



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 356 703**

(51) Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 9/28 (2006.01)

A21D 8/04 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05822874 .3**

(96) Fecha de presentación : **22.12.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1926753**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.2008**

(54)

Título: Enzimas híbridas que consisten en una primera secuencia de aminoácidos de endoamilasa y un módulo de unión de carbohidratos como segunda secuencia de aminoácidos.

(30)

Prioridad: **22.12.2004 DK 2004 01976**
09.09.2005 DK 2005 01261

(73)

Titular/es: **NOVOZYMES A/S**
Krogshøjvej 36
2880 Bagsværd, DK

(45)

Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.04.2011

(72)

Inventor/es: **Svendsen, Allan;**
Andersen, Carsten;
Spendler, Tina;
Viksoe-Nielsen, Anders y
Østdal, Henrik

(45)

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.04.2011

(74)

Agente: **Tomás Gil, Tesifonte Enrique**

ES 2 356 703 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

Enzimas híbridas que consisten en una primera secuencia de aminoácidos de endoamilasa y un módulo de unión de carbohidratos como segunda secuencia de aminoácidos.

Campo de la invención

La presente invención se refiere, entre otras cosas, a enzimas híbridas comprendiendo un módulo de unión a carbohidratos y teniendo actividad endo-amilasa. Las enzimas se pueden utilizar en procesos comprendiendo la modificación y/o degradación de almidón, o en procesos de producción de puré.

Antecedentes de la invención

Se usan endo-amilasas bacterianas en un gran número de procesos, por ejemplo, para la licuefacción de almidón en procesos donde se modifica, y/o degrada almidón a polímeros más pequeños o monómeros de glucosa. Los productos de degradación pueden usarse en la industria, por ejemplo, como maltosa y/o jarabes de fructosa o además procesarse en un paso de fermentación a un producto de fermentación, por ejemplo, etanol. Las endo-amilasas bacterianas se usan en la cocción para dar blandura adicional y una mejor humedad de la miga de pan. No obstante, es fácil sobredosificar las endo-amilasas, lo cual puede resultar en una gomosidad y una pérdida indeseable de elasticidad en el producto horneado. Existe una necesidad de endo-amilasas con propiedades para el uso mejoradas en varios procesos, por ejemplo, dentro del tratamiento y de la cocción de almidón.

Resumen de la invención

Los presentes inventores han descubierto ahora sorprendentemente que añadiendo un módulo de unión a carbohidratos (CBM) a una endo-amilasa se puede modificar la actividad catalítica de la endo-amilasa dando así como resultado un rendimiento de cocción aumentado en comparación con la enzima de tipo salvaje. No hay ningún cambio significativo en el sabor o el olor del producto horneado. Sin atarse a la teoría se sugiere que el efecto se debe a una actividad aumentada hacia el almidón crudo en la masa conferida por el CBM, y/o una actividad reducida hacia el almidón calentado en el pan de cocción conferida por el CBM. La endo-amilasa con un CBM se puede usar como una enzima de cocción con menos riesgo de sobredosificación en comparación con la enzima sin un CBM. Tales híbridos que consisten en un polipéptido teniendo actividad endo-amilasa y un módulo de unión a carbohidratos, principalmente teniendo afinidad con el almidón como por ejemplo con el CBM20, tiene la ventaja sobre las endo-amilasas existentes que seleccionando un dominio catalítico con propiedades deseadas como por ejemplo el perfil de pH, el perfil de temperatura, la resistencia a la oxidación, la estabilidad del calcio, la afinidad del sustrato o el perfil del producto se puede combinar con un módulo de unión a carbohidratos con afinidades de enlace más débiles o más fuertes, por ejemplo, afinidades específicas con la amilosa, afinidades específicas con la amilopectina o afinidades con la estructura específica en el carbohidrato. El híbrido se puede utilizar como un aditivo de cocción, por ejemplo, como una enzima anti-endurecimiento.

Los presentes inventores también han descubierto sorprendentemente que añadiendo un módulo de unión a carbohidratos (CBM) a una endo-amilasa la actividad y la especificidad se pueden alterar aumentando así la eficacia de diferentes procesos de degradación de almidón, por ejemplo, comprendiendo la degradación de la sustancia cruda, por ejemplo, almidón no gelatinizado al igual que almidón gelatinizado. Debido a la actividad de hidrólisis superior de estas endo-amilasas teniendo un CBM el proceso de conversión de almidón global se puede realizar sin tener que gelatinizar el almidón, es decir las endo-amilasas teniendo un CBM hidrolizan almidón granulado en un proceso de almidón crudo al igual que almidón completamente o parcialmente gelatinizado en un proceso de almidón tradicional.

Por consiguiente la invención proporciona en un primer aspecto un polipéptido que es un híbrido comprendiendo; una primera secuencia de aminoácidos teniendo actividad endo-amilasa y teniendo al menos un 60% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 35 y una segunda secuencia de aminoácidos comprendiendo un módulo de unión a carbohidratos y teniendo al menos un 60% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada como los residuos de aminoácidos 485 a 586 en la SEC ID NO: 2, donde dicha primera secuencia de aminoácidos y/o dicho segundo amino se deriva de una bacteria.

La invención proporciona además un proceso preparando una masa o un producto comestible hecho de una masa, comprendiendo el proceso añadir el polipéptido del primer aspecto a la masa.

La invención proporciona además un proceso comprendiendo; (a) poner en contacto un almidón con un polipéptido según el primer aspecto, (b) incubar dicho almidón con dicho polipéptido durante un tiempo y a una temperatura suficiente para conseguir la conversión de al menos el 90% p/p de dicho sustrato de almidón en azúcares fermentables, (c) fermentar para producir un producto de fermentación, (d) opcionalmente recuperar el producto de fermentación.

La invención proporciona además un aditivo para mejorar el pan o la masa en forma de un granulado o polvo aglomerado comprendiendo el polipéptido del primer aspecto.

La invención proporciona además una secuencia de ADN codificando el polipéptido del primer aspecto.

La invención proporciona además un constructo de ADN comprendiendo la secuencia de ADN al igual que una célula huésped comprendiendo el constructo de ADN.

5 Descripción detallada de la invención

Enzimas híbridas

El polipéptido de la invención es una enzima híbrida comprendiendo una primera secuencia de aminoácidos teniendo actividad endo-amilasa, y una segunda secuencia de aminoácidos comprendiendo un módulo de unión a carbohidratos (CBM). El híbrido se puede producir por fusión de unas primeras secuencias de ADN codificando unas primeras secuencias de aminoácidos y unas segundas secuencias de ADN codificando unas segundas secuencias de aminoácidos, o el híbrido se puede producir como un gen completamente sintético basado en el conocimiento de las secuencias de aminoácidos de CBMs adecuados, enlazadores y dominios catalíticos.

El término “enzima híbrida” (también referido como, “proteína de fusión”, “híbrido”, “polipéptido híbrido” o “proteína híbrida”) se usa aquí para caracterizar los polipéptidos de la invención comprendiendo una primera secuencia de aminoácidos comprendiendo al menos un módulo catalítico teniendo actividad endo-amilasa y una segunda secuencia de aminoácidos comprendiendo al menos un módulo de unión a carbohidratos donde la primera y la segunda están derivadas de distintas fuentes. El término “fuente” siendo entendido como por ejemplo, pero no limitado a, una enzima parental, o una variante de la misma, por ejemplo, una amilasa o glucoamilasa, u otra actividad catalítica comprendiendo un módulo catalítico adecuado y/o un CBM adecuado y/o un enlazador adecuado. No obstante el CBM también puede estar derivado de un polipéptido no teniendo ninguna actividad catalítica. La primera y la segunda secuencia de aminoácidos se pueden derivar de la misma cepa bacteriana, de cepas en las mismas especies, de especies estrechamente relacionadas u organismos menos relacionados. Preferiblemente la primera y la segunda secuencia de aminoácidos de los híbridos derivados de distintas fuentes, por ejemplo, de distintas enzimas de la misma cepa y/o especies, o por ejemplo, de cepas dentro de especies diferentes.

Los números de clasificación enzimáticos (números EC) referidos en la presente especificación están conforme a las Recomendaciones del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (<http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/enzyme/>).

Enzimas híbridas como las denominadas en este caso incluyen especies comprendiendo una secuencia de aminoácidos de una endo-amilasa, es decir una alfa-amilasa (EC 3.2.1.1) la cual se enlaza (es decir, mediante unión covalente) a una secuencia de aminoácidos comprendiendo un módulo de unión a carbohidratos (CBM). La enzima híbrida es así una enzima capaz de catalizar hidrólisis de almidón en una endo-forma.

Enzimas híbridas conteniendo CBM, al igual que descripciones detalladas de la preparación y purificación de las mismas, se conocen en la técnica [véase, por ejemplo, WO 90/00609, WO 94/24158 y WO 95/16782, al igual que Greenwood *et al.* Biotechnology and Bioengineering 44 (1994) págs. 1295-1305]. Estas pueden, por ejemplo, prepararse transformando en una célula huésped un constructo de ADN comprendiendo al menos un fragmento de ADN codificando el módulo de unión a carbohidratos ligado, con o sin un enlazador, a una secuencia de ADN codificando la enzima de interés, y cultivando la célula huésped transformada para expresar el gen fundido. El enlazador puede ser una unión (es decir, comprendiendo 0 residuos), o un grupo corto de enlaces comprendiendo de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 átomos de carbono, en particular de de 2 a 40 átomos de carbono. No obstante, el enlazador es preferiblemente una secuencia de 0 residuos de aminoácidos (p. ej., justo un enlace) o es de aproximadamente 2 a aproximadamente 100 residuos de aminoácidos, más preferiblemente de entre 2 y 40 residuos de aminoácidos, tal como de 2 a 15 residuos de aminoácidos. Preferiblemente el enlazador no es sensible a o al menos tiene una sensibilidad baja a la hidrólisis por una proteasa, la cual por ejemplo, puede estar presente durante la producción del híbrido y/o durante la aplicación industrial del híbrido. El CBM en una enzima híbrida del tipo en cuestión puede estar situado C-terminalmente, N-terminalmente o internamente en la enzima híbrida. En una forma de realización un polipéptido puede comprender más de un CBM, por ejemplo, dos CBMs; uno situado C-terminalmente, el otro N-terminalmente o los dos CBMs situados en serie C-terminalmente, N-terminalmente o internamente. No obstante, los polipéptidos con más de dos CBMs son igualmente contemplados.

Identidad del polipéptido

El término “identidad” del polipéptido se entiende como el grado de identidad entre dos secuencias indicando una derivación de la primera secuencia de la segunda. La identidad se puede determinar adecuadamente mediante programas informáticos conocidos en la técnica tales como GAP proporcionado en el paquete de programas GCG (Manual del Programa para el paquete informático Wisconsin, versión 8, agosto de 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EEUU 53711) (Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-453. Se usan los siguientes ajustes para la comparación de secuencias de aminoácidos: penalización de creación de gaps de 3.0 y penalización de extensión de gaps de 0.1. La parte pertinente de la secuencia de aminoácidos para la determinación de identidad es el polipéptido maduro, es decir sin el péptido señal.

Módulos de enlace de carbohidratos

Un módulo de unión a carbohidratos (CBM), o como frecuentemente es referido, un dominio de unión a carbohidratos (CBD), es una secuencia de aminoácidos de polipéptidos que se une preferentemente a un poli- u oligosacárido (carbohidrato), frecuentemente, pero no necesariamente de forma exclusiva, a una forma insoluble en agua (incluyendo cristalina) de la misma.

CBMs derivados de enzimas de degradación de almidón son frecuentemente referidos como módulos de unión a almidón o SBMs (CBMs que pueden ocurrir en determinadas enzimas amilolíticas, tales como determinadas glucoamilasas, o en enzimas tales como glucanotransferasas de ciclodextrina, o en endo-amilasas). Los SBMs son frecuentemente referidos como SBDs (Starch Binding Domains: Dominios de unión a almidón). Se prefieren para la invención CBMs los cuales son Módulos de unión a almidón.

Los CBMs se encuentran como partes integrales de polipéptidos grandes o proteínas que consisten en dos o más regiones de secuencia de aminoácidos de polipéptido, especialmente en enzimas hidrolíticas (hidrolasas) las cuales típicamente comprenden un módulo catalítico conteniendo el sitio activo para la hidrólisis del sustrato y un módulo de unión a carbohidratos (CBM) para la unión con el sustrato de carbohidrato en cuestión. Tales enzimas pueden comprender más de un módulo catalítico y uno, dos o tres CBMs, y opcionalmente además comprender una o más regiones de secuencia de aminoácidos de polipéptido conectando el CBM(s) con el módulo(s) catalítico, una región del tipo último normalmente denominada como "enlazador". También se han sido encontrado CBMs en algas, por ejemplo, en el alga roja *Porphyra purpurea* de alga en forma de una proteína de unión de polisacáridos no hidrolítica.

En proteínas/polipéptidos en las cuales ocurren CBMs (p. ej., enzimas, normalmente enzimas hidrolíticas), un CBM se puede localizar en el terminal N ó C o en una posición interna.

La parte de un polipéptido o proteína (p. ej., enzima hidrolítica) que constituye un CBM per se típicamente consiste en más de aproximadamente 30 y menos de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos. El "Módulo de unión a carbohidratos de la Familia 20" o un módulo CBM-20 se define en el contexto de esta invención como una secuencia de aproximadamente 100 aminoácidos teniendo al menos un 45% de identidad con el Módulo de unión a carbohidratos (CBM) del polipéptido descrito en la Figura 1 por Joergensen *et al* (1997) en Biotechnol. Lett. 19: 1027-1031. El CBM comprende los últimos 102 aminoácidos del polipéptido, es decir la subsecuencia desde el aminoácido 582 al aminoácido 683. La numeración de las Familias de hidrolasa glucósida usadas en esta descripción sigue el concepto de Coutinho, P.M. & Henrissat, B. (1999) CAZY - servidor de enzimas carbohidratas activas en la URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html> o alternativamente Coutinho, P.M. & Henrissat, B. 1999 la estructura modular de celulasas y otras enzimas activas de carbohidrato: un enfoque de base de datos integrada. En "Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation", K. Ohmiya, K. Hayashi, K. Sakka, Y. Kobayashi, S. Karita and T. Kimura eds., Uni Publishers Co., Tokyo, pp. 15-23, y Bourne, Y. & Henrissat, B. 2001 Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules, Current Opinion in Structural Biology 11: 593-600.

Ejemplos de enzimas que comprenden un CBM adecuado para el uso en el contexto de la invención son endo-amilasas (es decir, alfa-amilasas en EC 3.2.1.1), alfa-amilasas maltogénicas (EC 3.2.1.133), glucoamilasas (EC 3.2.1.3) o CGTasas (EC 2.4.1.19).

Se prefieren para la invención los CBMs de la Familia 20 del Módulo de unión a carbohidratos. Los CBMs de la familia CBM 20 adecuados para la invención se pueden derivar a partir de beta-amilasas de *Bacillus cereus* (SWISS-PROT P36924), o de CGTasas de *Bacillus circulans* (SWISSPROT P43379). Otros CBMs adecuados de la familia CBM 20 se pueden encontrar en la URL: <http://afmb.cnrs-mrs.fr/~cazy/CAZY/index.html>.

Una vez se ha identificado una secuencia de nucleótidos codificando la región de unión a sustratos (unión a carbohidratos), o bien como ADNc o como ADN cromosómico, se puede manipular entonces en una variedad de maneras para fundir ésta a una secuencia de ADN codificando la enzima de interés. El fragmento de ADN codificando la secuencia de aminoácidos de unión a carbohidratos y el ADN codificando la enzima de interés se ligan después con o sin un enlazador. El ADN ligado resultante se puede manipular en una variedad de formas para conseguir la expresión.

Son adecuados para el uso en el contexto de la invención CBMs de origen de *Bacillus*, tales como un CBM20 de *Bacillus flavothermus* (Syn. *Anoxybacillus contaminans*), preferiblemente de la amilasa AMY1048 (SEC ID NO: 2 aquí), AMY1039, o AMY1079 (descrito como respectivamente las SEC ID NO1, 2 y 3 en la PCT/US2004/023031), las amilasas de *Bacillus* descritas en WO 2002068589 de Diversa, *Bacillus* sp. TS23 (Corea) (Lin, L.-L.; Sometido (01-MAR-1995) a las bases de datos EMBL/GenBank/DBJ. Liu Lin, Food Industry Research Institute, Culture Collection and Research Center, 331 Food Road, Hsinchu, Taiwan 300, República de China).

En una forma de realización particular la secuencia del CBM tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como los residuos de aminoácidos 485 a 586 en la SEC ID NO: 2 o la secuencia del CBM tiene una secuencia de aminoácidos teniendo al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% o incluso al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente.

ES 2 356 703 T3

En otra forma de realización preferida la secuencia del CBM tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos mostrada como los residuos de aminoácidos 485 a 586 en la SEC ID NO: 2 en no más de 10 posiciones, no más de 9 posiciones, no más de 8 posiciones, no más de 7 posiciones, no más de 6 posiciones, no más de 5 posiciones, no más de 4 posiciones, no más de 3 posiciones, no más de 2 posiciones, o incluso no más de 1 posición.

Secuencia de endo-amilasas

Las endo-amilasas que son apropiadas como la base para híbridos de CBM/amilasa de los tipos empleados en el contexto de la presente invención incluyen los de origen bacteriano y teniendo actividad endo-amilasa. La endo-actividad de la amilasa se puede determinar según el ensayo en la sección "Materiales y métodos" de la presente solicitud. Se prefieren las endo-amilasas derivadas de *Bacillus* sp., particularmente de *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. stearothermophilus* o *B. flavotermus*. La endo-amilasa es preferiblemente una endo-amilasa teniendo al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% o incluso al menos un 90% de identidad con la amilasa de *Bacillus licheniformis* (BLA, SEC ID NO: 8 en WO2002/010355) mostrada en la SEC ID NO: 35 aquí. Esto incluye pero de forma no limitativa la amilasa de la variante LE429 de *B. licheniformis* (WO2002/010355) mostrada en la SEC ID NO: 41 aquí, la amilasa de *B. stearothermophilus* (BSG, SEC ID NO: 6 en WO2002/010355) mostrada en la SEC ID NO: 36 aquí, la amilasa de *B. amyloliquefaciens* (BAN, SEC ID NO: 10 en WO2002/010355) mostrada en la SEC ID NO: 37 aquí, la amilasa de *B. halodurans* SP722 (SEC ID NO: 4 en WO2002/010355) mostrada en la SEC ID NO: 38 aquí, SP690 (WO9526397) mostrada en la SEC ID NO: 39 aquí, la amilasa de AA560 (SEC ID NO: 12 en WO2002/010355) mostrada en la SEC ID: 40 aquí, la amilasa de cepas de alcalino *Bacillus* como por ejemplo, SP707 (Tsukamoto *et al.*, actividad endo-amilasa, 151 (1988), págs. 25-31.), la amilasa KSM-AP1378 (WO9700324/KAO), las amilasas KSM-K36 y KSM-K38 (EP 1,022,334-A/KAO/1,022,334-A/KAO), la amilasa SP7-7 (WO0210356/Henkel), y la amilasa AAI-6 (WO0060058), fragmentos de AMRK385 (PCT/DK01/00133), variantes o formas truncadas de lo anterior.

Preferiblemente la endo-amilasa es una enzima de tipo salvaje o la endo-amilasa es una endo-amilasa variante comprendiendo modificaciones de aminoácidos conduciendo a actividad aumentada y/o estabilidad de proteína aumentada a bajo pH, y/o a alto pH, estabilidad aumentada hacia la depleción de calcio, y/o estabilidad aumentada a temperatura elevada. Mutantes modificados química o genéticamente de tales endo-amilasas se incluyen a este respecto.

La endo-amilasa de *B. licheniformis* BLA mostrada en la SEC ID NO: 35 es una amilasa de tipo salvaje de un fragmento catalítico de 483 aminoácidos. El dominio catalítico se puede dividir en el dominio de núcleo central conteniendo el centro catalítico y un dominio C c-terminal para el dominio catalítico. En la Sec. ID 8/NN10062 el dominio de núcleo catalítico consiste en los primeros 396 aminoácidos y el dominio C se define como los aminoácidos del 397 al 483.

La variante de la endo-amilasa de *B. licheniformis*, LE429 mostrada en la SEC ID NO: 41 consiste en un fragmento catalítico de 481 aminoácidos. El dominio catalítico se puede dividir en el dominio de núcleo central conteniendo el centro catalítico y un dominio C c-terminal para el dominio catalítico. En la SEC ID NO: 41 el dominio de núcleo catalítico consiste en los primeros 394 aminoácidos y el dominio C se define como los aminoácidos del 395 al 481.

La endo-amilasa de *B. amyloliquefaciens*, BAN mostrada en la SEC ID NO: 37 es una amilasa de tipo salvaje de un fragmento catalítico de 483 aminoácidos. El dominio catalítico se puede dividir en el dominio de núcleo central conteniendo el centro catalítico y un dominio C c-terminal para el dominio catalítico. En la SEC ID NO: 37 el dominio de núcleo catalítico consiste en los primeros 396 aminoácidos y el dominio C se define como los aminoácidos del 397 al 483.

