn Leu Gly Pro Ala
 275 280 285
 50 Ala Thr Leu Phe Ala Lys Val Tyr Thr Asp Ala Gly Ser Pro Ala Ala
 290 295 300
 55 Val Arg Gly Leu Ala Thr Asn Val Ala Asn Tyr Asn Ala Trp Ser Leu
 305 310 315 320
 60 Ser Thr Cys Pro Ser Tyr Thr Gln Gly Asp Pro Asn Cys Asp Glu Lys
 325 330 335
 65 Lys Tyr Ile Asn Ala Met Ala Pro Leu Leu Lys Glu Ala Gly Phe Asp
 340 345 350
 Ala His Phe Ile Met Asp Thr Ser Arg Asn Gly Val Gln Pro Thr Lys

ES 2 800 477 T3

		355					360					365					
5	Gln	Asn	Ala	Trp	Gly	Asp	Trp	Cys	Asn	Val	Ile	Gly	Thr	Gly	Phe	Gly	
		370					375					380					
10	Val	Arg	Pro	Ser	Thr	Asn	Thr	Gly	Asp	Pro	Leu	Gln	Asp	Ala	Phe	Val	
	385					390					395					400	
15	Trp	Ile	Lys	Pro	Gly	Gly	Glu	Ser	Asp	Gly	Thr	Ser	Asn	Ser	Thr	Ser	
					405					410					415		
20	Pro	Arg	Tyr	Asp	Ala	His	Cys	Gly	Tyr	Ser	Asp	Ala	Leu	Gln	Pro	Ala	
				420					425					430			
25	Pro	Glu	Ala	Gly	Thr	Trp	Phe	Gln	Ala	Tyr	Phe	Glu	Gln	Leu	Leu	Thr	
		435						440					445				
	Asn	Ala	Asn	Pro	Ser	Phe											
	450																

REIVINDICACIONES

1. Proceso para generar productos de fermentación a partir de un material que contiene almidón que comprende los pasos de:
 - i) licuefacción del material que contiene almidón durante 0.5-5 horas a una temperatura de 75-95 °C a un pH de 4-6 usando:
 - una alfa-amilasa;
 - una endoglucanasa que tiene la secuencia mostrada como SEC ID N.º: 3 o una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 3 y además tiene un punto de fusión (DSC) por encima de 80 °C;
 - ii) sacarificación del material licuado que contiene almidón de la etapa i) usando una glucoamilasa;
 - iii) fermentación usando una cepa de *Saccharomyces*, en donde los pasos ii) y iii) se llevan a cabo como sacarificación y fermentación simultáneas a una temperatura de 25 °C a 40 °C.
2. Proceso según la reivindicación 1, en donde la alfa-amilasa es del género *Bacillus*.
3. Proceso según las reivindicaciones 1 o 2, en donde la alfa-amilasa tiene una T_{1/2} (min) a pH 4.5, 85 °C, CaCl₂ 0.12 mM) de al menos 10.
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que además está presente una proteasa y/o se añade en licuefacción, en donde la proteasa tiene un valor de termoestabilidad de más del 25 % determinado como actividad relativa a 80 °C/70 °C.
5. Proceso según la reivindicación 4, en donde la proteasa es una variante de proteasa que tiene al menos un 75 % de identidad, pero menos del 100 % de identidad con la parte madura del polipéptido de la SEC ID N.º: 2.
6. Proceso según la reivindicación 4, en donde la proteasa tiene al menos un 80 % de identidad con la SEC ID N.º: 13.
7. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde, además, una enzima generadora de fuentes de carbohidratos está presente y/o se añade durante la etapa de licuefacción i).
8. Proceso según la reivindicación 7, en donde la enzima generadora de fuentes de carbohidratos presente y/o añadida durante la etapa de licuefacción i) es una glucoamilasa que tiene una estabilidad térmica a 85 °C, pH 5.3, de al menos un 20 %.
9. Proceso según la reivindicación 7 u 8, en donde la enzima generadora de fuentes de carbohidratos presente y/o añadida durante la etapa de licuefacción i) es una glucoamilasa que tiene al menos un 80 % de identidad con el polipéptido maduro mostrado en las SEC ID N.º: 9 o 14.