La endo-amilasa de *B. stearothermophilus*, BSG mostrada en la SEC ID NO: 36 es una amilasa de tipo salvaje de un fragmento catalítico de 483 aminoácidos y además una extensión c-terminal. El dominio catalítico se puede dividir además en el dominio de núcleo central conteniendo el centro catalítico y un dominio C c-terminal para el dominio catalítico. En la SEC ID NO: 36 el dominio del núcleo catalítico consiste en los primeros 396 aminoácidos, el dominio C se define como los aminoácidos del 397 al 483 y la extensión c-terminal se define como los aminoácidos del 484 al 515.

La endo-amilasa de *B. halodurans* SP722 mostrada en la SEC ID NO: 38 es una amilasa de tipo salvaje de un fragmento catalítico de 485 aminoácidos. El dominio de núcleo se puede dividir además en el dominio AB central conteniendo el centro catalítico y un dominio C c-terminal para el dominio catalítico. En la SEC ID NO: 38 el dominio del núcleo catalítico consiste en los primeros aminoácidos 398 y el dominio C se define como los aminoácidos del 399 al 485.

La endo-amilasa de *Bacillus alcalina*, AA560 mostrada en la SEC ID: 40 aquí es una amilasa de tipo salvaje de un fragmento catalítico de 485 aminoácidos. El dominio de núcleo se puede dividir además en el dominio AB central conteniendo el centro catalítico y un dominio C c-terminal para el dominio catalítico. El dominio de núcleo catalítico consiste en los primeros 398 aminoácidos y el dominio C se define como los aminoácidos del 399 al 485. El dominio de núcleo catalítico se codifica por los nucleótidos 1-1194 y el dominio C se codifica por los nucleótidos 1189-1455.

ES 2 356 703 T3

En el primer aspecto la secuencia de endo-amilasas tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 35, o la secuencia de endo-amilasas tiene una secuencia de aminoácidos teniendo al menos un 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% o incluso al menos un 99% de identidad con cualquiera de las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente.

En otra forma de realización preferida del primer aspecto la secuencia de endo-amilasas tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 35, en no más de 10 posiciones, no más de 9 posiciones, no más de 8 posiciones, no más de 7 posiciones, no más de 6 posiciones, no más de 5 posiciones, no más de 4 posiciones, no más de 3 posiciones, no más de 2 posiciones, o incluso no más de 1 posición.

En una forma de realización preferida del primer aspecto la secuencia de endo-amilasa tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la |SEQ ID: 40 (AA560), y comprendiendo una o más de las siguientes alteraciones R118K, D183*, G184*, N195F, R320K y R458K].

En otra forma de realización particularmente preferida del primer aspecto la secuencia de endo-amilasa tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la |SEQ ID: 40, y comprendiendo una o más, por ejemplo, así como todas, de las siguientes alteraciones R118K, D183*, G184*, N195F, R320K, R458K, N33S, D36N, K37L, E391I, Q394R, K395D, T452i y N484P.

En otra forma de realización particularmente preferida del primer aspecto la secuencia de endo-amilasas tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la |SEQ ID: 40, y comprendiendo una o más, por ejemplo, así como todas, de las siguientes alteraciones R118K, D183*, G184*, N195F, R320K, R458K y N484P].

En otra forma de realización altamente preferida del primer aspecto la secuencia de endo-amilasas tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID NO: 37 y comprende una o más, p. ej así como todas las siguientes alteraciones: S31A, D32N, I33L, E178*, G179*, N190F, K389I, K392R, E393D, V508A.

Híbridos preferidos

En una forma de realización particular el híbrido de la invención tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4, o el híbrido de la invención tiene una secuencia de aminoácidos teniendo al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% o incluso al menos un 90% de identidad con la SEC ID NO: 4.

En otra forma de realización preferida el híbrido de la invención tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4 en no más de 10 posiciones, no más de 9 posiciones, no más de 8 posiciones, no más de 7 posiciones, no más de 6 posiciones, no más de 5 posiciones, no más de 4 posiciones, no más de 3 posiciones, no más de 2 posiciones, o incluso no más de 1 posición.

En una forma de realización preferida el polipéptido de la invención comprende a) el dominio catalítico mostrado en la SEC ID NO: 40 o un dominio catalítico homólogo, y b) el CBM mostrado como los residuos del 485 al 585 de la SEC ID NO: 2, donde una o más, o preferiblemente todas, de las siguientes sustituciones se han introducido: R118K, D183*, G184*, N195F, R320K, R458K, N33S, D36N, K37L, E391I, Q394R, K395D, T452Y y N484P, usando la numeración de la SEC ID n°: 40.

En otra forma de realización preferida el polipéptido de la invención comprende el dominio catalítico mostrado en la SEC ID NO: 40 o un dominio catalítico homólogo, y b) el CBM mostrado como los residuos del 485 al 585 de la SEC ID NO: 2, donde una o más, o preferiblemente todas, de las siguientes sustituciones se han introducido: R118K, D183*, G184*, N195F, R320K, R458K y N484P, usando la numeración de la SEC ID n°: 40.

En otra forma de realización preferida el polipéptido de la invención comprende el dominio catalítico mostrado en la SEQ.ID: 37 y comprende uno o más, por ejemplo así como todas las siguientes alteraciones: S31A, D32N, I33L, E178*, G179*, N190F, K389I; K392R, E393D, V508A y un CBM teniendo la secuencia de aminoácidos mostrada como los residuos de aminoácidos del 485 al 586 en la SEC ID NO: 2.

Estabilización de híbridos

Un híbrido de la invención puede ser volátil a la incursión proteolítica si el CBM y las proteínas de dominio catalítico no forman interacciones proteína-proteína suficientemente apretadas. No obstante, la estabilidad del híbrido se puede mejorar por sustituciones de introducción en la superficie de cualquiera de las proteínas para crear un híbrido estable.

Los presentes inventores han identificado los siguientes residuos de aminoácidos en la superficie de endo-amilasas bacterianas, por ejemplo, tales polipéptidos teniendo al menos un 60% de identidad con la amilasa de *Bacillus licheniformis* (SEC ID NO: 8), para estar en contacto cercano con el CBM comprendido en el híbrido de la invención, es decir a menos de 5.0 Å de distancia. Estos residuos son objetivos adecuados para mutaciones para hacer un híbrido estable: 12, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 368, 371, 372, 381, 383, 384, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 394, 395, 396,

ES 2 356 703 T3

422, 423, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 458, 459, 460, 461, 483, 484, 485 usando la numeración de la SEC ID n°: 40. El dominio catalítico del híbrido de la invención pueden comprender una o más sustituciones en las posiciones correspondientes a estos residuos.

5 El híbrido de la invención puede comprender a) el dominio catalítico mostrado en la SEC ID NO: 40 o un dominio catalítico homólogo, y b) el CBM mostrado como los residuos del 485 al 585 de la SEC ID NO: 2, donde una o más, o preferiblemente todas, de las siguientes sustituciones se han introducido: N33S, K35S/A, D36A/N/S, K37L, E391I, Q394R, K395D, N484A/P usando la numeración de la SEC ID n°: 40.

10 En la superficie del CBM que sobresale hacia el dominio catalítico del híbrido los siguientes residuos se encuentran en contacto cercano con el dominio catalítico, es decir dentro de un radio de 5.0 Å de distancia, y estos residuos son objetivos adecuados para mutaciones para hacer un híbrido estable: 485, 486, 487, 488, 507, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 526, 538, 539, 540, 541, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559 usando la numeración de la SEC ID n°: 2.

15

Vectores de expresión

20 La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que pueden comprender una secuencia de ADN que codifica la enzima híbrida, un promotor, una secuencia de péptido señal, y señales de parada traduccionales y transcripcionales. Los diferentes ADN y secuencias de control anteriormente descritas se pueden unir para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido en tales sitios. Alternativamente, la secuencia de ADN de la presente invención se puede expresar por inserción de la secuencia de ADN o un constructo de ADN comprendiendo la secuencia en un vector apropiado para la expresión. En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se localiza en el vector de modo que la secuencia codificante está operativamente vinculada con las secuencias de control apropiadas para la expresión, y posiblemente la secreción.

30 El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus), que puede ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y pueden provocar la expresión de la secuencia de ADN. La elección del vector típicamente dependerá de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector ha de ser introducido. Los vectores pueden ser plásmidos lineales o circulares cerrados. El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir un vector que existe como una entidad extracromosómica, la replicación del cual es independiente de replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma, un cósmido o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación. Alternativamente, el vector puede ser uno que, introducido en la célula huésped, se integra en el genoma y replica con la cromosoma(s) en el cual se ha integrado. El sistema de vector puede ser un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmido que juntos contienen el ADN total a introducir en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

40

Células huéspedes

45 La célula huésped de la invención, o bien comprendiendo un constructo de ADN o un vector de expresión comprendiendo la secuencia de ADN que codifica el polipéptido del primer aspecto, por ejemplo, una enzima híbrida, se usa ventajosamente como una célula huésped en la producción recombinante de la enzima híbrida, enzima de tipo salvaje o una enzima de tipo salvaje genéticamente modificada. La célula se puede transformar con un vector de expresión. Alternativamente, la célula se puede transformar con el constructo de ADN de la invención codificando la enzima híbrida o un enzima de tipo salvaje genéticamente modificada, integrando convenientemente el constructo de ADN (en una o más copias) en el cromosoma huésped. La integración del constructo de ADN en el cromosoma huésped se puede realizar según métodos convencionales, por ejemplo, por recombinación homóloga o heteróloga.

50 La célula huésped puede ser cualquier célula eucariótica o procariótica apropiada, por ejemplo, una célula bacteriana, una célula fúngica filamentosa, una célula de levadura, una célula vegetal o una célula mamífera.

55

Aislamiento y clonación de una secuencia de ADN codificando una endo-amilasa parental

60 Las técnicas usadas para aislar o clonar una secuencia de ADN que codifica el polipéptido del primer aspecto, por ejemplo, una enzima híbrida, se conocen en la técnica e incluyen el aislamiento de ADN genómico, la preparación de ADNc, o una combinación de los mismos. La clonación de las secuencias de ADN de la presente invención de tal ADN genómico se pueden efectuar, por ejemplo, usando la bien conocida reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la selección de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales compartidas. Véase, por ejemplo, Innis *et al.*, 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Se pueden utilizar otros procedimientos de amplificación de ADN tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la transcripción activada ligada (LAT) y la amplificación basada en la secuencia de ADN (NASBA).

65

La secuencia de ADN codificando una endo-amilasa parental se puede aislar a partir de cualquier célula o micro-organismo produciendo la endo-amilasa en cuestión, usando varios métodos bien conocidos en la técnica. Primero, se debería construir un ADN genómico y/o una genoteca de ADNc usando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la endo-amilasa a estudiar. Luego, si la secuencia de aminoácidos de la endo-amilasa es conocida, se pueden sintetizar sondas de oligonucleótidos marcadas y usar para identificar clones codificando endo-amilasa a partir de una genoteca genómica obtenida a partir del organismo en cuestión. Alternativamente, una sonda de oligonucleótidos marcada conteniendo secuencias homólogas a otros genes de endo-amilasa conocidos se podría usar como una sonda para identificar clones codificando endo-amilasa, usando condiciones de hibridación y lavado de una astringencia muy baja a altísima.

Otro método para identificar clones codificando endo-amilasa implicaría insertar fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tales como un plásmido, transformar bacterias endo-amilasas negativas con la genoteca de ADN resultante, y luego colocar en placas las bacterias transformadas sobre agar conteniendo un sustrato para la endo-amilasa (es decir, maltosa), permitiendo así que los clones expresen la endo-amilasa a identificar.

Alternativamente, la secuencia de ADN codificando la enzima se puede preparar sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de fosforamidita descrito por S.L. Beaucage y M.H. Caruthers, (1981), letras de tetraedro 22, p. 1859-1869, o el método descrito por Mattes *et al.* (1984), EMBO J. 3, p. 801-805. En el método de fosforamidita, se sintetizan oligonucleótidos, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, se purifican, recuecen, ligan y clonan en vectores apropiados.

Finalmente, la secuencia de ADN puede ser de origen mezclado sintético y genómico, origen mezclado sintético y de ADNc u origen mezclado genómico y de ADNc, preparado ligando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según sea apropiado, los fragmentos correspondientes a diferentes partes de la secuencia de ADN entera), conforme a técnicas estándar. La secuencia de ADN también se puede preparar por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en US 4.683.202 o por R.K. Saiki *et al.* (1988), Science 239, 1988, págs. 487-491.

Secuencia de ADN aislada

La presente invención se refiere, entre otras cosas, a una secuencia de ADN aislada comprendiendo una secuencia de ADN que codifica un polipéptido del primer aspecto, por ejemplo, una enzima híbrida.

El término "secuencia de ADN aislada" como se utiliza en este caso se refiere a una secuencia de ADN, la cual está esencialmente libre de otras secuencias de ADN, por ejemplo, al menos aproximadamente un 20% pura, preferiblemente al menos aproximadamente un 40% pura, más preferiblemente al menos aproximadamente un 60% pura, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente un 80% pura, y de la forma más preferible al menos aproximadamente un 90% pura como se determina por electroforesis de agarosa.

Por ejemplo, una secuencia de ADN aislada se puede obtener por procedimientos de clonación estándar usados en ingeniería genética para recolocar la secuencia de ADN de su ubicación natural a un sitio diferente donde éste estará reproducido. Los procedimientos de clonación pueden implicar escisión y aislamiento de un fragmento de ADN deseado comprendiendo la secuencia de ADN que codifica el polipéptido de interés, inserción del fragmento en una molécula de vector, e incorporación del vector recombinante en una célula huésped donde copias múltiples o clones de la secuencia de ADN estará replicada. Una secuencia de ADN aislada se puede manipular en una variedad de vías para proveer a expresión del polipéptido de interés. Manipulación de la secuencia de ADN antes de la inserción su en un vector necesario o puede ser deseable dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar secuencias de ADN utilizando métodos DNA recombinante se conocen bien en la técnica.

Construto de ADN

La presente invención se refiere, entre otras cosas, a un construto de ADN comprendiendo una secuencia de ADN que codifica un polipéptido del primer aspecto. "Construto de ADN" se define aquí como una molécula de ADN, o bien bicatenaria o única, la cual se aísla a partir de un gen de origen natural o la cual se ha modificado para contener segmentos de ADN, los cuales se combinan y superponen de tal manera, que de otro modo no existirían en la naturaleza. El término construto de ADN es sinónimo del término cassette de expresión cuando el construto de ADN contiene todas las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

Mutagénesis dirigida

Una vez se ha aislado una secuencia de ADN codificando endo-amilasa parental adecuada para el uso en un polipéptido del primer aspecto, y se han identificado sitios deseables para la mutación, se pueden introducir mutaciones usando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos flanqueando los sitios de mutación deseados. En un método específico, un fragmento monocatenario de ADN, la secuencia codificando en-

do-amilasa, se crea en un vector llevando el gen de endo-amilasa. Luego el nucleótido sintético, llevando la mutación deseada, se recuece a una parte homóloga del ADN monocatenario. El espacio restante se llena después con ADN polimerasa I (fragmento Klenow) y el constructo se liga usando la ligasa T4. Un ejemplo específico de este método se describe en Morinaga *et al.* (1984), *Biotechnology* 2, p. 646-639. US 4.760.025 describe la introducción de oligonucleótidos codificando mutaciones múltiples mediante la realización de alteraciones menores del casete. No obstante, una variedad incluso mayor de mutaciones se pueden introducir en cualquier momento por el método de Morinaga, porque se puede introducir una multitud de oligonucleótidos, de diferentes longitudes.

Otro método para introducir mutaciones en secuencias de ADN codificando endo-amilasa se describe en Nelson y Long, (1989), *Analytical Biochemistry* 180, p. 147-151. Éste implica la generación en 3 fases de un fragmento de PCR conteniendo la mutación deseada introducida usando una cadena de ADN químicamente sintetizada como uno de los cebadores en las reacciones de la PCR. Del fragmento generado por reacción en cadena de la polimerasa, un fragmento de ADN llevando la mutación se puede aislar por escisión con endo-nucleasas de restricción y reinsertar en un plásmido de expresión.

Mutagénesis aleatoria localizada

La mutagénesis aleatoria se puede localizar ventajosamente en una parte de la endo-amilasa parental en cuestión. Esto puede, por ejemplo, ser ventajoso cuando regiones determinadas de la enzima se han identificado por ser particularmente importantes para una propiedad dada de la enzima, y al modificarse se espera que resulten en un variante con propiedades mejoradas. Tales regiones se pueden identificar normalmente cuando la estructura terciaria de la enzima parental se ha dilucidado y relacionado con la función de la enzima.

La mutagénesis aleatoria localizada o de región específica se realiza convenientemente usando técnicas de mutagénesis generadas de PCR como se ha descrito anteriormente o cualquier otra técnica adecuada conocida en la técnica. Alternativamente, la secuencia de ADN codificando la parte de la secuencia de ADN a modificar se puede aislar, por ejemplo, por inserción en un vector adecuado, y dicha parte se puede someter posteriormente a mutagénesis usando cualquiera de los métodos de mutagénesis mencionados anteriormente.

Expresión de las enzimas en plantas

Una secuencia de ADN codificando una enzima de interés, tal como una enzima híbrida de la presente invención, se puede transformar y expresar en plantas transgénicas como se describe abajo.

La planta transgénica puede ser dicotiledónea o monocotiledónea, para abreviar una dicot o una monocot. Ejemplos de plantas monocot son hierbas, tales como poa de los prados (*Poa pratense*, Poa), hierba forrajera tal como Festuca, Lolium, césped templado, tal como Agrostis, y cereales, por ejemplo, trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz (en grano).

Ejemplos de plantas dicot son tabaco, leguminosas, tales como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisantes, moldura y semilla de soja, y plantas crucíferas (de la familia Brassicaceae), tales como la coliflor, aceite de semilla de colza y el organismo modelo estrechamente relacionado *Arabidopsis thaliana*.

Ejemplos de partes de planta son vástago, callo, hojas, raíz, frutos, semillas, y tubérculos como weii como los tejidos individuales comprendiendo estas partes, por ejemplo, epidermis, mesophyll, parenchyma, tejidos vasculares, meristemas. En el presente contexto, también compartimentos de células vegetales específicos, tales como cloroplasto, apoplasto, mitocondria, vacuola, peroxisomas y citoplasma se consideran como partes de planta. Además, cualquier célula vegetal, cualquiera que sea el origen del tejido, se considera como una parte de planta. Asimismo, partes de planta tales como tejidos específicos y células aisladas para facilitar la utilización de la invención también se consideran partes de planta, por ejemplo, embriones, endospermas, aleurona y revestimientos de semillas.

También se incluye dentro del campo de la invención la progenie de tales plantas, partes de planta y células vegetales.

La planta transgénica o célula vegetal expresando la enzima de interés se puede construir conforme a métodos conocidos en la técnica. En resumidas cuentas la planta o célula vegetal se construye incorporando uno o más constructos de expresión codificando la enzima de interés en el genoma huésped de la planta y propagando la planta modificada resultante o célula vegetal en una planta transgénica o célula vegetal.

Convenientemente, el constructo de expresión es un constructo de ADN que comprende un gen codificando la enzima de interés en asociación operable con secuencias reguladoras apropiadas requeridas para la expresión del gen en la planta o parte de la planta de elección. Además, el constructo de expresión puede comprender un marcador seleccionable útil para identificar células huéspedes en las cuales el constructo de expresión se ha integrado y secuencias de ADN necesarias para introducir el constructo en la planta en cuestión (esto depende del método de introducción de ADN a usar).

La elección de secuencias reguladoras, así como secuencias de promotor y de terminador y opcionalmente secuencias de señal o de tránsito se determina, por ejemplo, basándose en cuándo, dónde y cómo se desea expresar la enzima. Por ejemplo, la expresión del gen codificando la enzima de la invención puede ser constitutiva o inducible, o puede ser desarrollable, específica de fase o tejido, y el producto genético se puede prever en un compartimiento celular, tejido o parte de planta específicos tales como semillas u hojas. Se describen secuencias reguladoras, por ejemplo, por Tague *et al*, Plant, Phys., 86, 506, 1988.

Para la expresión constitutiva se puede usar el 35S-CaMV, la ubiquitina de maíz 1 y el promotor de actina 1 de arroz (Franck *et al.* 1980. Cell 21: 285-294, Christensen AH, Sharrock RA y Quail 1992. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. Plant Mo. Biol. 18, 675-689.; Zhang W, McElroy D. y Wu R 1991, Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants. Plant Cell 3, 1155-1165). Promotores órgano-específicos pueden ser, por ejemplo, un promotor de tejidos sumidero de almacenamiento tales como semillas, tubérculos de patata, y frutos (Edwards & Coruzzi, 1990. Annu. Rev. Genet. 24: 275-303), o de tejidos sumidero metabólicos tales como meristemas (Ito *et al.*, 1994. Plant Mol. Biol. 24: 863-878), un promotor de semilla específico tal como la glutelina, prolamina, globulina o promotor de albúmina de arroz (Wu *et al.*, Plant and Cell Physiology Vol. 39, No. 8 págs. 885-889 (1998), un promotor *Vicia faba* de la legumina B4 y el gen de proteína de semilla desconocido de *Vicia faba* descrito por Conrad U. *et al*, Journal of Plant Physiology Vol. 152, n°. 6 págs. 708-711 (1998), un promotor de una proteína corporal de aceite de semilla (Chen *et al.*, Plant and cell physiology vol. 39, n°. 9 págs. 935-941 (1998), el promotor napA de proteína de almacenamiento *Brassica napus*, o cualquier otro promotor específico de semilla conocido en la técnica, por ejemplo, como se describe en WO 91/14772. Además, el promotor puede ser un promotor específico de hoja tal como el promotor rbcS de arroz o tomate (Kiozuka *et al.*, Plant Physiology Vol. 102, n°. 3 págs. 991-1000 (1993), el promotor de gen de metiltransferasa de adenina del virus chlorella (Mittra, A. y Higgins, DW, Plant Molecular Biology vol. 26, n°. 1 págs. 85-93 (1994), o el promotor del gen aldP de arroz (Kagaya *et al.*, Molecular and General Genetics vol. 248, n°. 6 págs. 668-674 (1995), o un promotor inducible dañado tal como el promotor pin2 de patata (Xu *et al*, Plant Molecular Biology vol. 22, n°. 4 págs. 573-588 (1993). Asimismo, el promotor se puede inducir por tratamientos abióticos tales como temperatura, sequía o alteraciones en la salinidad o inducidas por sustancias exógenamente aplicadas que activan el promotor, por ejemplo, etanol, estrógenos, hormonas de planta como etileno, ácido abscísico y ácido giberélico y metales pesados.

Un elemento promotor intensificador se puede utilizar para conseguir una mayor expresión de la enzima en la planta. Por ejemplo, el elemento intensificador promotor puede ser un intrón el cual se coloca entre el promotor y la secuencia de nucleótidos codificando la enzima. Por ejemplo, Xu *et al.* op cit revela el uso del primer intrón del gen actina 1 de arroz para mejorar la expresión.

El gen marcador seleccionable y cualquier otra parte del constructo de expresión se pueden elegir a partir de las disponibles en la técnica.

El constructo de ADN se incorpora en el genoma de la planta según técnicas convencionales conocidas en la técnica, incluyendo transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación mediada por virus, micro inyección, bombardeo de partículas, transformación biolística, y electroporación (Gasser *et al*, Science, 244, 1293; Potrykus, Bio/Techn. 8, 535, 1990; Shimamoto *et al*, Nature, 338, 274, 1989).

Actualmente, la transferencia genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es el método de elección para generar dicots transgénicas (para revisión Hooikas & Schilperoort, 1992. Plant Mol. Biol. 19: 15-38), y también se pueden usar para transformar monocots, aunque se usan frecuentemente otros métodos de transformación para estas plantas. Actualmente, el método de elección para generar monocots transgénicas complementando el método del *Agrobacterium* es el bombardeo de partículas (oro microscópico o partículas de tungsteno revestidas con el ADN de transformación) de callos embrionarios o desarrollando embriones (Christou, 1992. Plant J. 2: 275-281; Shimamoto, 1994. Curr. Opin. Biotechnol. 5: 158-162; Vasil *et al.*, 1992. Bio/Technology 10: 667-674). Un método alternativo para la transformación de monocots se basa en la transformación de protoplastos como se describe por Omirulleh S, *et al.*, Plant Molecular biology Vol. 21, n°. 3 págs. 415-428 (1993).

La siguiente transformación, teniendo incorporados los transformantes el constructo de expresión se seleccionan y regeneran en plantas enteras según métodos bien conocidos en la técnica. Frecuentemente el procedimiento de transformación se diseña para la eliminación selectiva de genes de selección o bien durante la regeneración o en las siguientes generaciones usando por ejemplo, la co-transformación con dos constructos de T-ADN separados o una escisión sitio-específica del gen de selección por una recombinasa específica.

Productos a base de masa

La enzima híbrida de la presente invención se puede utilizar para la preparación de un producto basado en masa comestible tal como, pan, tortillas, pasteles, panqueques, bizcochos, galletas, costras de pastel, más preferiblemente productos horneados, tales como, productos de pan.

La masa usada para preparar el producto basado en masa generalmente comprende harina, por ejemplo, de granos, tal como, harina de trigo, harina de maíz, harina de centeno, harina de avena, o harina de sorgo. La masa generalmente

ES 2 356 703 T3

se leuda por la adición de un cultivo de levadura adecuado, tal como un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadero) o un agente de leudación químico.

El producto basado en masa comestible puede ser preferiblemente cualquier tipo de producto horneado obtenido a partir de masa, tanto de carácter blando como crujiente, tanto de tipo blanco, claro u oscuro. Productos a base de masa comestibles preferidos incluyen pan (en particular pan blanco, de trigo, integral, bajo en carbohidratos, marrón, multi-cereales, oscuro y de centeno), típicamente en forma de barras, panecillos o bollos, y más preferiblemente, pan árabe, panecillos de hamburguesa, pan de tipo Baguette francesa, pan pita, tortillas, pasteles, panqueques, bizcochos, galletas, costras de pastel, pan crujiente, pan vaporizado, corteza de pizza y similares.

El producto a base de masa comestible se hace calentando la masa, por ejemplo, por cocción o vaporización. Ejemplos son el pan horneado o vaporizado (en particular el pan blanco, integral o de centeno), típicamente en forma de barras o bollos. El producto comestible a base de masa también se puede preparar por fritura (p. ej., fritura profunda en grasa o aceite caliente). Un ejemplo de tal producto comestible es un donut.

La enzima híbrida del primer aspecto de la invención tiene preferiblemente una alta tolerancia a la sobredosificación. La adición del polipéptido de la invención, por ejemplo, el polipéptido del primer aspecto, en 2 veces, 3 veces, preferiblemente 4 veces, más preferiblemente 5 veces, de la forma más preferible 6 veces la dosis eficaz de dicho polipéptido a una masa resulta en un ELR y/o un ELRN inferior al 15%, menos del 10%, menos del 7%, menos del 6%, menos del 5%, menos del 4% o incluso menos del 3%.

El polipéptido de la invención puede tener una actividad residual de al menos un 20%, tal como al menos un 25% o un 30%, preferiblemente al menos un 35%, más preferiblemente al menos un 40% y de la forma más preferible al menos un 50%, en las condiciones de prueba dadas en la especificación.

El polipéptido de la presente invención puede tener además una proporción exo-a-endo mejorada definida como IEF1 o IEF2 en la especificación. La IEF1 o IEF2 del polipéptido puede ser más grande que 1, tal como 1,1 ó 1,5, preferiblemente 2 ó 2,5 o 3, más preferiblemente 3,5 ó 4, de la forma más preferible 5 ó 7 ó 10.

En otras formas de realización la invención proporciona polipéptidos con características que son de interés particular para objetivos de cocción, concretamente una actividad residual de al menos un 25% a 70°C en las condiciones de prueba dadas en la especificación, una proporción exo-a-endo aumentada (IEF), donde IEF es más grande que 1, y finalmente una firmeza reducida inferior a un 5% (en las condiciones de prueba dadas en la especificación) mientras que el cambio en la dureza es de al menos 85 unidades (en las condiciones de prueba dadas en la especificación) y/o el cambio de movilidad de agua libre es de al menos 1100 unidades (en las condiciones de prueba dadas en la especificación).

Para fines de cocción el polipéptido de la invención puede dar una reducción de firmeza, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, de al menos un 5%, mientras que la dureza d, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, es de al menos 85 unidades, tal como 90 unidades o 100 unidades, preferiblemente 150 unidades o 200 unidades, más preferiblemente 250 unidades o 300 unidades, de la forma más preferible 400 unidades o 600 unidades. En otra forma de realización el polipéptido de la invención puede dar una reducción de firmeza, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, de al menos un 4%, mientras que la dureza d, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, es de al menos 85 unidades, tal como 90 unidades o 100 unidades, preferiblemente 150 unidades o 200 unidades, más preferiblemente 250 unidades o 300 unidades, de la forma más preferible 400 unidades o 600 unidades. En otra forma de realización el polipéptido de la invención puede dar una reducción de firmeza, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, de al menos un 2%, mientras que la dureza d, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, es de al menos 85 unidades, tales como 90 unidades o 100 unidades, preferiblemente 150 unidades o 200 unidades, más preferiblemente 250 unidades o 300 unidades, de la forma más preferible 400 unidades o 600 unidades. En otra forma de realización el polipéptido de la invención puede dar una reducción de firmeza, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, de al menos un 1%, mientras que la dureza d, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, es de al menos 85 unidades, tales como 90 unidades o 100 unidades, preferiblemente 150 unidades o 200 unidades, más preferiblemente 250 unidades o 300 unidades, de la manera más preferible 400 unidades o 600 unidades.

Cuando el polipéptido de la invención se añade junto con 300 MANU Novamyl®/kg de harina éste puede dar una reducción de firmeza, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, de al menos un 5%, mientras la dureza d, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, es de al menos 15 unidades, tales como 20 unidades o 30 unidades, preferiblemente 40 unidades o 50 unidades, más preferiblemente 60 unidades o 70 unidades, de la forma más preferible 85 unidades o 100 unidades. En otra forma de realización el polipéptido de la invención puede dar una reducción de firmeza, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, de al menos un 4%, mientras la dureza d, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, es de al menos 15 unidades, tal como 20 unidades o 30 unidades, preferiblemente 40 unidades o 50 unidades, más preferiblemente 60 unidades o 70 unidades, de la forma más preferible 85 unidades o 100 unidades. En otra forma de realización el polipéptido de la invención puede dar una reducción de firmeza, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, de al menos un 2%, mientras la dureza d, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, es de al menos 15 unidades, tal como 20 unidades o 30 unidades, preferiblemente 40 unidades o 50 unidades, más preferiblemente 60 unidades o 70 unidades, de la forma

ES 2 356 703 T3

más preferible 85 unidades o 100 unidades. En otra forma de realización el polipéptido de la invención puede dar una reducción de firmeza, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, de al menos un 1%, mientras dHardness (dureza d), cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, es de al menos 15 unidades, tal como 20 unidades o 30 unidades, preferiblemente 40 unidades o 50 unidades, más preferiblemente 60 unidades o 70 unidades, de la forma más preferible 85 unidades o 100 unidades.

Para fines de cocción el polipéptido de la invención puede dar una reducción de firmeza, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, de al menos un 5%, mientras dMobility (movilidad d), cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, es de al menos 300 unidades, tal como 400 unidades o 500 unidades, preferiblemente 600 unidades o 700 unidades, más preferiblemente 800 unidades o 900 unidades, de la forma más preferible 1000 unidades o 1200 unidades. En otra forma de realización el polipéptido de la invención puede dar una reducción de firmeza, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, de al menos un 4%, mientras dMobility, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, es de al menos 300 unidades, tal como 400 unidades o 500 unidades, preferiblemente 600 unidades o 700 unidades, más preferiblemente 800 unidades o 900 unidades, de la forma más preferible 1000 unidades o 1200 unidades. En otra forma de realización el polipéptido de la invención puede dar una reducción en la firmeza, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, de al menos un 2%, mientras dMobility, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, es de al menos 300 unidades, tal como 400 unidades o 500 unidades, preferiblemente 600 unidades o 700 unidades, más preferiblemente 800 unidades o 900 unidades, de la forma más preferible 1000 unidades o 1200 unidades. En otra forma de realización el polipéptido de la invención puede dar una reducción de firmeza, cuando medido en las condiciones de prueba dadas en la especificación, de al menos 1%, mientras dMobility, cuando medido en las condiciones de prueba dadas en la especificación, es al menos 300 unidades, tales como 400 unidades o 500 unidades, preferiblemente 600 unidades o 700 unidades, más preferiblemente 800 unidades o 900 unidades, de la forma más preferible 1000 unidades o 1200 unidades.

Cuando el polipéptido de la invención se añade junto con 300 MANU Novamyl®/kg de harina éste puede dar una reducción de firmeza, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, de al menos un 5%, mientras dMobility, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, es de al menos 1000 unidades, tal como 1100 unidades o 1200 unidades, preferiblemente 1400 unidades o 1500 unidades, más preferiblemente 1800 unidades o 2000 unidades, de la forma más preferible 2200 unidades o 2500 unidades. En otra forma de realización el polipéptido de la invención puede dar una reducción de firmeza, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, de al menos un 4%, mientras dMobility, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, es de al menos 1000 unidades, tal como 1100 unidades o 1200 unidades, preferiblemente 1400 unidades o 1500 unidades, más preferiblemente 1800 unidades o 2000 unidades, de la forma más preferible 2200 unidades o 2500 unidades. En otra forma de realización el polipéptido de la invención puede dar una reducción de firmeza, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, de al menos un 2%, mientras dMobility, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, es al menos 1000 unidades, tal como 1100 unidades o 1200 unidades, preferiblemente 1400 unidades o 1500 unidades, más preferiblemente 1800 unidades o 2000 unidades, de la forma más preferible 2200 unidades o 2500 unidades. En otra forma de realización el polipéptido de la invención puede dar una reducción de firmeza, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, de al menos un 1%, mientras dMobility, cuando se mide en las condiciones de prueba dadas en la especificación, es de al menos 1000 unidades, tal como 1100 unidades o 1200 unidades, preferiblemente 1400 unidades o 1500 unidades, más preferiblemente 1800 unidades o 2000 unidades, de la forma más preferible 2200 unidades o 2500 unidades.

Los valores anteriores para la reducción de la firmeza, dHardness y dMobility son particularmente relevantes para el pan, en particular para el pan preparado por el método de esponja y masa. Una correlación similar entre reducción de firmeza y dHardness y dMobility se describe en el Ejemplo 7.

50 *Enzima adicional opcional*

La enzima híbrida de la presente invención se puede usar opcionalmente junto con una o más enzimas adicionales y/o agentes antiendurecimiento.

55 Agentes antiendurecimiento incluyen, pero de forma no limitativa, emulsionantes, hidrocoloides y agentes antiendurecimiento enzimáticos. Como se utiliza en este caso, un agente antiendurecimiento se refiere a un agente químico, enzimático o biológico que puede retardar el endurecimiento de los productos a base de masa, es decir, que puede reducir el índice de deterioro de la blandura del producto a base de masa durante el almacenamiento. La blandura de productos a base de masa (y el efecto antiendurecimiento del agente antiendurecimiento) se puede evaluar empíricamente por los panaderos expertos o medir usando un analizador de textura (por ejemplo; TAXT2), como se conoce en la técnica.

Ejemplos de agentes antiendurecimiento químicos incluyen lípidos polares, por ejemplo, ácidos grasos y sus ésteres de monoglicéridos, tales como, se describe en la patente estadounidense n°. 4.160.848.

65 El agente antiendurecimiento puede ser una enzima antiendurecimiento, la cual preferiblemente se añade a la masa antes de cocinarla (p. ej., hornearla). Ejemplos de enzimas antiendurecimiento incluyen, sin limitación, endo-amilasas, tales como los híbridos de la invención, exo-endo-amilasas, tales como, por ejemplo, la exo-amilasa descrita

en la patente estadounidense nº. 6.667.065 y US 2004/0043109, pululanasa, glicosiltransferasa, amiloglicosidasas, enzimas de ramificación (enzima ramificadora 1,4-alfa-glyucan), 4-alfa-glucanotransferasas (transferasa de dextrina), beta-amilasas, alfa-amilasas maltogénicas, lipasas, fosfolipasas, galactolipasas, aciltransferasas, pectato liasas, xilanasas, endotransglucosilasas de xiloglucano, proteasas, por ejemplo, como se describe en WO 2003/084331, peptidasas y combinaciones de las mismas.

La amilasa puede ser de un hongo, bacteria o planta. Puede ser una endo-amilasa, por ejemplo, de *Bacillus*, particularmente *B. licheniformis* o *B. amyloliquefaciens*, una beta-amilasa, por ejemplo, de planta (p. ej., soja) o de fuentes microbianas (por ejemplo, *Bacillus*), tal como la alfa-amilasa de *Bacillus clausii* no maltogénica descrita en WO9950399A2, la amilasa *Pseudomonas saccharofilia* en la SEC ID NO: 1 de WO 2004111217, o una glucoamilasa, o una endo-amilasa fúngica, por ejemplo, de *A. niger* o *A. oryzae*.

Más preferiblemente, la enzima adicional es una enzima de antiendurecimiento y preferiblemente la enzima de antiendurecimiento es una amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133). Las amilasas maltogénicas se añaden a la masa en una cantidad eficaz para retardar el endurecimiento del producto, tal como, al menos 500 MANU/kg de harina, más preferiblemente en una cantidad de al menos 500 a 1500 MANU/kg de harina. Una amilasa maltogénica se puede obtener de cualquier fuente adecuada, tal como derivada de una bacteria, tal como *Bacillus*, preferiblemente *B. stearothermophilus*, por ejemplo, de la cepa NCIB 11837 o una variante de la misma hecha por modificación de aminoácido (EP 494233 B1, Pat nº. 6.162.628). La amilasa maltogénica se puede añadir preferiblemente en una dosis de 20 a 2000 MANU/kg de harina, preferiblemente 500 a 1000 MANU/kg de harina, más preferiblemente, al menos 750 MANU/kg de harina, al menos 1000 MANU/kg de harina. Una amilasa maltogénica preferida es Novamyl® (disponible a través de Novozymes A/S).

En otra forma de realización preferida, la enzima antiendurecimiento es una xilanasas. La xilanasas se puede obtener de cualquier fuente adecuada, por ejemplo, de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus subtilis*, como se describe en WO 2003/010923, WO 2001/066711 o WO 2000/039289, y *Aspergillus*, en particular de *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. awamori*, o *A. tubigensis* o *Trichoderma* y *Thermomyces* como se describe en WO 96/32472, por ejemplo, *T. reesei*, o de una cepa de *Humicola*, por ejemplo, *H. insolens*. Opcionalmente, una enzima adicional se puede utilizar con las enzimas antiendurecimiento anteriores, tales como, una enzima lipolítica, particularmente actividad fosfolipasa, galactoilipasa y/o triacil glicerol lipasa, por ejemplo, como se describe en WO 9953769, WO 0032758, WO 0200852 o WO 2002066622. O por ejemplo, una transglutaminasa, una enzima celulítica, por ejemplo, una celulasa, una aciltransferasa, una proteína disulfuro isomerasa, una pectinasa, una pectato liasa, una oxidorreductasa. La enzima puede ser de cualquier origen, incluyendo de origen mamífero, vegetal, y preferiblemente microbiano (bacteriano, de levadura o fúngico) y se puede obtener por técnicas usadas de forma convencional en la técnica.

La enzima adicional también puede ser una enzima lipolítica, particularmente actividad fosfolipasa, galactoilipasa y/o triacil glicerol lipasa, por ejemplo, como se describe en WO 9953769, WO 0032758, WO 0200852 o WO 2002066622.

Además, la enzima adicional puede ser una segunda amilasa, una glucanotransferasa de ciclodextrina, una proteasa o peptidasa, en particular una exopeptidasa, una transglutaminasa, una lipasa, una fosfolipasa, una celulasa, una hemicelulasa, una glicosiltransferasa, una enzima ramificadora (enzima ramificadora 1,4-alfa-glucano) o una oxidorreductasa. La enzima adicional puede ser de origen mamífero, vegetal o microbiano (bacteriano, de levadura o fúngico).

La segunda amilasa puede ser de un hongo, bacteria o planta. Puede ser una amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133), por ejemplo, de *B. stearothermophilus*, una endo-amilasa, por ejemplo, de *Bacillus*, particularmente *B. licheniformis* o *B. amyloliquefaciens*, una beta-amilasa, por ejemplo, de planta (p. ej., soja) o de fuentes microbianas (por ejemplo, *Bacillus*), una glucoamilasa, por ejemplo, de *A. niger*, o una endo-amilasa fúngica, por ejemplo, de *A. oryzae* o de *Pseudomonas saccharofilia* tal como la alfa-amilasa no maltogénica descrita en WO9950399A2.

La hemicelulasa puede ser una pentosanasa, por ejemplo, una xilanasas que puede ser de origen microbiano, por ejemplo, derivada de una bacteria u hongo, tal como una cepa de *Aspergillus*, en particular de *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. awamori*, o *A. tubigensis*, de una cepa de *Trichoderma*, por ejemplo, *T. reesei*, o de una cepa de *Humicola*, por ejemplo, *H. insolens*.

La proteasa puede ser de *Bacillus*, por ejemplo, *B. amyloliquefaciens*.

La oxidorreductasa puede ser una glucosa oxidasa, una carbohidrato oxidasa, una hexosa oxidasa, una lipoxigenasa, una peroxidasa, o una lacasa.

Aditivo de mejora de la masa y/o del pan

La enzima híbrida de la presente invención se puede proporcionar como una masa y/o aditivo de mejora del pan en forma de un granulado o polvo aglomerado. La masa y/o aditivo de mejora del pan puede tener preferiblemente una distribución del tamaño de las partículas reducida con más de un 95% (en peso) de las partículas en el rango de 25 a 500 µM.

En una forma de realización preferida una composición, por ejemplo, un aditivo de mejora del pan, se produce en un proceso que incluye las etapas de; a) proporcionar una primera secuencia de aminoácidos teniendo actividad endo-amilasa; b) proporcionar una segunda secuencia de aminoácidos comprendiendo un módulo de unión a carbohidratos; c) y construir un polipéptido comprendiendo dicha primera secuencia de aminoácidos y segunda secuencia de aminoácidos; d) proporcionar una secuencia de ADN codificando dicho polipéptido; e) expresar dicha secuencia de ADN en una célula huésped adecuada y recuperar dicho polipéptido; f) añadir dicho polipéptido a harina o a un granulado o polvo aglomerado.

Los granulados y polvos aglomerados se pueden preparar por métodos convencionales, por ejemplo, pulverizando la amilasa, es decir la enzima híbrida, sobre un portador en un granulador de lecho fluidizado. El portador puede consistir en núcleos granulosos con un tamaño de partícula adecuado. El portador puede ser soluble o insoluble, por ejemplo, una sal (tal como NaCl o sulfato de sodio), un azúcar (tal como sacarosa o lactosa), un alcohol de azúcar (tal como sorbitol), almidón, arroz, sémola de maíz, o soja.

15 *Tratamiento de almidón*

El polipéptido de esta invención, es decir una endo-amilasa con un CBM, posee propiedades valiosas que permiten una variedad de aplicaciones industriales. En particular, enzimas del primer aspecto son aplicables como un componente en composiciones detergentes de lavado, lavado de vajilla y limpieza de superficie duras. Numerosas variantes son particularmente útiles en la producción de edulcorantes y etanol de almidón, y/o para el desencolado textil. Un ejemplo de producción de etanol, donde se puede utilizar una endo-amilasa de la invención se describe en la patente estadounidense nº. 5.231.017 la cual se incorpora por referencia por la presente.

Además, un proceso donde se puede utilizar una endo amilasa de la invención se describe en la solicitud de patente danesa PA 2003 01568 (por la presente incorporada por referencia). Dicho proceso comprende hidrolizar almidón en un hidrolizado de almidón soluble a una temperatura inferior a la temperatura de gelatinización inicial de dicho almidón granulado. Otro proceso adecuado se describe en WO2004081193 (por la presente incorporado por referencia).

Condiciones para procesos de conversión de almidón convencionales, incluyendo la licuefacción de almidón y/o procesos de sacarificación se describen en, por ejemplo, 3.912.590 y en las publicaciones de patente EP Nos. 252.730 y 63.909.

Un uso preferido es en un proceso de fermentación donde un sustrato de almidón se licúa y/o sacarifica en presencia de la endo-amilasa teniendo un CBM para producir glucosa y/o maltosa, por ejemplo, para el uso como edulcorantes o adecuado para la conversión en un producto de fermentación por un organismo de fermentación, preferiblemente una levadura. Tales procesos de fermentación incluyen un proceso para producir etanol para etanol combustible o potable (alcohol portátil), un proceso para producir una bebida, un proceso para producir compuestos orgánicos, tal como ácido cítrico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico; cetonas; aminoácidos, tales como ácido glutámico (monoglutamato de sodio), pero también más compuestos complejos tales como antibióticos, tales como penicilina, tetraciclina; enzimas; vitaminas, tales como riboflavina, B12, betacarotenos; hormonas, las cuales son difíciles de producir sintéticamente.

45 *Producción de edulcorantes de almidón*

Un proceso "tradicional" para la conversión de almidón a jarabes de fructosa normalmente consiste en tres procesos enzimáticos consecutivos, es decir, un proceso de licuefacción seguido de un proceso de sacarificación y un proceso de isomerización. Durante el proceso de licuefacción, el almidón se degrada a dextrinas por una endo-amilasa, preferiblemente por una endo-amilasa con un CBM, tal como el polipéptido de la invención a valores de pH de entre 5.5 y 6.2 y a temperaturas de 95-160°C durante un periodo de aprox. 2 horas. Para asegurar una estabilidad enzimática óptima bajo estas condiciones, se añade 1 mM de calcio (40 ppm de iones de calcio libres).

Después del proceso de licuefacción las dextrinas se convierten en dextrosa por la adición de una glucoamilasa (por ejemplo, AMGTM) y una enzima desramificante, tal como una isoamilasa o una pululanasa (p. ej., PromozymeTM). Antes de esta fase el pH se reduce a un valor inferior a 4.5, manteniendo la alta temperatura (por encima de 95°C), y se desnaturaliza la actividad endo-amilasa liquefactante. La temperatura se baja a 60°C, y se agrega glucoamilasa y enzima desramificante. El proceso de sacarificación continúa durante 24-72 horas.

Después del proceso de sacarificación el pH se aumenta a un valor en el rango de pH de 6-8, preferiblemente 7.5, y el calcio se retira por intercambio iónico. El jarabe de dextrosa se convierte luego en jarabe rico en fructosa usando, por ejemplo, una glucosaisomerasa inmovilizada (tal como SweetzymeTM).

En una forma de realización de un proceso de almidón de la invención, se descompone materia prima de grano entero gelatinizada molida (hidrolizada) en maltodextrinas (dextrinas) principalmente de un DE superior a 4 usando el polipéptido del primer aspecto. La materia prima es en una forma de realización de la invención grano molido (entero).

ES 2 356 703 T3

En una forma de realización de la invención, se lleva a cabo una licuefacción enzimática como un proceso de compuesto acuoso caliente de tres pasos. El compuesto acuoso se calienta a entre 60-95°C, preferiblemente 80-85°C, y la(s) enzima(s) se añade(n) para iniciar la licuefacción (dilución), se añade al menos un polipéptido del primer aspecto. Entonces el compuesto acuoso se cuece a chorro a una temperatura entre de 95-140°C, preferiblemente 105-125°C para completar la gelatinización del compuesto acuoso. Luego el compuesto acuoso se enfría a 60-95°C y más enzima(s), preferiblemente comprendiendo el polipéptido del primer aspecto, se añade(n) para finalizar la hidrólisis (licuefacción secundaria). El proceso de licuefacción se realiza a pH 4.5-6.5, en particular a un pH entre 5 y 6. Los granos enteros molidos y licuados se conocen como masa. El polipéptido del primer aspecto se puede añadir en cantidades eficaces bien conocidas por el experto en la técnica.

En un aspecto el proceso puede comprender; a) poner en contacto un sustrato de almidón con una endo-amilasa teniendo un CBM, por ejemplo, el polipéptido del primer aspecto; b) incubar dicho sustrato de almidón con dicho polipéptido y una alfa-amilasa fúngica y/o o una glucoamilasa durante un tiempo y a una temperatura suficiente para conseguir la licuefacción y la sacarificación de al menos un 90%, o al menos un 92%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99%, al menos un 99,5% p/p de dicho sustrato de almidón en azúcares fermentables; c) fermentar hasta producir un producto de fermentación, d) opcionalmente recuperar el producto de fermentación.

En otro aspecto el proceso comprendiendo la licuefacción y/o la hidrólisis de un compuesto acuoso de almidón gelatinizado o granulado, en particular la licuefacción y/o la hidrólisis de almidón granulado en un hidrolizado de almidón soluble a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial de dicho almidón granulado. Además de haberse puesto en contacto con un polipéptido de la invención, p. ej, el polipéptido del primer aspecto, el almidón se puede poner en contacto con una enzima seleccionada del grupo que consiste en; una alfa-amilasa fúngica (EC 3.2.1.1), una beta-amilasa (E.C. 3.2.1.2), y una glucoamilasa (E.C.3.2.1.3). En una forma de realización se puede añadir además una enzima desramificante, tal como una isoamilasa (E.C. 3.2.1.68) o unas pululanases (E.C. 3.2.1.41).

En una forma de realización el proceso se lleva a cabo a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial. Preferiblemente la temperatura en la cual los procesos se llevan a cabo es al menos 30°C, al menos 31°C, al menos 32°C, al menos 33°C, al menos 34°C, al menos 35°C, al menos 36°C, al menos 37°C, al menos 38°C, al menos 39°C, al menos 40°C, al menos 41°C, al menos 42°C, al menos 43°C, al menos 44°C, al menos 45°C, al menos 46°C, al menos 47°C, al menos 48°C, al menos 49°C, al menos 50°C, al menos 51°C, al menos 52°C, al menos 53°C, al menos 54°C, al menos 55°C, al menos 56°C, al menos 57°C, al menos 58°C, al menos 59°C, o preferiblemente al menos 60°C. El pH al cual se lleva a cabo el proceso puede estar en el rango de 3.0 a 7.0, preferiblemente de 3.5 a 6.0, o más preferiblemente de 4.0-5.0. En una forma de realización preferida el proceso comprende la fermentación, p. ej con una levadura para producir etanol, por ejemplo, a una temperatura de aproximadamente 32°C, tal como de 30 a 35°C. Durante la fermentación el contenido de etanol alcanza al menos un 7%, al menos un 8%, al menos un 9%, al menos un 10% tal como al menos un 11%, al menos un 12%, al menos un 13%, al menos un 14%, al menos un 15% tal como al menos un 16% de etanol (p/p).

El compuesto acuoso de almidón a usar en cualquiera de los aspectos anteriores pueden tener un 20-55% de almidón granulado de sólidos secos, preferiblemente un 25-40% de almidón granulado de sólidos secos, más preferiblemente un 30-35% de almidón granulado de sólidos secos. Después de ponerse en contacto con la endo-amilasa teniendo un CBM, p. ej, el polipéptido del primer aspecto al menos un 85%, al menos un 86%, al menos un 87%, al menos un 88%, al menos un 89%, 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 preferiblemente al menos un 99% de los sólidos secos del almidón granulado se convierte en un hidrolizado de almidón soluble.

La endo-amilasa con un CBM, p. ej, el polipéptido del primer aspecto, se puede utilizar en un proceso para la licuefacción, la sacarificación de un almidón gelatinizado, por ejemplo, pero no limitándose a la gelatinización por cocinado a chorro. El proceso puede comprender la fermentación para producir un producto de fermentación, por ejemplo, etanol. Tal proceso para producir etanol a partir de material conteniendo almidón por fermentación comprende: (i) licuefactar dicho material conteniendo almidón con una endo-amilasa conteniendo un CBM, p. ej, el polipéptido del primer aspecto; (ii) sacarificar la masa licuada obtenida; (iii) fermentar el material obtenido en la fase (ii) en presencia de un organismo de fermentación. Opcionalmente el proceso comprende además la recuperación del etanol. La sacarificación y la fermentación se pueden realizar como una proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (proceso SSF). Durante la fermentación el contenido de etanol alcanza al menos un 7%, al menos un 8%, al menos un 9%, al menos un 10% tal como al menos un 11%, al menos un 12%, al menos un 13%, al menos un 14%, al menos un 15% tal como al menos un 16% de etanol.

El almidón a procesar en cualquiera de los procesos anteriores se puede obtener en particular a partir de tubérculos, raíces, tallos, leguminosas, cereales o grano entero. Más específicamente el almidón granulado se puede obtener a partir de granos, mazorcas, trigo, cebada, centeno, milo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, judías, plátanos o patatas. Se contemplan especialmente ambos tipos ceroso y no ceroso de maíz y cebada.

Composiciones de la invención

La invención también se refiere a una composición comprendiendo el polipéptido del primer aspecto. La composición puede comprender además una enzima seleccionada del grupo comprendido por; una alfa-amilasa fúngica (EC 3,2,1,1), una beta-amilasa (E.C. 3,2,1,2), una glucoamilasa (E.C.3,2,1,3) y unas pululanases (E.C. 3,2,1,41). La glucoamilasa puede derivar preferiblemente de una cepa de *Aspergillus* sp., tal como *Aspergillus niger*, o de una cepa de *Talaromyces* sp. y en particular derivar de *Talaromyces leycettanus* tal como la glucoamilasa descrita en la patente estadounidense n°. Re. 32.153, *Talaromyces duponti* y/o *Talaromyces thermopiles* tales como las glucoamilasas descritas en la patente estadounidense n°. 4.587.215 y más preferiblemente se deriva de *Talaromyces emersonii*. De la forma más preferible la glucoamilasa se deriva de la cepa CBS 793.97 de *Talaromyces emersonii* y/o teniendo la secuencia descrita como la SEC ID n°: 7 en WO 99/28448. Es más preferible una glucoamilasa teniendo una secuencia de aminoácidos teniendo al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% o incluso al menos un 95% de homología con la secuencia de aminoácidos mencionada. Una preparación de glucoamilasa de *Talaromyces* comercial se suministra por Novozymes A/S como Spirizyme Fuel.

También se prefieren para una composición comprendiendo el polipéptido del primer aspecto y una glucoamilasa polipéptidos teniendo actividad glucoamilasa los cuales se derivan de una cepa del género *Trametes*, preferiblemente *Trametes cingulata*. Se prefieren además polipéptidos teniendo actividad glucoamilasa y conteniendo al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% o incluso al menos un 95% de homología con los aminoácidos para los aminoácidos de polipéptido maduros del 1 al 575 de la SEC ID n°: 5 en la solicitud de patente estadounidense 60/650,612.

También se prefiere para una composición comprendiendo el polipéptido del primer aspecto y una glucoamilasa polipéptidos teniendo actividad glucoamilasa los cuales se derivan de una cepa del género *Pachykytospora*, preferiblemente *Pachykytospora papiracea*. También se prefieren los polipéptidos teniendo actividad glucoamilasa y conteniendo al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% o incluso al menos un 95% de homología con los aminoácidos para los aminoácidos de polipéptido maduros del 1 al 556 de la SEC ID n°: 2 en la solicitud de patente estadounidense 60/650.612.

La composición anteriormente descrita se puede utilizar licuefactar y/o sacarificar un almidón gelatinizado o granulado, al igual que un almidón parcialmente gelatinizado, por ejemplo en una producción de edulcorante, o un proceso de fermentación, tal como para etanol. Un almidón parcialmente gelatinizado es un almidón que se gelatiniza hasta cierto punto, es decir donde parte del almidón se ha hinchado y gelatinizado irreversiblemente y parte del almidón sigue estando presente en un estado granuloso.

La composición anteriormente descrita también puede comprender una alfa-amilasa ácida fúngica presente en una cantidad de 0,01 a 10 AFAU/g de DS, preferiblemente de 0,1 a 5 AFAU/g de DS, más preferiblemente de 0,5 a 3 AFAU/AGU, y de la forma más preferible de 0,3 a 2 AFAU/g DS. La composición se puede añadir en cualquiera de los procesos de almidón anteriormente descritos.

Producción de productos de fermentación

A partir de almidón gelatinizado: en este aspecto la presente invención se refiere a un proceso para producir un producto de fermentación, especialmente etanol, a partir de material conteniendo almidón, incluyendo el proceso una fase de licuefacción y una fase(s) de sacarificación y fermentación realizadas separada o simultáneamente. El producto de fermentación, tal como especialmente etanol, se puede recuperar opcionalmente después de la fermentación, por ejemplo, por destilación. Materias primas adecuadas con almidón se catalogan en la sección "Materiales conteniendo almidón", más adelante. Enzimas contempladas se catalogan en la sección "Enzimas", más adelante. La fermentación se realiza preferiblemente en presencia de levadura, preferiblemente una cepa de *Saccharomyces*. Organismos de fermentación adecuados se catalogan en la sección "Organismos de fermentación", más adelante.

Un proceso preferido comprende a) poner en contacto un compuesto de almidón acuoso con un polipéptido comprendiendo una primera secuencia de aminoácidos teniendo actividad alfa-amilasa y una segunda secuencia de aminoácidos comprendiendo un módulo de unión a carbohidratos, b) incubar dicho compuesto acuoso de almidón con dicho polipéptido, c) fermentar para producir un producto de fermentación, y d) opcionalmente recuperar el producto de fermentación. Preferiblemente el paso b) se realiza durante un tiempo y a una temperatura suficiente para conseguir la conversión de al menos un 90% p/p de dicho sustrato de almidón en azúcares fermentables. Preferiblemente la primera secuencia de aminoácidos y/o la segunda secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido se deriva de una bacteria. Dicho polipéptido puede ser preferiblemente el híbrido del primer aspecto.

El compuesto acuoso puede contener un 10-40% en peso, preferiblemente un 25-35% en peso de material conteniendo almidón. El compuesto acuoso se calienta a una temperatura mayor a la de gelatinización y se puede añadir alfa-amilasa fúngica bacteriana y/o ácida para iniciar la licuefacción (dilución). En una forma de realización el compuesto acuoso se puede cocinar a chorro para gelatinizar aún más el compuesto acuoso antes de someterse a una alfa-amilasa en la fase (a) de la invención.

Más específicamente la licuefacción se puede realizar como un proceso de compuesto acuoso caliente de tres fases. El compuesto acuoso se calienta a entre 60-95°C, preferiblemente 80-85°C, y se añade alfa-amilasa para iniciar la licuefacción (dilución). Después el compuesto acuoso se puede cocer a chorro a una temperatura de entre 95-140°C, preferiblemente 105-125°C, durante 1-15 minutos, preferiblemente durante 3-10 minutos, especialmente alrededor de 5 minutos. El compuesto acuoso se enfría a 60-95°C y se añade más alfa-amilasa para finalizar la hidrólisis (licuefacción secundaria). El proceso de licuefacción se realiza normalmente a pH 4.5-6.5, en particular a un pH entre 5 y 6. Los granos enteros molidos y licuados se conocen como puré.

La sacarificación en la fase se puede realizar usando condiciones bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, un proceso de sacarificación completo puede durar hasta de aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas, no obstante, es común hacer solamente una pre-sacarificación de típicamente 40-90 minutos a una temperatura de entre 30-65°C, normalmente de aproximadamente 60°C, seguida de la sacarificación completa durante la fermentación en un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). La sacarificación se realiza normalmente a temperaturas de 30-65°C, normalmente alrededor de 60°C, y a un pH de entre 4 y 5, normalmente a aproximadamente pH 4.5.

El proceso más extensamente usado en la producción de etanol es el proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF), en el cual no hay ninguna fase de retención para la sacarificación, significando que los organismos de fermentación, tales como levadura, y enzima(s) se pueden juntos. Al realizar el SSF es común introducir una fase de pre-sacarificación a una temperatura mayor de 50°C, justo antes de la fermentación.

Conforme a la presente invención la fase de fermentación (c) incluye, sin limitación, procesos de fermentación usados para producir alcoholes (p. ej., etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (p. ej., ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (p. ej., acetona); aminoácidos (p. ej., ácido glutámico); gases (p. ej., H₂ y CO₂); antibióticos (p. ej., penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (p. ej., riboflavina, B12, betacaroteno); y hormonas. Procesos de fermentación preferidos incluyen procesos de fermentación alcohólicos, como se conocen en la técnica. Son procesos de fermentación preferidos los procesos de fermentación anaeróbicos, como se conocen bien en la técnica.

A partir de almidón no gelatinizado: en esta forma de realización la invención se refiere a procesos para producir un producto de fermentación a partir de material conteniendo almidón sin la gelatinización del material conteniendo almidón. En una forma de realización se usa un polipéptido de la invención, por ejemplo la enzima híbrida del primer aspecto, y opcionalmente una glucoamilasa durante la sacarificación y la fermentación. Según la invención el producto de fermentación deseado, tal como etanol, se puede producir sin licuefactar el compuesto acuoso conteniendo el material con almidón. En una forma de realización un proceso de la invención incluye sacarificar material conteniendo almidón molido por debajo de la temperatura de gelatinización inicial en presencia de la enzima híbrida del primer aspecto y una glucoamilasa para producir azúcares que se pueden fermentar en el producto de fermentación deseado mediante un organismo de fermentación adecuado.

Un proceso preferido comprende a) poner en contacto un compuesto acuoso de almidón granulado acuoso con un polipéptido comprendiendo una primera secuencia de aminoácidos teniendo actividad alfa-amilasa y una segunda secuencia de aminoácidos comprendiendo un módulo de unión a carbohidratos, b) incubar dicho compuesto acuoso de almidón con dicho polipéptido, c) fermentar para producir un producto de fermentación, y d) opcionalmente recuperar el producto de fermentación. Preferiblemente la fase b) se realiza durante un tiempo y a una temperatura suficientes para conseguir la conversión de al menos un 90% p/p de dicho sustrato de almidón en azúcares fermentables. Preferiblemente la primera secuencia de aminoácidos y/o la segunda secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido se deriva de una bacteria. Dicho polipéptido puede ser preferiblemente el híbrido del primer aspecto.

El término "temperatura de gelatinización inicial" significa la temperatura mínima a la cual comienza la gelatinización del almidón. El almidón calentado en agua comienza a gelatinizarse a entre 50°C y 75°C; la temperatura exacta de gelatinización depende del almidón específico, y puede ser fácilmente determinada por el experto en la técnica. Así, la temperatura de gelatinización inicial puede variar según la especie de la planta, la variedad particular de la especie de planta al igual que con las condiciones de crecimiento. En el contexto de esta invención la temperatura de gelatinización inicial de un material conteniendo almidón dado es la temperatura a la cual la birrefringencia se pierde en un 5% de los gránulos de almidón usando el método descrito por Gorinstein. S. y Lii. C., Starch/Stärke, Vol. 44 (12) págs. 461-466 (1992).

Antes de la fase (a) se puede preparar un compuesto acuoso de material con almidón, tal como almidón granulado, teniendo un 20-55% en peso de sólidos secos, preferiblemente un 25-40% en peso de sólidos secos, más preferiblemente un 30-35% de sólidos secos de material con almidón. El compuesto acuoso puede incluir agua y/o aguas de proceso, tales como aguas residuales (volúmenes anteriores), agua del lavador, condensada o destilada del evaporador, agua de destilación de la depuradora lateral, u otro agua del proceso del producto de fermentación vegetal. Debido a que el proceso de la invención se realiza por debajo de la temperatura de gelatinización y por tanto no tiene lugar un aumento de viscosidad significativa, se pueden usar altos niveles de aguas residuales si se desea. En una forma de realización el compuesto acuoso contiene de aproximadamente un 1 a aproximadamente un 70% en volumen de aguas residuales, preferiblemente un 15-60% en volumen de aguas residuales, especialmente de aproximadamente un 30 a un 50% en volumen de aguas residuales.

ES 2 356 703 T3

El material molido conteniendo almidón se puede preparar moliendo material conteniendo almidón hasta conseguir un tamaño de partícula de 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente de 0,1-0,5 mm. Después de haberse sometido a un proceso de la invención al menos un 85%, al menos un 86%, al menos un 87%, al menos un 88%, al menos un 89%, 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 preferiblemente al menos un 99% de los sólidos secos del material conteniendo almidón se convierte en un hidrolizado de almidón soluble.

El proceso de la invención se lleva a cabo a una temperatura inferior a la temperatura de gelatinización inicial. Preferiblemente la temperatura a la cual la fase (a) se realiza es de entre 30-75°C, preferiblemente de entre 45-60°C.

En una forma de realización preferida la fase (a) y la fase (b) se realizan como un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas. En tal forma de realización preferida el proceso se lleva a cabo normalmente a una temperatura de entre 28°C y 36°C, tal como a entre 29°C y 35°C, tal como a entre 30°C y 34°C, tal como alrededor de 32°C. Según la invención la temperatura se puede aumentar o disminuir durante la fermentación.

En una forma de realización la sacarificación y fermentación simultáneas se llevan a cabo de modo que el nivel de azúcar, así como el nivel de glucosa, se mantiene a un nivel bajo tal como por debajo de aproximadamente un 3% en peso, preferiblemente por debajo de aproximadamente un 2% en peso, más preferiblemente por debajo de aproximadamente un 1% en peso, incluso más preferiblemente por debajo de aproximadamente un 0,5%, o incluso más preferiblemente por debajo de aproximadamente un 0,1% en peso. Tales niveles bajos de azúcar se pueden conseguir simplemente utilizando cantidades de enzima y organismo de fermentación ajustadas. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente qué cantidades de enzima y organismo de fermentación se deben emplear. Las cantidades empleadas de enzima y organismo de fermentación también se pueden seleccionar para mantener concentraciones bajas de maltosa en el caldo de fermentación. Por ejemplo, el nivel de maltosa puede mantenerse por debajo de aproximadamente un 0,5% en peso o por debajo de aproximadamente un 0,2% en peso.

El proceso de la invención se puede llevar a cabo a un pH en el rango de entre 3 y 7, preferiblemente de 3,5 a 6, o más preferiblemente de 4 a 5.

Materiales conteniendo almidón

Cualquier materia prima adecuada conteniendo almidón, incluyendo almidón granulado, se puede utilizar según la presente invención. La materia prima se selecciona generalmente en base al producto de fermentación deseado. Ejemplos de materias primas conteniendo almidón, adecuadas para el uso en un proceso de la presente invención, incluyen tubérculos, raíces, tallos, granos enteros, granos, mazorcas, trigo, cebada, centeno, mijo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, guisantes de arroz, alubias, o cereales, materias primas conteniendo azúcares, tales como melaza, materias de fruta, azúcar, bastonera o remolacha azucarera, patatas, y materias conteniendo celulosa, tales como madera o residuos vegetales. Se contemplan ambos tipos no cerosos y cerosos de maíz y cebada.

El término “almidón granulado” significa almidón crudo no cocido, es decir, almidón en su forma natural encontrada en cereales, tubérculos o granos. El almidón se forma dentro de células vegetales como gránulos ínfimos insolubles en agua. Al ponerlo en agua fría, los gránulos de almidón pueden absorber una pequeña cantidad del líquido e hincharse. A temperaturas de hasta 50°C a 75°C el hinchamiento puede ser reversible. No obstante, a temperaturas más altas comienza un hinchamiento irreversible llamado “gelatinización”. El almidón granulado a procesar puede ser un almidón de calidad altamente refinada, preferiblemente de al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 97% o al menos un 99,5% puro o éste puede ser un almidón más crudo conteniendo material comprendiendo grano entero molido incluyendo fracciones no amiláceas tales como residuos de germen y fibras. La materia prima, tal como grano entero, se muele para descubrir la estructura y permitir un tratamiento posterior. Se prefieren dos procesos de molienda según la invención: molienda húmeda y seca. En la molienda seca se muelen y se usan granos enteros. La molienda húmeda ofrece una buena separación de germen y harina (gránulos de almidón y proteína) y se aplica frecuentemente en lugares donde el hidrolizado de almidón se usa en la producción de jarabes. Ambas moliendas seca y húmeda son bien conocidas en la técnica del tratamiento de almidón y se contemplan igualmente para el proceso de la invención.

El material con almidón se muele para exponer más área de superficie. En una forma de realización el tamaño de partícula es de entre 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente de 0,1-0,5 mm, o de modo que al menos un 30%, preferiblemente al menos un 50%, más preferiblemente al menos un 70%, incluso más preferiblemente al menos un 90% del material molido conteniendo almidón pase a través de una criba con una malla de criba de 0,05 a 3,0 mm, preferiblemente una malla de 0,1-0,5 mm.

Producto de fermentación

El término “producto de fermentación” significa un producto producido mediante un proceso incluyendo una fase de fermentación usando un organismo de fermentación. Productos de fermentación contemplados según la invención incluyen alcoholes (p. ej., etanol, metanol, butanol); ácidos orgánicos (p. ej., ácido cítrico, ácido acético, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico); cetonas (p. ej., acetona); aminoácidos (p. ej., ácido glutámico); gases (p. ej., H₂ y CO₂); antibióticos (p. ej., penicilina y tetraciclina); enzimas; vitaminas (p. ej., riboflavina, B12, betacaroteno); y hor-

ES 2 356 703 T3

monas. En una forma de realización preferida el producto de fermentación es etanol, por ejemplo, etanol combustible; etanol potable, es decir, licores neutrales potables; o etanol industrial o productos usados en la industria alcohólica de consumo (p. ej., cerveza y vino), industria lechera (p. ej., productos lácteos fermentados), industria de cuero e industria de tabaco. Los tipos de cerveza preferidos comprenden las cervezas Ale, Stout, Porter, Lager, Bitter, soluciones de malta, Happoushu, cerveza con un alto porcentaje de alcohol, cerveza con un bajo porcentaje de alcohol, cerveza con un bajo nivel de calorías o cerveza light. Procesos de fermentación preferidos usados incluyen procesos de fermentación alcohólicos, como se conocen en la técnica. procesos de fermentación preferidos son procesos de fermentación anaeróbicos, como se conocen bien en la técnica.

Organismos de fermentación

Con “organismo de fermentación” se hace referencia a cualquier organismo, incluyendo organismos fúngicos y bacterianos, adecuados para el uso en un proceso de fermentación y capaces de producir un producto de fermentación deseado. Organismos de fermentación especialmente adecuados son capaces de fermentar, es decir, convertir azúcares, tales como glucosa o maltosa, directa o indirectamente en el producto de fermentación deseado. Ejemplos de organismos de fermentación incluyen organismos fúngicos, tales como levadura. La levadura preferida incluye cepas de *Saccharomyces* spp., en particular, *Saccharomyces cerevisiae*.

En una forma de realización preferida el organismo de fermentación, por ejemplo la levadura, se puede transformar con el polipéptido del primer aspecto y aplicar en un proceso comprendiendo; a) poner en contacto un sustrato de almidón con una célula de organismo de fermentación transformada para expresar un polipéptido comprendiendo una primera secuencia de aminoácidos teniendo actividad alfa-amilasa y una segunda secuencia de aminoácidos comprendiendo un módulo de unión a carbohidratos; b) retener dicho sustrato de almidón con dicha levadura durante un tiempo y a una temperatura suficientes para conseguir la conversión de al menos un 90% p/p de dicho sustrato de almidón en azúcares fermentables; c) fermentar para producir un producto de fermentación, por ejemplo, etanol, d) opcionalmente recuperar el producto de fermentación, por ejemplo, etanol. Los pasos a, b, y c se realizan separadamente o simultáneamente. En una forma de realización preferida la primera secuencia de aminoácidos y/o la segunda secuencia de aminoácidos de dicho polipéptido se derivan de una bacteria.

Materiales y métodos

Actividad amilolítica KNU: La actividad amilolítica se puede determinar usando almidón de patata como sustrato. Este método se basa en la descomposición de almidón de patata modificado por la enzima, y la reacción se continúa mezclando 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 torna más débil y gradualmente se transforma en un marrón rojizo, el cual se compara con un estándar de vidrio coloreado.

Una unidad de Alfa-amilasa Kilo Novo (KNU) se define como la cantidad de enzima que, bajo condiciones estándar (es decir, a 37°C +/- 0,05, 0,0003 m Ca²⁺; y a pH 5.6) dextriniza 5,26 g de sustancia seca de almidón Merck Amylum solubile. Una carpeta AF 9/6 describiendo este método analítico en más detalle está disponible bajo pedido a Novozymes A/S, Dinamarca, cuya carpeta se incluye por la presente por referencia.

Ensayo de endo actividad: La actividad de endo-amilasa se puede determinar usando el ensayo de endo actividad. 1 ml de sustrato de Phadebas resuspendido (0,25 comprimidos/ml 50 mM de acetato sódico, 1 mM de CaCl₂, ajustado a pH 5.7) se incuba con 25 microL de enzima durante 15 min a 40°C con agitación. La reacción se detiene por adición de 0,5 ml de 1 m de NaOH y la mezcla se centrifuga en un centrifugador de tabla a 14,000 r.p.m. Se mide la absorbancia del sobrenadante a 620 nm. La actividad se determina comparando un estándar con actividad declarada (BAN 480 L, 480 KNU/g).

Actividad amilasa maltogénica: una MANU (Unidad de amilasa maltogénica Novo) se puede definir como la cantidad de enzima requerida para liberar un micromol de maltosa por minuto en una concentración de 10 mg de sustrato de maltotriosa (Sigma M 8378) por ml de 0,1 m de tampón de citrato, a pH 5.0 a 37°C durante 30 minutos (la unidad MANU también se define en US Pat. n°. 6.162.628, la cual se incorpora por la presente por referencia).

Manipulaciones de ADN

A menos que se declare de otra manera, las manipulaciones y transformaciones de ADN se realizaron usando métodos estándar de biología molecular como se describe en Sambrook *et al.* (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor lab. Cold Spring Harbor, NY; Ausubel, F. M. *et al.* (eds.) “Current protocols in Molecular Biology”, John Wiley and Sons, 1995; Harwood, C. R. y Cutting, S. M. (eds.).

ES 2 356 703 T3

Ejemplo 1

Construcción de híbridos entre una endo-amilasa y el CBM a partir de AMY1048

5 La amilasa AMY1048 es un amilasa de *Bacillus* de tipo salvaje de un fragmento catalítico de 484 aminoácidos y además un fragmento CBM20 de 101 aminoácidos. La secuencia de ADN codificando la AMY1048 se incluye como la SEC ID NO: 1 y la secuencia AMY1048 madura se incluye como la SEC ID NO: 2. En la SEC ID NO: 1 el CBM se define como los residuos de aminoácidos del 485 al 586 los cuales corresponden a los nucleótidos 1540-1845 en la SEC ID NO: 2. La amilasa incluyendo el CBM se puede expresar de una construcción similar a la cual se ha
10 descrito para otras amilasas, es decir, por ejemplo, insertada en un vector bajo el control de un promotor constitutivo activo y flanqueada por la secuencia señal (SEC ID NO: 15) y la secuencia del terminador de la endo-amilasa de *B. licheniformis*.

15 La sustitución del fragmento catalítico de la endo-amilasa AMY1048 con un dominio catalítico de otra endo-amilasa, creando así un híbrido del CBM a partir de AMY1048 y una endo-amilasa nueva, se hace amplificando el fragmento de ADN codificando el dominio catalítico de la amilasa nueva por PCR usando dos oligonucleótidos. El oligonucleótido sentido es en su extremidad 5' idéntico a los últimos 20 nucleótidos de la secuencia de ADN codificando la secuencia señal previa a la secuencia madura AMY1048 y además en ello es extremidad 3' es idéntica al primero 20 nucleótidos de secuencia de ADN codificando la parte madura del ADN de amilasa deseado. Los
20 oligonucleótidos antisentido son en su extremidad 5' idénticos al ADN antisentido de los primeros 20 nucleótidos de la secuencia de ADN codificando el CBM de AMY1048 y además en su extremidad 3' es idéntica al antisentido de los últimos 20 nucleótidos de la secuencia de ADN codificando la parte madura del ADN de amilasa deseado.

25 Tanto el ADN de amilasa amplificado como el vector huésped en la amilasa AMY1048, se digiere con *SacII* y *ScaI* y el vector y fragmentos de la PCR ligados antes de la transferencia en la cepa SHA273 de *Bacillus subtilis*. En las secuencias de cebador de debajo los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción se indican mediante subrayado.

30 Para construir un híbrido de la endo-amilasa de *B. licheniformis* (SEC ID NO: 35) y el CBM20 de la amilasa de *B. flavotermus* los siguientes oligonucleótidos fueron usados por los presentes inventores:

Sentido: 5'-ctcattctgcagccgcggcagcaaatcttaatgggacgct-3' (P1s SEC ID NO: 19).

35 Antisentido: 5'-atttggaagtagtactattctttgaacataaattgaaa-3' (P1as SEC ID NO: 20).

40 La secuencia de ADN resultante codificando el polipéptido maduro y la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro se incluyen como SEC ID NO: 3 y SEC ID NO: 4, respectivamente

Para construir un híbrido de la variante LE429 de la endo-amilasa de *B. licheniformis* (SEC ID NO: 41) y el CBM20 de la amilasa de *B. flavotermus* se usaron los siguientes oligonucleótidos:

45 Sentido: 5'-ctcattctgcagccgcggcagtaaatggcagctgatgca-3' (P2s SEC ID NO: 21).

Antisentido: 5'-atttggaagtagtactatttttgaacataaattgaaa-3' (P2as SEC ID NO: 22).

50

La secuencia de ADN resultante codificando el polipéptido maduro y la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro se incluyen como SEC ID NO: 5 y SEC ID NO: 6, respectivamente

55 Para construir un híbrido de la endo-amilasa de *B. stearothermophilus* (SEC ID NO: 36) y el CBM20 de la amilasa de *B. flavotermus* se usaron los siguientes oligonucleótidos:

60 Sentido: 5'-ctcattctgcagccgcggcagcaccgtttaacggcttta-3' (P3s SEC ID NO: 23).

Antisentido: 5'-atttggaagtagtactatttttaggaacccaaccgaaa-3' (P3as SEC ID NO: 24)

65 La secuencia de ADN resultante codificando el polipéptido maduro y la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro se incluyen como SEC ID NO: 7 y SEC ID NO: 8, respectivamente

ES 2 356 703 T3

Para construir un híbrido de una variante de la endo-amilasa de sp. SP722 de *Bacillus alcalina* (SEC ID NO: 38) y el CBM20 de la amilasa de *B. flavotermus* se usaron los siguientes oligonucleótidos:

5 Sentido: 5'-ctcattctgcagccgcggcacatcataatgggacaaatgg-3' (P4s SEC ID NO: 25).

Antisentido: 5'-atttgggaagtaatacttatccattgtccattatgatg-3' (P4as SEC ID NO: 26).

10 La secuencia de ADN resultante codificando el polipéptido maduro y la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro se incluyen como SEC ID NO: 9 y SEC ID NO: 10, respectivamente.

15 Para construir un híbrido de una variante de la endo-amilasa de la especie AA560 de *Bacillus alcalina* (SEC ID NO: 40) y el CBM20 de la amilasa de *B. flavotermus* se usaron los siguientes oligonucleótidos:

Sentido: 5'-ctcattctgcagccgcggcacaccataatggtacgaacgg-3' (P5s SEC ID NO: 27)

20 Antisentido: 5'-atttgggaagtagtactattttgttaccacaaatagaaa-3' (P5as SEC ID NO: 28).

25 La secuencia de ADN resultante codificando el polipéptido maduro y la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro se incluyen como SEC ID NO: 11 y SEC ID NO: 12, respectivamente.

Para construir un híbrido de una variante de la endo-amilasa de *Bacillus amiloliquefaciens* (SEC ID NO: 37) y el CBM20 de *B. flavotermus* amilasa se usaron los siguientes oligonucleótidos:

30 Sentido: 5'-ctcattctgcagccgcggcagtaaatggcagcctgatgca-3' (P6s SEC ID NO: 29)

Antisentido: 5'-atttgggaagtagtactatttttgaacataaatggaga-3' (P6as SEC ID NO: 30)

35 La secuencia de ADN resultante codificando el polipéptido maduro y la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro se incluyen como SEC ID NO: 13 y SEC ID NO: 14, respectivamente.

40 Las enzimas híbridas descritas anteriormente se expresaron por *B. subtilis* cultivada en frascos de agitación durante 72 horas y segregada en el sobrenadante. La presencia de enzima híbrida en el sobrenadante se demostró mediante SDS-PAGE.

45 Ejemplo 2

Construcción de una amilasa híbrida con dominio de enlace a carbohidratos

50 El fragmento catalítico de la endo-amilasa de *B. flavotermus*, AMY1048 se puede dividir en el dominio AB central conteniendo el centro catalítico y un dominio C c-terminal al dominio catalítico pero anterior al CBM. En la SEC ID NO: 2 el dominio de núcleo catalítico consiste en los primeros 397 residuos de aminoácidos, el dominio C se define como los residuos de aminoácidos del 398 al 484 y el CBM se define como los residuos de aminoácidos del 485 al 586. En la SEC ID NO: 1 la secuencia señal se codifica por los nucleótidos 1 a 87, el dominio de núcleo catalítico se codifica por los nucleótidos 88-1278, el dominio C se codifica por los nucleótidos 1279-1539, y el CBM se codifica por los nucleótidos 1540-1845.

60 La amilasa incluyendo el CBM se puede expresar a partir de una construcción de vector similar a la que se ha descrito en WO0060060A2 en el ejemplo 4, es decir el gen de amilasa se inserta en un vector bajo el control de un promotor de amilasa y flanqueado por la secuencia señal y la secuencia del terminador de la endo-amilasa de *B. licheniformis*.

65 Como una alternativa a contener el gen en un plásmido, el casete incluyendo la codificación de secuencia de ADN para el marcador antibiótico, promotor, secuencia señal, la proteína madura y el terminador se puede integrar en el genoma del *B. subtilis* por cruce homólogo *in vivo*, por ADN genómico flanqueado corriente arriba y corriente abajo con una alta similitud a una parte no esencial del ADN de *B. subtilis*. Regiones de ADN útiles podrían ser la pectato liasa o la endo-amilasa loci. En este ejemplo la AMY1048 y el híbrido se insertan en los la amilasa loci en dirección opuesta en relación a la amilasa de *B. subtilis* original.

ES 2 356 703 T3

El dominio de núcleo catalítico de la endo-amilasa AMY1048 se sustituyó por un dominio de núcleo catalítico de la endo-amilasa de *Bacillus starothermophilus* (BSG), creando así un híbrido del dominio C y el CBM de AMY1048 y el dominio de núcleo catalítico de la endo-amilasa nueva.

5 El fragmento de ADN codificando el núcleo catalítico de la amilasa de *B. stearothermophilus* (SEC ID NO: 36) se amplificó por PCR usando dos oligonucleótidos. Los oligonucleótidos sentido eran en su extremidad 5' idénticos a los últimos 20 nucleótidos de la secuencia de ADN (SEC ID NO: 15) codificando la secuencia señal previa a la secuencia madura de AMY1048 (SEC ID NO: 1) y también en su extremidad 3' idénticos a los primeros 20 nucleótidos de la secuencia de ADN codificando la parte madura del ADN de amilasa deseado. Los oligonucleótidos antisentido eran en su extremidad 5' idénticos al ADN antisentido de los primeros 20 nucleótidos de la secuencia de ADN codificando el dominio C de AMY1048 y además en su extremidad 3' eran idénticos al antisentido de los últimos 20 nucleótidos de la secuencia de ADN codificando el núcleo catalítico del ADN de amilasa BSG.

15 Para construir un híbrido del dominio de núcleo de la endo-amilasa de *B. stearothermophilus* y el dominio C y el CBM20 de la amilasa de *B. flavotermus* los siguientes oligonucleótidos fueron usados por los presentes inventores:

Sentido: 5'-ctcattctgcagccgcggcagcaccgtttaacggctttaa-3' (P7s SEC ID NO: 31).

20 Antisentido: 5'-atatagtcgtgctgtgttcgtaagcataatccctgcgcg7-3' (P7as SEC ID NO: 32).

25 Para facilitar la integración de genoma, un fragmento de 5 kb corriente arriba de la secuencia señal y en la secuencia del genoma de la amilasa se hace por PCR usando la construcción genómica de AMY1048 como patrón, y el cebador inverso del cebador antisentido y el cebador específico del genoma: 5'-ctgcatcagggtcgcggcatcc-3' (P8 SEC ID NO: 33).

30 Otro fragmento de la terminación del gen y corriente arriba de la amilasa de *B. subtilis* genómica se hace por PCR usando la construcción genómica de AMY1048 como patrón, y el cebador inverso del cebador sentido y el cebador específico del genoma: 5'-ctgcatcagggtcgcggcatcc-3'; (P9 SEC ID NO: 34).

35 Tomando ventajas del recubrimiento de 40 par de bases, los tres fragmentos de la PCR se ensamblaron por PCR y el producto resultante se amplificó en otra PCR usando los cebadores específicos del genoma, antes de transferirlos a la cepa SHA273 de *Bacillus subtilis* (descrita en WO92/11357 y WO95/10603).

La secuencia de ADN resultante codificando el polipéptido maduro y el polipéptido maduro se incluyen como SEC ID NO: 17 y SEC ID NO: 18, respectivamente.

40 La enzima híbrida se expresó cultivando *B. subtilis* en medios PS1 en frascos de agitación durante 72 horas a 37°C y segregados en el sobrenadante. La presencia de enzima híbrida en el sobrenadante se demostró mediante SDS-PAGE.

45 Ejemplo 3

Determinación del Factor de mejora de Exo-Endo (EIF)

50 EIF es la medida de un incremento de la proporción exo/endo en relación a una enzima parental, es decir EIF = (exo/endo de variante)/(exo/endo de enzima parental). Una enzima tiene un aumento en la proporción exo/endo en comparación con su enzima parental si EIF > 1. EIF se puede basar en uno de los siguientes métodos.

55 *Ensayo de Endo actividad EIF1:* El Test de amilasa de Phadebas (Pharmacia Diagnostics) se lleva a cabo según las recomendaciones de los proveedores y las unidades endo calculadas a partir de la fórmula proporcionada donde el logaritmo natural para la actividad equivale a N, donde $N = A + \text{raíz cuadrada}[B + C * \ln(\text{Abs})]$. Abs es la absorbancia a 620 nm, A = -13.3235, B = 243.3293, y C = 26.73797.

60 *Ensayo de Exo actividad:* 50 microL de 50 mM de citrato sódico, 5 mM de CaCl₂, a pH 6.5 se mezclan con 25 microL de enzima en el mismo tampón y 25 microL de sustrato de Betamyl (Método Betamyl, Megazyme) se disuelven según las recomendaciones de proveedores. La mezcla del ensayo se incuba durante 30 min. a 40°C y la reacción se detiene añadiendo 150 microL de un 4% (p/p) de base Trizma (Tris(hidroximetil)-aminometano). La actividad se expresa directamente como la absorbancia a 420 nm medido usando un lector de placa de microtitulación.

65 *Ensayo de Endo actividad EIF2:* 1 mL de sustrato de Phadebas resuspendido (Pharmacia Diagnostics) (0,25 comprimidos/ml de 50 mM de acetato de sodio, 1 mM de CaCl₂, ajustado a pH 5.7) se incuba con 25 microL de enzima durante 15 min a 40°C con agitación. La reacción se detiene por adición de 0,25 ml de 1 M de NaOH y la mezcla se centrifuga en un centrifugador de tabla a 14,000 r.p.m. Se mide la absorbancia del sobrenadante a 620 nm. La actividad se determina comparando con un estándar la actividad declarada (BAN 480 L, 480 KNU/g).

ES 2 356 703 T3

Ensayo de Exo actividad: 900 microL de un 3,3% de almidón de maíz céreo solubilizado (3,3% de almidón se hierva en 50 mM de acetato sódico, 1 mM de CaCl₂, a pH 5.7 durante 5 min y se enfría a 40°C) se incuban con 100 microL de enzima a 40°C con agitación. Después del tiempo de reacción apropiado el almidón restante se precipita por adición de 450 microL a 4°C con un 96% de etanol. El precipitado se retira inmediatamente por centrifugado a 3000 G durante 20 min. El carbohidrato total en el sobrenadante se determina mezclando 200 microL de sobrenadante con 50 microL de un 2% de triptófano y 900 microL de un 64% de ácido sulfúrico. La mezcla se calienta durante 15 min a 95°C y la absorbancia a 630 nm se mide tras el enfriamiento a temperatura ambiente. La actividad se determina comparando con la absorbancia de estándares de glucosa en el mismo ensayo. Una unidad se define como la cantidad de enzima que a índices iniciales libera 1 mg de productos oligoméricos (productos que no se precipitan mediante etanol) por min.

Ejemplo 4

Licuefacción y sacarificación con una endo-amilasa con un CBM

Este ejemplo ilustra la conversión de almidón de trigo granuloso en glucosa usando una endo-amilasa bacteriana con un CBM (SEC ID NO: 4) o la misma endo-amilasa bacteriana sin CBM (SEC ID NO: 35) junto con una glucoamilasa y una amilasa ácida fúngica. Un compuesto acuoso con un 33% de sólidos secos (DS) de almidón granulado se preparó añadiendo 247,5 g de almidón de trigo bajo agitación a 502,5 ml de agua. El pH se ajustó con HCl a 4.5. El compuesto acuoso de almidón granuloso se distribuyó en matraces Erlenmeyer de 100 ml con 75 g en cada matraz. Los matraces se incubaron con agitación magnética en un baño maría a 60°C. En la hora cero las actividades enzimáticas dadas en la tabla 1 se dosificaron en los matraces. Las muestras se retiraron después de 24, 48 y 73 y 94 horas. Los niveles enzimáticos usados fueron endo-amilasa +/-CBM 100 KNU/kg de DS, glucoamilasa 200 AGU/kg de DS, alfa-amilasa fúngica ácida 50 AFAU/g de DS.

El almidón de sólidos secos total se determinó usando el siguiente método. El almidón se hidrolizó completamente añadiendo una cantidad excesiva de endo-amilasa (300 KNU/kg de sólidos secos) y colocando la muestra en un baño de aceite a 95°C durante 45 minutos. Posteriormente las muestras se enfriaron a 60°C y se añadió una cantidad excesiva de glucoamilasa (600 AGU/kg de DS) seguida de una incubación durante 2 horas a 60°C.

Los sólidos secos solubles en el hidrolizado de almidón se determinaron midiendo el índice de refracción en muestras después del filtrado a través de un filtro de 0,22 microM. El perfil de azúcar se determinó por HPLC. La cantidad de glucosa se calculó como DX. Los resultados se muestran en las tablas 2 y 3.

TABLA 2

Sólidos secos solubles como porcentaje de sustancia seca total a una dosis de endo-amilasa de 100 KNU/kg de DS

Enzima	24 horas	48 horas	73 horas	94 horas
Endo-amilasa	83,7	87	89,7	90,3
Endo-amilasa+CBM	87,2	89,7	91,5	92,3

TABLA 3

El DX del hidrolizado soluble a una dosis de de endo-amilasa de 100 KNU/kg de DS

Enzima	24 horas	48 horas	73 horas	94 horas
Endo-amilasa	72,0	82,0	83,8	83,8
Endo-amilasa+CBM	76,7	87,0	87,5	87,5

ES 2 356 703 T3

Ejemplo 5

Dosificación eficaz

5 La “dosis efectiva” de la amilasa en cuestión se define como la dosis dando como resultado una reducción en la solidez superior a un 10%, por ejemplo, de entre un 10 y un 20%, en comparación con la solidez de un pan sin enzimas (el control). La reducción en la solidez se mide después del almacenamiento durante 14 días en atmósfera inerte a temperatura ambiente.

10 La tolerancia a la sobredosificación se mide usando la Proporción de pérdida de elasticidad = ELR. ELR se mide el día 1 después la cocción o más tarde, tal como el día 5, día 10 o como en el ejemplo de debajo después de 14 días de almacenamiento y se define entonces de la siguiente manera:

15
$$\text{ELR \%} = (\text{Elasticidad}_{\text{control día 14}} - \text{Elasticidad}_{\text{amilasa día 14}} \times 100) / \text{Elasticidad}_{\text{control día 14}}$$

En combinación con 450 MANU/kg de harina Novamyl® la tolerancia a la sobredosificación se mide:

20
$$\text{ELR}_N \% = (\text{Elasticidad}_{\text{Novamyl día 14}} - \text{Elasticidad}_{\text{Novamyl+amilasa día 14}} \times 100) / \text{Elasticidad}_{\text{Novamyl día 14}}$$

Si la amilasa se sobredosifica el ELR y/o ELR_N será > 5%.

25 *Proceso de cocción*

El pan se hornea según el método de esponja & masa.

Esponja, ingredientes en % en base de harina

30

Aceite de soja	2,5
SSL	0,38
35 Levadura	5
Harina de trigo	60
Agua	62

40

Masa, ingredientes en % en base de harina

45

Ácido ascórbico	a optimizarse para cada harina
ADA	20 ppm
Sal	2
Almíbar	7 (sustancia seca)
50 Agua	a optimizarse para cada harina
Harina de trigo	40
55 Calcio propionato+ enzimas	0,25

Los ingredientes de esponja levadura, agua, harina, SSL y aceite se mezclan a 90 r.p.m. durante 1 minuto, 150 r.p.m. durante 4 minutos.

60 La esponja se fija para fermentación durante 3 horas a 27°C y un 86% de RH.

La esponja se añade a los ingredientes de masa y se mezclan hasta obtener una masa a 90 r.p.m. durante 1 minuto y a 150 r.p.m. durante 14 minutos. La masa se corta en pedazos de 340 g cada uno y se deja reposar durante 10 minutos.

65 Las porciones de masa se colocan en láminas y se moldean seguidamente de una fermentación durante 55 minutos a 42°C y un 86% de RH. las masas se hornean a 225°C durante 15 minutos. El pan horneado se enfría y almacena hasta el análisis.

ES 2 356 703 T3

El pan se hornea con el enzima CBM-híbrida y con la enzima correspondiente sin un CBM. La dosis efectiva se determina con y sin adición de Novamyl® a 450 MANU/kg de harina. La solidez y la elasticidad de un pan se miden con el analizador de textura TA.XT2 según el método AACC 74-09.

- 5 Se determina la dosificación eficaz de la enzima CBM-híbrida y un conjunto nuevo de pan se hornea con 3 y 5 veces la dosificación eficaz con y sin adición de Novamyl® a 450 MANU/kg de harina.

- 10 El ELR se mide después de 14 días de almacenamiento, y se ha descubierto que el ELR al igual que el ELRN es inferior al 5% para la amilasa con CBM dosificado 5 veces la dosificación eficaz mientras que es más del 5% para las enzimas correspondientes sin la adición del CBM dosificado 3 veces la dosis efectiva.

Ejemplo 6

- 15 *Determinación de ELR para las variantes seleccionadas*

El ejemplo 6 se realizó como se describe en el ejemplo 5 excepto porque se usó una dosificación de 500 MANU/kg de harina.

- 20 Se usaron dos variantes de un híbrido comprendiendo la endo-amilasa de la especie AA560 alcalina de Bacillus (SEX ID NO: 40) y el CBM20 de la amilasa de *B. flavotermus* (residuos 485 a 586 en la SEC ID NO: 2): La variante BE1 comprendiendo las alteraciones siguientes en la secuencia de amilasa: R118K, D183*, G184*, N195F, R320K, R458K, N33S, D36N, K37L, E391I, Q394R, K395D, T452Y y N484P, y la variante BE2 comprendiendo las siguientes alteraciones en la secuencia de amilasa: R118K, D183*, G184*, N195F, R320K, R458K y N484P.

25

Tabla 1. Aplicación de amilasa híbrida (1 mg/kg de harina) sin Novamyl				
Tratamiento	Firmeza el día 15 (g)	% de reducción en firmeza del día de control 15	Elasticidad g/g	ELR %
Control	794		39,9	
BE1	382	51	47,0	-17,0
BE2	313	61	46,6	-16,8

40

Tabla 2. Aplicación de amilasa híbrida en combinación con Novamyl				
Tratamiento	Firmeza el día 15 (g)	% de reducción en firmeza del día de control 15	Elasticidad g/g	ELR%
Control	706		40,8	
BE1 0,5mg/kg de harina	316	55	46,9	- 4,5
BE1 1mg/kg de harina	239	66	47,0	- 4,9
BE2 0,5mg/kg de harina	315	55	47,0	- 4,9
BE2 1mg/kg de harina	225	68	47,5	- 6,0
Sólo Novamyl® 500 MANU/kg de harina	452		44,8	

60

Ejemplo 7

Pastel

- 65 La masa del pastel se preparó con los híbridos BE1, BE2, la amilasa de Bacillus mostrada en la SEC ID NO: 40 (homólogo donante CD) y las amilasas de Bacillus de la SEC ID NO: 2 (CBM donante).

ES 2 356 703 T3

La masa se hizo a partir de una mezcla para pastel comercial “Tegral Allegro” de Puratos consistiendo en harina de trigo, azúcar, levadura, emulsionante (mono- y diglicéridos de ácidos grasos). La mezcla de pastel, la enzima (4 mg/kg de harina) y el agua se colocaron en un bol y se removieron con una espátula, Bear AR 5 A-Vari-mixer, a la tercera velocidad hasta que se obtuvo una mezcla homogénea (aproximadamente 2 minutos). Se llenaron moldes con 300g de masa y se horneó a 180°C durante 45 minutos. Los pasteles horneados se enfriaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se embalaron en nitrógeno antes del almacenamiento a temperatura ambiente hasta el análisis.

La movilidad de agua libre se determinó usando un campo bajo de RMN como se describe por P.L. Chen, Z. Long, R. Ruan y T.P. Labuza, Nuclear Magnetic Resonance Studies of water Mobility in bread during Storage. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 30, 178-183 (1997).

La dureza y la firmeza se midieron según el método descrito en Food Texture and viscosity, 2nd edition, Malcolm Bourne, Food Science and Technology, International Series, Academic Press, páginas 182-186.

Todos los datos se midieron después de 14 días. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tratamiento	Unidades de dureza	Unidades de firmeza	Unidades de movilidad
Referencia	1485	34	4148
BE1 9,5 KNU/kg de harina	1482	35	4655
Amyl1 9,5 KNU/kg de harina	1702	35	4811
BE3 9,5 KNU/kg de harina	1217	34	4797
BAN (SEQ ID NO:37) 9,5 KNU/kg de harina	1456	32	4423

En base a los datos anteriores se calcularon los siguientes parámetros (I) - (III):

(I): Reducción de firmeza % = $(Firmeza_{Referencia} - Firmeza_{amilasa}) \times 100\% / Firmeza_{Referencia}$

(II): dHardness = $HardneSS_{Referencia} - HardneSS_{Amilasa}$

(III): dMobility = $Mobility_{Amilasa} - Mobility_{Referencia}$

Tratamiento	Reducción en firmeza %	Unidades dHardness	Unidades dMobility
Referencia			
BE1 9,5 KNU/kg de harina	-3	3	507
Amyl1 9,5 KNU/kg de harina	-3	-217	663
BE3 9,5 KNU/kg de harina	0	268	649
BAN (SEQ ID NO:37) 9,5 KNU/kg de harina	5,8	20	275

Amyl1 es idéntica a la amilasa de la SEC ID n°: 40 con las siguientes sustituciones: R118K, D183*, G184*, N195F, R320K, R458K, N33S, D36N, K37L, E391I, Q394R, K395D, T452i y N484P, usando la numeración de la SEC ID n°: 40.

ES 2 356 703 T3

Ejemplo 8

Espanja y masa

Los panes se hornearon según la método de esponja & masa. Los panes se almacenaron a temperatura ambiente durante 14 días hasta el análisis. La dureza y la firmeza se midieron según el método descrito en Food Texture and viscosity, 2 edition, Malcolm Bourne, Food Science and Technology, International Series, Academic Press, página 182-186, y la movilidad de agua libre se determinó usando un campo bajo de RMN como se describe por P.L. Chen, Z. Long, R. Ruan y T.P. Labuza, Nuclear Magnetic Resonance Studies of water Mobility in bread during Storage. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 30, 178-183 (1997). Se usaron tres amilasas; las variantes BE1 y BE3 y la amilasa de Bacillus de la SEC ID NO: 2 (CBM donante). La variante BE3 tiene el dominio catalítico teniendo la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID: 37 y comprende uno o más, por ejemplo tal como todas las siguientes alteraciones: S31A, D32N, I33L, E178*, G179*, N190F, K389I; K392R, E393D, V508A y un CBM teniendo la secuencia de aminoácidos mostrada como los residuos de aminoácidos 485 a 586 en la SEC ID NO: 2.

Todos los datos se midieron después de 14 días. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tratamiento	Unidades de dureza	Unidades de firmeza	Unidades de movilidad
Referencia	400	38	6435
Novamyl 300MANU/kg de harina	272	48	6234
BE3 0.05mg/kg de harina + Novamyl 300 MANU/kg de harina	256	48	7365
BAN (SEQ ID NO:37) 0,05mg/kg de harina + Novamyl 300 MANU/kg de harina	207	45	7354
BE3 0.15mg/kg flour	223	48	6886
BE1 0.5mg/kg flour	311	41	7152

En base a los datos anteriores se calcularon los siguientes parámetros (I) - (VI):

Para tratamientos sin Novamyl®

$$(I): \text{Reducción de firmeza \%} = (\text{Firmeza}_{\text{Referencia}} - \text{Firmeza}_{\text{amilasa}}) \times 100\% / \text{Firmeza}_{\text{Referencia}}$$

$$(II): \text{dHardness} = \text{Hardness}_{\text{Referencia}} - \text{Hardness}_{\text{Amilasa}}$$

$$(III): \text{dMobility} = \text{Mobility}_{\text{Amilasa}} - \text{Mobility}_{\text{Referencia}}$$

Para tratamientos con Novamyl®

$$(I): \text{Reducción de firmeza \%} = (\text{Firmeza}_{\text{Novamyl}} - \text{Firmeza}_{\text{amilasa+Novamyl}}) \times 100\% / \text{Firmeza}_{\text{Novamyl}}$$

$$(V): \text{dHardness} = \text{Hardness}_{\text{Novamyl}} - \text{Hardness}_{\text{Amilasa+Novamyl}}$$

$$(VI): \text{dMobility} = \text{Mobility}_{\text{Amilasa+Novamyl}} - \text{Mobility}_{\text{Novamyl}}$$

Ejemplo 9

Determinación de la termoestabilidad

La termoestabilidad se determinó a 60, 65 o 70°C durante 30 minutos en un tampón de 50 mM de NaOAc y 1 mM de CaCl₂ a pH 5.7. Las muestras se enfriaron y la actividad residual se midió usando el método de Phadebas como se describe en la sección Materiales y Métodos excepto que la determinación tuvo lugar a 50°C. La actividad residual (R.A.) se puede calcular según la siguiente ecuación: R.A. (%) = [ABS (tratado con calor) - ABS (en blanco)] / [ABS (tratado con calor a 60°C) - ABS (en blanco)] * 100%.

ES 2 356 703 T3

Se obtuvieron los siguientes resultados:

Actividad residual para Fungamil, una amilasa de cocción fúngica de *A. oryzae* bien conocida, y para enzimas híbridas de la invención.

Enzima	60°C	65°C	70°C
Fungamil	100	4	2
BE1	100	78	67
BE3	100	80	27

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citada por el solicitante ha sido recopilada exclusivamente para la información del lector. No forma parte del documento de patente europea. La misma ha sido confeccionada con la mayor diligencia; la OEP sin embargo no asume responsabilidad alguna por eventuales errores u omisiones.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 9000609 A [0015]
- US 6162628 A [0100] [0154]
- WO 9424158 A [0015]
- WO 2003010923 A [0101]
- WO 9516782 A [0015]
- WO 2001066711 A [0101]
- US 2004023031 W [0025]
- WO 2000039289 A [0101]
- WO 2002068589 A [0025]
- WO 9632472 A [0101]
- WO 2002010355 A [0028]
- WO 9953769 A [0101] [0102]
- WO 9526397 A [0028]
- WO 0032758 A [0101] [0102]
- WO 9700324 A, KAO [0028]
- WO 0200852 A [0101] [0102]
- EP 1022334 A, KAO [0028]
- WO 2002066622 A [0101] [0102]
- WO 0210356 A, Henkel [0028]
- US 5231017 A [0111]
- WO 0060058 A [0028]
- DK PA200301568 [0112]
- DK 0100133 W [0028]
- WO 2004081193 A [0112]
- US 4683202 A [0059]
- US 3912590 A [0113]
- US 4760025 A [0064]
- EP 252730 A [0113]
- WO 9114772 A [0076]
- EP 63909 A [0113]
- US 4160848 A [0097]
- US RE32153 E [0126]
- US 6667065 B [0098]
- US 4587215 A [0126]
- US 20040043109 A [0098]
- WO 9928448 A [0126]
- WO 2003084331 A [0098]
- US 60650612 B [0127] [0128]
- WO 9950399 A2 [0099] [0104]
- WO 0060060 A2 [0172]
- WO 2004111217 A [0099]
- WO 9211357 A [0179]
- EP 494233 B1 [0100]
- WO 9510603 A [0179]

Bibliografía fuera de la patente citada en la descripción

- **Greenwood et al.** *Biotechnology and Bioengineering*, 1994, vol. 44, 1295-1305 [0015]
- 5 • **Needleman, S.B. Wunsch, C.D.** *Journal of Molecular Biology*, 1970, vol. 48, 443-453 [0016]
- **Joergensen et al.** *Biotechnol. Lett.*, 1997, vol. 19, 1027-1031 [0021]
- **Coutinho, P.M. Henrissat, B.** *CAZy - Carbohydrate-Active Enzymes*, 1999, [0021]
- 10 • The modular structure of cellulases and other carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach
Coutinho, P.M. Henrissat, B. *Genetics, Biochemistry and Ecology of Cellulose Degradation Uni Publishers Co.*
1999, 15-23 [0021]
- 15 • **Bourne, Y. Henrissat, B.** Glycoside hydrolases and glycosyltransferases: families and functional modules
Current Opinion in Structural Biology, 2001, vol. 11, 593-600 [0021]
- **Tsakamoto et al.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1988, vol. 151, 25-31 [0028]
- 20 • **Innis et al.** *PCR: A Guide to Methods and Application Academic Press* 1990. [0055]
- **S.L. Beaucage M.H.** Caruthers *Tetrahedron Letters*, 1981, vol. 22, 1859-1869 [0058]
- **Matthes et al.** *EMBO J.*, 1984, vol. 3, 801-805 [0058]
- 25 • **R.K. Saiki et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 487-491 [0059]
- **Morinaga et al.** *Biotechnology*, 1984, vol. 2, 646-639 [0064]
- 30 • **Nelson** *Long Analytical Biochemistry*, 1989, vol. 180, 147-151 [0065]
- **Tague et al.** *Plant, Phys.*, 1988, vol. 86, 506- [0075]
- **Franck et al.** *Cell*, 1980, vol. 21, 285-294 [0076]
- 35 • **Christensen AH Sharrock RA Quail** Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression
and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation *Plant Mo. Biol.*,
1992, vol. 18, 675-689 [0076]
- 40 • **Zhang W McElroy D. Wu R** Analysis of rice Act1 5' region activity in transgenic rice plants *Plant Cell*, 1991,
vol. 3, 1155-1165 [0076]
- **Edwards Coruzzi** *Annu. Rev. Genet.*, 1990, vol. 24, 275-303 [0076]
- 45 • **Ito et al.** *Plant Mol. Biol.*, 1994, vol. 24, 863-878 [0076]
- **Wu et al.** *Plant and Cell Physiology*, 1998, vol. 39, no. 8. 885-889 [0076]
- **Conrad U.** *Journal of Plant Physiology*, 1998, vol. 152, no. 6. 708-711 [0076]
- 50 • **Chen et al.** *Plant and cell physiology*, 1998, vol. 39, no. 9. 935-941 [0076]
- **Kyozuka et al.** *Plant Physiology*, 1993, vol. 102, no. 3. 991-1000 [0076]
- 55 • **Mitra, A. Higgins, DW** *Plant Molecular Biology*, 1994, vol. 26, no. 1. 85-93 [0076]
- **Kagaya et al.** *Molecular and General Genetics*, 1995, vol. 248, no. 6. 668-674 [0076]
- **Xu et al.** *Plant Molecular Biology*, 1993, vol. 22, no. 4. 573-588 [0076]
- 60 • **Gasser et al.** *Science*, vol. 244, 1293- [0079]
- **Potrykus** *Bio/Techn.*, 1990, vol. 8, 535- [0079]
- 65 • **Shimamoto et al.** *Nature*, 1989, vol. 338, 274- [0079]
- **Hooykas Schilperoort** *Plant Mol. Biol.*, 1992, vol. 19, 15-38 [0080]

ES 2 356 703 T3

- **Christou** *Plant J.*, 1992, vol. 2, 275-281 [0080]

- **Shimamoto** *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1994, vol. 5, 158-162 [0080]

5 • **Vasil** *et al. Bio/Technology*, 1992, vol. 10, 667-674 [0080]

- **Omirulleh S et al.** *Plant Molecular biology*, 1993, vol. 21, no. 3. 415-428 [0080]

10 • **Gorinstein. S. Lii. C.** *Starch/Stärke*, 1992, vol. 44, no. 12. 461-466 [0140]

- **Sambrook et al.** *Molecular cloning: A laboratory manual* Cold Spring Harbor lab. 1989. [0155]

- *Current protocols in Molecular Biology* *John Wiley and Sons* 1995. [0155]

15 • **P.L. Chen Z. Long R. Ruan T.P. Labuza** *Nuclear Magnetic Resonance Studies of water Mobility in bread during Storage* *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 1997, vol. 30, 178-183 [0206] [0211]

20 • *Food Science and Technology, International Series* *Malcolm Bourne Food Texture and viscosity* *Academic Press* 182-186 [0211]

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido el cual es un híbrido comprendiendo;

- a) una primera secuencia de aminoácidos teniendo actividad endo-amilasa y teniendo al menos un 60% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 35 y
- b) una segunda secuencia de aminoácidos comprendiendo un módulo de unión a carbohidratos y teniendo al menos un 60% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada como los residuos de aminoácidos del 485 al 586 en la SEC ID NO: 2,

donde dicha primera secuencia de aminoácidos y/o dicha segunda secuencia de aminoácidos se deriva de una bacteria.

2. Polipéptido según la reivindicación 1, teniendo al menos un 60% de identidad, al menos un 70% de identidad, al menos un 80% de identidad, o incluso al menos un 90% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID NO: 4.

3. Proceso para preparar una masa o un producto comestible hecho a partir de una masa, cuyo proceso comprende añadir el polipéptido según la reivindicación 1 a la masa.

4. Proceso según la reivindicación 3 comprendiendo además añadir una actividad de exo-amilasa, preferiblemente una actividad de alfa-amilasa maltogénica, preferiblemente Novamyl.

5. Proceso comprendiendo;

- a) poner en contacto un almidón con un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2,
- b) incubar dicho almidón con dicho polipéptido durante un tiempo y a una temperatura suficientes para conseguir la conversión de al menos un 90% p/p de dicho sustrato de almidón en azúcares fermentables,
- c) fermentar para producir un producto de fermentación,
- d) opcionalmente recuperar el producto de fermentación.

6. Aditivo de mejora de pan o de masa en forma de un granulado o polvo aglomerado comprendiendo el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

7. Secuencia de ADN codificando un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.

8. Constructo de ADN comprendiendo la secuencia de ADN según la reivindicación 7.

9. Vector de expresión recombinante el cual porta el constructo de ADN según la reivindicación 8.

10. Célula huésped la cual se transforma con el constructo de ADN según la reivindicación 8 o el vector según la reivindicación 9.

ES 2 356 703 T3

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> Novozymes A/S	
5	<120> híbridos CBM-amilasa para cocción	
	<130> 10753.204-WO	
10	<160> 42	
	<170> Versión de patentIn 3.3	
15	<210> 1	
	<211> 1758	
	<212> ADN	
20	<213> <i>Bacillus flavotermus</i>	
	<220>	
	<221> CDS	
25	<222> (1)..(1758)	
	<400> 1	
30	gga agt gtg ccg gta aat ggc aca atg atg caa tat ttc gaa tgg tac 48 Gly Ser Val Pro Val Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr 1 5 10 15	
	ctt cca gac gat gga aca cta tgg acg aaa gta gca aat aac gct caa 96 Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Asn Ala Gln 20 25 30	
35	tct tta gcg aat ctt ggc att act gcc ctt tgg ctt ccc cct gcc tat 144 Ser Leu Ala Asn Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala Tyr 35 40 45	
40	aaa gga aca agc agc agt gac gtt gga tat ggc gtt tat gat tta tat 192 Lys Gly Thr Ser Ser Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu Tyr 50 55 60	
45	gac ctt gga gag ttt aat caa aaa gga act gtc cga aca aaa tac ggg 240 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly 65 70 75 80	
	aca aaa aca caa tat atc caa gca atc caa gcg gcg cat aca gca ggg 288 Thr Lys Thr Gln Tyr Ile Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Thr Ala Gly 85 90 95	
50	atg caa gta tat gca gat gtc gtc ttt aac cat aaa gcc ggt gca gat 336 Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asn His Lys Ala Gly Ala Asp 100 105 110	
55	gga aca gaa cta gtc gat gca gta gaa gta aat cct tct gac cgc aat 384 Gly Thr Glu Leu Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg Asn 115 120 125	
	caa gaa ata tca gga aca tat caa atc caa gcg tgg aca aaa ttt gat 432 Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe Asp 130 135 140	
60	ttt cct ggt cgt gga aac acc tat tct agt ttt aaa tgg cgt tgg tat 480 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp Tyr 145 150 155 160	
65	cat ttc gat gga acg gac tgg gat gag agt aga aaa cta aat cgt att 528 His Phe Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile 165 170 175	
	tac aag ttc cgc ggc acg gga aaa gca tgg gat tgg gaa gta gat aca 576	

ES 2 356 703 T3

	Tyr	Lys	Phe	Arg 180	Gly	Thr	Gly	Lys	Ala 185	Trp	Asp	Trp	Glu	Val 190	Asp	Thr	
5	gaa Glu	aac Asn	ggg Gly 195	aat Asn	tat Tyr	gac Asp	tat Tyr	ctc Leu 200	atg Met	tat Tyr	gca Ala	gat Asp	tta Leu 205	gat Asp	atg Met	gat Asp	624
10	cat His	cca Pro 210	gag Glu	gtt Val	gta Val	tcc Ser	gaa Glu 215	cta Leu	aaa Lys	aat Asn	tgg Trp	gga Gly 220	aag Lys	tgg Trp	tat Tyr	gta Val	672
15	acc Thr 225	aca Thr	acc Thr	aat Asn	atc Ile	gac Asp 230	gga Gly	ttc Phe	cgt Arg	ctg Leu	gat Asp 235	gca Ala	gtg Val	aag Lys	cat His	att Ile 240	720
20	aaa Lys	tat Tyr	agc Ser	ttt Phe	ttc Phe 245	ccg Pro	gac Asp	tgg Trp	cta Leu	tcg Ser 250	tac Tyr	gta Val	cga Arg	acc Thr	caa Gln 255	aca Thr	768
25	caa Gln	aag Lys	cct Pro	ctt Leu 260	ttt Phe	gcc Ala	gtt Val	ggg Gly	gaa Glu 265	ttt Phe	tgg Trp	agc Ser	tat Tyr	gac Asp 270	att Ile	agc Ser	816
30	aag Lys	ttg Leu	cac His 275	aac Asn	tat Tyr	att Ile	aca Thr	aag Lys 280	acg Thr	aac Asn	ggc Gly	tct Ser	atg Met 285	tcc Ser	cta Leu	ttc Phe	864
35	gat Asp	gcc Ala 290	ccg Pro	ctg Leu	cat His	aac Asn	aat Asn 295	ttt Phe	tat Tyr	ata Ile	gca Ala	tcg Ser 300	aaa Lys	tca Ser	ggc Gly	ggt Gly	912
40	tat Tyr 305	ttt Phe	gat Asp	atg Met	cgc Arg	aca Thr 310	tta Leu	ctc Leu	aac Asn	aac Asn	aca Thr 315	ttg Leu	atg Met	aaa Lys	gat Asp	cag Gln 320	960
45	cct Pro	aca Thr	tta Leu	gca Ala	gtc Val 325	aca Thr	tta Leu	gtg Val	gat Asp	aat Asn 330	cac His	gat Asp	act Thr	gag Glu	cca Pro 335	ggg Gly	1008
50	caa Gln	tct Ser	ctg Leu	cag Gln 340	tca Ser	tgg Trp	gtc Val	gag Glu	cca Pro 345	tgg Trp	ttt Phe	aaa Lys	ccg Pro	tta Leu 350	gct Ala	tac Tyr	1056
55	gca Ala	ttt Phe 355	atc Ile	ttg Leu	acc Thr	cgc Arg	caa Gln	gaa Glu 360	ggt Gly	tat Tyr	cct Pro	tgc Cys	gtc Val 365	ttt Phe	tat Tyr	gga Gly	1104
60	gat Asp	tac Tyr 370	tat Tyr	ggt Gly	att Ile	cca Pro	aaa Lys 375	tac Tyr	aac Asn	att Ile	cct Pro	gcg Ala 380	ctg Leu	aaa Lys	agc Ser	aaa Lys	1152
65	ctt Leu 385	gat Asp	ccg Pro	ctg Leu	tta Leu	att Ile 390	gcc Ala	aga Arg	aga Arg	gat Asp	tat Tyr 395	gcc Ala	tat Tyr	gga Gly	aca Thr	cag Gln 400	1200
70	cac His	gac Asp	tat Tyr	att Ile	gac Asp 405	agt Ser	gcg Ala	gat Asp	att Ile	atc Ile 410	ggt Gly	tgg Trp	acg Thr	cgg Arg	gaa Glu 415	gga Gly	1248
75	gtg Val	gct Ala	gaa Glu 420	aaa Lys	gca Ala	aat Asn	tca Ser	gga Gly	ctg Leu 425	gct Ala	gca Ala	ctc Leu	att Ile 430	acc Thr	gac Asp	ggg Gly	1296
80	cct Pro	ggc Gly	gga Gly 435	agc Ser	aaa Lys	tgg Trp	atg Met	tat Tyr 440	gtt Val	gga Gly	aaa Lys	caa Gln	cac His 445	gct Ala	ggc Gly	aaa Lys	1344
85	acg	ttt	tat	gat	tta	acc	ggc	aat	cga	agt	gat	aca	gtg	aca	atc	aat	1392

ES 2 356 703 T3

	Thr	Phe	Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly	Asn	Arg	Ser	Asp	Thr	Val	Thr	Ile	Asn	
	450						455					460					
5	gct	gat	gga	tgg	gga	gaa	ttt	aaa	gtc	aat	gga	ggg	tct	gta	tcc	ata	1440
	Ala	Asp	Gly	Trp	Gly	Glu	Phe	Lys	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Ile	480
	465					470					475						
10	tgg	gtt	cca	aaa	ata	agt	act	act	tcc	caa	ata	aca	ttt	act	gta	aat	1488
	Trp	Val	Pro	Lys	Ile	Ser	Thr	Thr	Ser	Gln	Ile	Thr	Phe	Thr	Val	Asn	495
					485					490							
15	aac	gcc	aca	acc	gtt	tgg	gga	caa	aat	gta	tac	gtt	gtc	ggg	aat	att	1536
	Asn	Ala	Thr	Thr	Val	Trp	Gly	Gln	Asn	Val	Tyr	Val	Val	Gly	Asn	Ile	510
				500					505								
20	tct	cag	ctg	ggg	aac	tgg	gat	cca	gtc	cac	gca	gtt	caa	atg	acg	ccg	1584
	Ser	Gln	Leu	Gly	Asn	Trp	Asp	Pro	Val	His	Ala	Val	Gln	Met	Thr	Pro	525
			515					520									
25	tct	tct	tat	cca	aca	tgg	act	gta	aca	atc	cct	ctt	ctt	caa	ggg	caa	1632
	Ser	Ser	Tyr	Pro	Thr	Trp	Thr	Val	Thr	Ile	Pro	Leu	Leu	Gln	Gly	Gln	540
							535										
30	aac	ata	caa	ttt	aaa	ttt	atc	aaa	aaa	gat	tca	gct	gga	aat	gtc	att	1680
	Asn	Ile	Gln	Phe	Lys	Phe	Ile	Lys	Lys	Asp	Ser	Ala	Gly	Asn	Val	Ile	560
	545					550					555						
35	tgg	gaa	gat	ata	tcg	aat	cga	aca	tac	acc	gtc	cca	act	gct	gca	tcc	1728
	Trp	Glu	Asp	Ile	Ser	Asn	Arg	Thr	Tyr	Thr	Val	Pro	Thr	Ala	Ala	Ser	575
					565					570							
40	gga	gca	tat	aca	gcc	agc	tgg	aac	gtg	ccc							1758
	Gly	Ala	Tyr	Thr	Ala	Ser	Trp	Asn	Val	Pro							585
				580													

35 <210> 2
 <211> 586
 <212> PRT
 <213> *Bacillus flavotermus*
 40
 <400> 2

45	Gly	Ser	Val	Pro	Val	Asn	Gly	Thr	Met	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr
	1				5					10					15	
50	Leu	Pro	Asp	Asp	Gly	Thr	Leu	Trp	Thr	Lys	Val	Ala	Asn	Asn	Ala	Gln
				20					25					30		
55	Ser	Leu	Ala	Asn	Leu	Gly	Ile	Thr	Ala	Leu	Trp	Leu	Pro	Pro	Ala	Tyr
			35					40					45			
60	Lys	Gly	Thr	Ser	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Val	Tyr	Asp	Leu	Tyr
	50						55					60				
65	Asp	Leu	Gly	Glu	Phe	Asn	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly
	65					70					75					80
70	Thr	Lys	Thr	Gln	Tyr	Ile	Gln	Ala	Ile	Gln	Ala	Ala	His	Thr	Ala	Gly
					85				90						95	
75	Met	Gln	Val	Tyr	Ala	Asp	Val	Val	Phe	Asn	His	Lys	Ala	Gly	Ala	Asp

ES 2 356 703 T3

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

ES 2 356 703 T3

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

<210> 3

<211> 1755

<212> ADN

<213> BLA-CBM híbrido

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1755)

ES 2 356 703 T3

<400> 3

	gca aat ctt aat ggg acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tac atg ccc	48
	Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro	
5	1 5 10 15	
	aat gac ggc caa cat tgg agg cgt ttg caa aac gac tcg gca tat ttg	96
	Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu	
10	20	
	gct gaa cac ggt att act gcc gtc tgg att ccc ccg gca tat aag gga	144
	Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly	
	35 40 45	
15	acg agc caa gcg gat gtg ggc tac ggt gct tac gac ctt tat gat tta	192
	Thr Ser 50 Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu	
	55 60	
20	ggg gag ttt cat caa aaa ggg acg gtt cgg aca aag tac ggc aca aaa	240
	Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys	
	65 70 75 80	
	gga gag ctg caa tct gcg atc aaa agt ctt cat tcc cgc gac att aac	288
	Gly Glu Leu Gln Ser 85 Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn	
25	gtt tac ggg gat gtg gtc atc aac cac aaa ggc ggc gct gat gcg acc	336
	Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr	
	100 105 110	
30	gaa gat gta acc gcg gtt gaa gtc gat ccc gct gac cgc aac cgc gta	384
	Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val	
	115 120 125	
	att tca gga gaa cac cta att aaa gcc tgg aca cat ttt cat ttt ccg	432
	Ile Ser 130 Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro	
35	ggg cgc ggc agc aca tac agc gat ttt aaa tgg cat tgg tac cat ttt	480
	Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe	
	145 150 155 160	
40	gac gga acc gat tgg gac gag tcc cga aag ctg aac cgc atc tat aag	528
	Asp Gly Thr Asp Trp 165 Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys	
	170 175	
	ttt caa gga aag gct tgg gat tgg gaa gtt tcc aat gaa aac ggc aac	576
	Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn	
45	180 185 190	
	tat gat tat ttg atg tat gcc gac atc gat tat gac cat cct gat gtc	624
	Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val	
	195 200 205	
50	gca gca gaa att aag aga tgg ggc act tgg tat gcc aat gaa ctg caa	672
	Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln	
	210 215 220	
55	ttg gac ggt ttc cgt ctt gat gct gtc aaa cac att aaa ttt tct ttt	720
	Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe	
	225 230 235 240	
	ttg cgg gat tgg gtt aat cat gtc agg gaa aaa acg ggg aag gaa atg	768
	Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met	
60	245 250 255	
	ttt acg gta gct gaa tat tgg cag aat gac ttg ggc gcg ctg gaa aac	816
	Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn	
	260 265 270	
65	tat ttg aac aaa aca aat ttt aat cat tca gtg ttt gac gtg ccg ctt	864
	Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu	

ES 2 356 703 T3

	275						280					285						
5	cat His	tat Tyr 290	cag Gln	ttc Phe	cat His	gct Ala	gca Ala 295	tcg Ser	aca Thr	cag Gln	gga Gly	ggc Gly 300	ggc Gly	tat Tyr	gat Asp	atg Met	912	
10	agg Arg 305	aaa Lys	ttg Leu	ctg Leu	aac Asn	ggt Gly 310	acg Thr	gtc Val	gtt Val	tcc Ser	aag Lys 315	cat His	ccg Pro	ttg Leu	aaa Lys	tcg Ser 320	960	
15	ggt Val	aca Thr	ttt Phe	gtc Val	gat Asp 325	aac Asn	cat His	gat Asp	aca Thr	cag Gln 330	ccg Pro	ggg Gly	caa Gln	tcg Ser	ctt Leu 335	gag Glu	1008	
20	tcg Ser	act Thr	gtc Val	caa Gln 340	aca Thr	tgg Trp	ttt Phe	aag Lys	ccg Pro 345	ctt Leu	gct Ala	tac Tyr	gct Ala	ttt Phe 350	att Ile	ctc Leu	1056	
25	aca Thr	agg Arg	gaa Glu 355	tct Ser	gga Gly	tac Tyr	cct Pro	cag Gln 360	gtt Val	tcc Phe	tac Tyr	ggg Gly	gat Asp 365	atg Met	tac Tyr	ggg Gly	1104	
30	acg Thr	aaa Lys 370	gga Gly	gac Asp	tcc Ser	cag Gln	cgc Arg 375	gaa Glu	att Ile	cct Pro	gcc Ala	ttg Leu 380	aaa Lys	cac His	aaa Lys	att Ile	1152	
35	gaa Glu 385	ccg Pro	atc Ile	tta Leu	aaa Lys	gcg Ala 390	aga Arg	aaa Lys	cag Gln	tat Tyr	gcg Ala 395	tac Tyr	gga Gly	gca Ala	cag Gln	cat His 400	1200	
40	gat Asp	tat Tyr	ttc Phe	gac Asp	cac His 405	cat His	gac Asp	att Ile	gtc Val	ggc Gly 410	tgg Trp	aca Thr	agg Arg	gaa Glu	ggc Gly 415	gac Asp	1248	
45	agc Ser	tcg Ser	gtt Val	gca Ala 420	aat Asn	tca Ser	ggt Gly	ttg Leu	gcg Ala 425	gca Ala	tta Leu	ata Ile	aca Thr	gac Asp 430	gga Gly	ccc Pro	1296	
50	ggt Gly	ggg Gly	gca Ala 435	aag Lys	cga Arg	atg Met	tat Tyr	gtc Val 440	ggc Gly	cgg Arg	caa Gln	aac Asn	gcc Ala 445	ggt Gly	gag Glu	aca Thr	1344	
55	tgg Trp	cat His 450	gac Asp	att Ile	acc Thr	gga Gly	aac Asn 455	cgt Arg	tcg Ser	gag Glu	ccg Pro	ggt Val 460	gtc Val	atc Ile	aat Asn	tcg Ser	1392	
60	gaa Glu 465	ggc Gly	tgg Trp	gga Gly	gag Glu	ttt Phe 470	cac His	gta Val	aac Asn	ggc Gly	ggg Gly 475	tcg Ser	ggt Val	tca Ser	att Ile	tat Tyr 480	1440	
65	ggt Val	caa Gln	aga Arg	ata Ile	agt Ser 485	act Thr	act Thr	tcc Ser	caa Gln	ata Ile 490	aca Thr	ttt Phe	act Thr	gta Val 495	aat Asn	aac Asn	1488	
70	gcc Ala	aca Thr	acc Thr	gtt Val 500	tgg Trp	gga Gly	caa Gln	aat Asn	gta Val 505	tac Tyr	ggt Val	gtc Val	ggg Gly	aat Asn 510	att Ile	tcg Ser	1536	
75	cag Gln	ctg Leu	ggg Gly 515	aac Asn	tgg Trp	gat Asp	cca Pro	gtc Val 520	cac His	gca Ala	ggt Val	caa Gln	atg Met 525	acg Thr	ccg Pro	tct Ser	1584	
80	tct Ser	tat Tyr 530	cca Pro	aca Thr	tgg Trp	act Thr	gta Val 535	aca Thr	atc Ile	cct Pro	ctt Leu	ctt Leu 540	caa Gln	ggg Gly	caa Gln	aac Asn	1632	
85	ata Ile	caa Gln	ttt Phe	aaa Lys	ttt Phe	atc Ile	aaa Lys	aaa Lys	gat Asp	tca Ser	gct Ala	gga Gly	aat Asn	gtc Val	att Ile	tgg Trp	1680	

ES 2 356 703 T3

	545		550		555		560	
5	gaa gat ata tcg aat cga aca tac acc gtc cca act gct gca tcc gga							1728
	Glu Asp Ile Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ala Ala Ser Gly							
			565		570		575	
10	gca tat aca gcc agc tgg aac gtg ccc							1755
	Ala Tyr Thr Ala Ser Trp Asn Val Pro							
			580		585			
	<210> 4							
	<211> 585							
	<212> PRT							
15	<213> BLA-CBM híbrido							
	<400> 4							
20	Ala Asn Leu Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Met Pro							
	1		5		10		15	
25	Asn Asp Gly Gln His Trp Arg Arg Leu Gln Asn Asp Ser Ala Tyr Leu							
			20		25		30	
30	Ala Glu His Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly							
			35		40		45	
35	Thr Ser Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu							
			50		55		60	
40	Gly Glu Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys							
			65		70		75	
45	Gly Glu Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn							
			85		90		95	
50	Val Tyr Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr							
			100		105		110	
55	Glu Asp Val Thr Ala Val Glu Val Asp Pro Ala Asp Arg Asn Arg Val							
			115		120		125	
60	Ile Ser Gly Glu His Leu Ile Lys Ala Trp Thr His Phe His Phe Pro							
			130		135		140	
65	Gly Arg Gly Ser Thr Tyr Ser Asp Phe Lys Trp His Trp Tyr His Phe							
			145		150		155	
70	Asp Gly Thr Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Asn Arg Ile Tyr Lys							
			165		170		175	
75	Phe Gln Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Asn Glu Asn Gly Asn							
			180		185		190	
80	Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Tyr Asp His Pro Asp Val							
			195		200		205	

ES 2 356 703 T3

Ala Ala Glu Ile Lys Arg Trp Gly Thr Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Gln
 210 215 220
 5 Leu Asp Gly Phe Arg Leu Asp Ala Val Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
 225 230 235 240
 10 Leu Arg Asp Trp Val Asn His Val Arg Glu Lys Thr Gly Lys Glu Met
 245 250 255
 15 Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asp Leu Gly Ala Leu Glu Asn
 260 265 270
 Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Phe Asn His Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
 275 280 285
 20 His Tyr Gln Phe His Ala Ala Ser Thr Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
 290 295 300
 25 Arg Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser
 305 310 315 320
 Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
 325 330 335
 30 Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
 340 345 350
 35 Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
 355 360 365
 40 Thr Lys Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile
 370 375 380
 Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His
 385 390 395 400
 45 Asp Tyr Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
 405 410 415
 50 Ser Ser Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
 420 425 430
 55 Gly Gly Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr
 435 440 445
 Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser
 450 455 460
 60 Glu Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr
 465 470 475 480
 65

ES 2 356 703 T3

val Gln Arg Ile Ser Thr Thr Ser Gln Ile Thr Phe Thr Val Asn Asn
 485 490 495
 5 Ala Thr Thr Val Trp Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn Ile Ser
 500 505 510
 10 Gln Leu Gly Asn Trp Asp Pro Val His Ala Val Gln Met Thr Pro Ser
 515 520 525
 15 Ser Tyr Pro Thr Trp Thr Val Thr Ile Pro Leu Leu Gln Gly Gln Asn
 530 535 540
 20 Ile Gln Phe Lys Phe Ile Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val Ile Trp
 545 550 555 560
 25 Glu Asp Ile Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ala Ala Ser Gly
 565 570 575
 30 Ala Tyr Thr Ala Ser Trp Asn Val Pro
 580 585
 <210> 5
 <211> 1749
 <212> ADN
 <213> licheniformis-CBM de bacillus
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1749)
 <400> 5
 45 gta aat ggc acg ctg atg cag tat ttt gaa tgg tat acg ccg aac gac 48
 Val Asn Gly Thr Leu Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr Thr Pro Asn Asp
 1 5 10 15
 50 ggc cag cat tgg aaa cga ttg cag aat gat gcg gaa cat tta tcg gat 96
 Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
 20 25 30
 55 atc ggt att act gcc gtc tgg att ccc ccg gca tat aag gga acg agc 144
 Ile Gly Ile Thr Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Tyr Lys Gly Thr Ser
 35 40 45
 60 caa gcg gat gtg ggc tac ggt gct tac gac ctt tat gat tta ggg gag 192
 Gln Ala Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr Asp Leu Gly Glu
 50 55 60
 65 ttt cat caa aaa ggg acg gtt cgg aca aag tac ggc aca aaa gga gag 240
 Phe His Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr Gly Thr Lys Gly Glu
 65 70 75 80
 70 ctg caa tct gcg atc aaa agt ctt cat tcc cgc gac att aac gtt tac 288
 Leu Gln Ser Ala Ile Lys Ser Leu His Ser Arg Asp Ile Asn Val Tyr
 85 90 95
 75 ggg gat gtg gtc atc aac cac aaa ggc ggc gct gat gcg acc gaa gat 336
 Gly Asp Val Val Ile Asn His Lys Gly Gly Ala Asp Ala Thr Glu Asp
 100 105 110

ES 2 356 703 T3

	gta	acc	gcg	gtt	gaa	gtc	gat	ccc	gct	gac	cgc	aac	cgc	gta	att	tca	384
	Val	Thr	Ala	Val	Glu	Val	Asp	Pro	Ala	Asp	Arg	Asn	Arg	Val	Ile	Ser	
5			115					120					125				
	gga	gaa	cac	cta	att	aaa	gcc	tgg	aca	cat	ttt	cat	ttt	ccg	ggg	cgc	432
	Gly	Glu	His	Leu	Ile	Lys	Ala	Trp	Thr	His	Phe	His	Phe	Pro	Gly	Arg	
		130					135					140					
10	ggc	agc	aca	tac	agc	gat	ttt	aag	tgg	tat	tgg	tac	cat	ttt	gac	gga	480
	Gly	Ser	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	Tyr	Trp	Tyr	His	Phe	Asp	Gly	
	145					150					155					160	
15	acc	gat	tgg	gac	gag	tcc	cga	aag	ctg	aac	cgc	atc	tat	aag	ttt	caa	528
	Thr	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Leu	Asn	Arg	Ile	Tyr	Lys	Phe	Gln	
					165					170					175		
20	ggg	aag	act	tgg	gat	tgg	gaa	gtt	tcc	aat	gaa	ttc	ggc	aac	tat	gat	576
	Gly	Lys	Thr	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Ser	Asn	Glu	Phe	Gly	Asn	Tyr	Asp	
				180					185					190			
25	tat	ttg	atg	tat	gcc	gac	ttt	gat	tat	gac	cat	cct	gat	gtc	gta	gca	624
	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Phe	Asp	Tyr	Asp	His	Pro	Asp	Val	Val	Ala	
			195					200					205				
30	gag	att	aag	aga	tgg	ggc	act	tgg	tat	gcc	aat	gaa	ctg	caa	ttg	gac	672
	Glu	Ile	Lys	Arg	Trp	Gly	Thr	Trp	Tyr	Ala	Asn	Glu	Leu	Gln	Leu	Asp	
		210					215					220					
35	ggt	ttc	cgt	ctt	gat	gct	gtc	aaa	cac	att	aaa	ttt	tct	ttt	ttg	cgg	720
	Gly	Phe	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys	Phe	Ser	Phe	Leu	Arg	
		225				230					235					240	
40	gat	tgg	gtt	aat	cat	gtc	agg	gaa	aaa	acg	ggg	aag	gaa	atg	ttt	acg	768
	Asp	Trp	Val	Asn	His	Val	Arg	Glu	Lys	Thr	Gly	Lys	Glu	Met	Phe	Thr	
					245					250					255		
45	gta	gct	gag	tac	tgg	tcg	aat	gac	ttg	ggc	gcg	ctg	gaa	aac	tat	ttg	816
	Val	Ala	Glu	Tyr	Trp	Ser	Asn	Asp	Leu	Gly	Ala	Leu	Glu	Asn	Tyr	Leu	
				260					265					270			
50	aac	aaa	aca	aat	ttt	aat	cat	tca	gtg	ttt	gac	gtg	ccg	ctt	cat	tat	864
	Asn	Lys	Thr	Asn	Phe	Asn	His	Ser	Val	Phe	Asp	Val	Pro	Leu	His	Tyr	
			275					280					285				
55	cag	ttc	cat	gct	gca	tcg	aca	cag	gga	ggc	ggc	tat	gat	atg	agg	aaa	912
	Gln	Phe	His	Ala	Ala	Ser	Thr	Gln	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asp	Met	Arg	Lys	
		290					295					300					
60	ttg	ctg	aac	ggt	acg	gtc	gtt	tcc	aag	cat	ccg	ttg	aaa	tcg	gtt	aca	960
	Leu	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Val	Ser	Lys	His	Pro	Leu	Lys	Ser	Val	Thr	
		305				310					315					320	
65	ttt	gtc	gat	aac	cat	gat	aca	cag	ccg	ggg	caa	tcg	ctt	gag	tcg	act	1008
	Phe	Val	Asp	Asn	His	Asp	Thr	Gln	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	Ser	Thr	
					325					330					335		
70	gtc	caa	aca	tgg	ttt	aag	ccg	ctt	gct	tac	gct	ttt	att	ctc	aca	agg	1056
	Val	Gln	Thr	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	Tyr	Ala	Phe	Ile	Leu	Thr	Arg	
				340					345					350			
75	gaa	tct	gga	tac	cct	cag	gtt	ttc	tac	ggg	gat	atg	tac	ggg	acg	aaa	1104
	Glu	Ser	Gly	Tyr	Pro	Gln	Val	Phe	Tyr	Gly	Asp	Met	Tyr	Gly	Thr	Lys	
			355					360					365				
80	gga	gac	tcc	cag	cgc	gaa	att	cct	gcc	ttg	aaa	cac	aaa	att	gaa	ccg	1152
	Gly	Asp	Ser	Gln	Arg	Glu	Ile	Pro	Ala	Leu	Lys	His	Lys	Ile	Glu	Pro	
		370					375					380					

ES 2 356 703 T3

atc tta aaa gcg aga aaa cag tat gcg tac gga gca cag cat gat tat 1200
 Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr
 385 390 395 400
 5 ttc gac cac cat gac att gtc ggc tgg aca agg gaa ggc gac agc tcg 1248
 Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser
 405 410 415
 10 gtt gca aat tca ggt ttg gcg gca tta ata aca gac gga ccc ggt ggg 1296
 Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly
 420 425 430
 15 gca aag cga atg tat gtc ggc cgg caa aac gcc ggt gag aca tgg cat 1344
 Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His
 435 440 445
 gac att acc gga aac cgt tcg gag ccg gtt gtc atc aat tcg gaa ggc 1392
 Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly
 450 455 460
 20 tgg gga gag ttt cac gta aac ggc ggg tcg gtt tca att tat gtt cca 1440
 Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Pro
 465 470 475 480
 25 aaa ata agt act act tcc caa ata aca ttt act gta aat aac gcc aca 1488
 Lys Ile Ser Thr Thr Ser Gln Ile Thr Phe Thr Val Asn Asn Ala Thr
 485 490 495
 30 acc gtt tgg gga caa aat gta tac gtt gtc ggg aat att tcg cag ctg 1536
 Thr Val Trp Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn Ile Ser Gln Leu
 500 505 510
 ggg aac tgg gat cca gtc cac gca gtt caa atg acg ccg tct tct tat 1584
 Gly Asn Trp Asp Pro Val His Ala Val Gln Met Thr Pro Ser Ser Tyr
 515 520 525
 35 cca aca tgg act gta aca atc cct ctt ctt caa ggg caa aac ata caa 1632
 Pro Thr Trp Thr Val Thr Ile Pro Leu Leu Gln Gly Gln Asn Ile Gln
 530 535 540
 40 ttt aaa ttt atc aaa aaa gat tca gct gga aat gtc att tgg gaa gat 1680
 Phe Lys Phe Ile Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val Ile Trp Glu Asp
 545 550 555 560
 45 ata tcg aat cga aca tac acc gtc cca act gct gca tcc gga gca tat 1728
 Ile Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ala Ala Ser Gly Ala Tyr
 565 570 575
 aca gcc agc tgg aac gtg ccc 1749
 Thr Ala Ser Trp Asn Val Pro
 580

<210> 6

<211> 583

<212> PRT

<213> licheniformis-CBM de bacillus

<400> 6

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

Gly Gln His Trp Lys Arg Leu Gln Asn Asp Ala Glu His Leu Ser Asp
 20 25 30

ES 2 356 703 T3

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

ES 2 356 703 T3

Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Ser Lys His Pro Leu Lys Ser Val Thr
 305 310 315 320
 5 Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu Ser Thr
 325 330 335
 10 Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu Thr Arg
 340 345 350
 15 Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly Thr Lys
 355 360 365
 20 Gly Asp Ser Gln Arg Glu Ile Pro Ala Leu Lys His Lys Ile Glu Pro
 370 375 380
 25 Ile Leu Lys Ala Arg Lys Gln Tyr Ala Tyr Gly Ala Gln His Asp Tyr
 385 390 395 400
 30 Phe Asp His His Asp Ile Val Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp Ser Ser
 405 410 415
 35 Val Ala Asn Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro Gly Gly
 420 425 430
 40 Ala Lys Arg Met Tyr Val Gly Arg Gln Asn Ala Gly Glu Thr Trp His
 435 440 445
 45 Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Glu Pro Val Val Ile Asn Ser Glu Gly
 450 455 460
 50 Trp Gly Glu Phe His Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Ile Tyr Val Pro
 465 470 475 480
 55 Lys Ile Ser Thr Thr Ser Gln Ile Thr Phe Thr Val Asn Asn Ala Thr
 485 490 495
 60 Thr Val Trp Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn Ile Ser Gln Leu
 500 505 510
 65 Gly Asn Trp Asp Pro Val His Ala Val Gln Met Thr Pro Ser Ser Tyr
 515 520 525
 70 Pro Thr Trp Thr Val Thr Ile Pro Leu Leu Gln Gly Gln Asn Ile Gln
 530 535 540
 75 Phe Lys Phe Ile Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val Ile Trp Glu Asp
 545 550 555 560
 80 Ile Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ala Ala Ser Gly Ala Tyr
 565 570 575
 85 Thr Ala Ser Trp Asn Val Pro
 580

ES 2 356 703 T3

	<210> 7	
	<211> 1755	
	<212> ADN	
5	<213> stearothermophilus-CBM de bacillus	
	<220>	
	<221> CDS	
10	<222> (1)..(1755)	
	<400> 7	
15	gca ccg ttt aac ggc ttt aac ggc acc atg atg cag tat ttt gaa tgg Ala Pro Phe Asn Gly Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp 1 5 10 15	48
20	tac ttg ccg gat gat ggc acg tta tgg acc aaa gtg gcc aat gaa gcc Tyr Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala 20 25 30	96
25	aac aac tta tcc agc ctt ggc atc acc gct ctt tgg ctg ccg ccc gct Asn Asn Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala 35 40 45	144
30	tac aaa gga aca agc cgc agc gac gta ggg tac gga gta tac gac ttg Tyr Lys Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu 50 55 60	192
35	tat gac ctc ggc gaa ttc aat caa aaa ggg acc gtc cgc aca aaa tac Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr 65 70 75 80	240
40	gga aca aaa gct caa tat ctt caa gcc att caa gcc gcc cac gcc gct Gly Thr Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala 85 90 95	288
45	gga atg caa gtg tac gcc gat gtc gtg ttc gac cat aaa ggc ggc gct Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala 100 105 110	336
50	gac ggc acg gaa tgg gtg gac gcc gtc gaa gtc aat ccg tcc gac cgc Asp Gly Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg 115 120 125	384
55	aac caa gaa atc tcg ggc acc tat caa atc caa gca tgg acg aaa ttt Asn Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe 130 135 140	432
60	gat ttt ccc ggg cgg ggc aac acc tac tcc agc ttt aag tgg cgc tgg Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp 145 150 155 160	480
65	tac cat ttt gac ggc gtt gat tgg gac gaa agc cga aaa ttg agc cgc Tyr His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg 165 170 175	528
	att tac aaa ttc cgt ggc aag gct tgg gat tgg gaa gta gac acg gaa Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu 180 185 190	576
	ttc gga aac tat gac tac tta atg tat gcc gac ctt gat atg gat cat Phe Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Leu Asp Met Asp His 195 200 205	624

ES 2 356 703 T3

5	ccc Pro	gaa Glu 210	gtc Val	gtg Val	acc Thr	gag Glu 215	ctg Leu 215	aaa Lys	aac Asn	tgg Trp	ggg Gly 220	aaa Lys 220	tgg Trp	tat Tyr	gtc Val	aac Asn	672
	aca Thr 225	acg Thr	aac Asn	att Ile	gat Asp	ggg Gly 230	ttc Phe	cgg Arg	ctt Leu	gat Asp	gcc Ala 235	gtc Val	aag Lys	cat His	att Ile	aag Lys 240	720
10	ttc Phe	agt Ser	ttt Phe	ttt Phe	cct Pro 245	gat Asp	tgg Trp	ttg Leu	tcg Ser	tat Tyr 250	gtg Val	cgt Arg	tct Ser	cag Gln	act Thr 255	ggc Gly	768
15	aag Lys	ccg Pro	cta Leu 260	ttt Phe 260	acc Thr	gtc Val	ggg Gly	gaa Glu 265	tat Tyr 265	tgg Trp	agc Ser	tat Tyr	gac Asp	atc Ile 270	aac Asn	aag Lys	816
	ttg Leu	cac His	aat Asn 275	tac Tyr	att Ile	acg Thr	aaa Lys 280	aca Thr 280	gac Asp	gga Gly	acg Thr	atg Met	tct Ser 285	ttg Leu	ttt Phe	gat Asp	864
20	gcc Ala 290	ccg Pro	tta Leu	cac His	aac Asn	aaa Lys	ttt Phe 295	tat Tyr	acc Thr	gct Ala	tcc Ser	aaa Lys 300	tca Ser	ggg Gly	ggc Gly	gca Ala	912
25	ttt Phe 305	gat Asp	atg Met	cgc Arg	acg Thr	tta Leu 310	atg Met	acc Thr	aat Asn	act Thr	ctc Leu 315	atg Met	aaa Lys	gat Asp	caa Gln	ccg Pro 320	960
30	aca Thr	ttg Leu	gcc Ala	gtc Val	acc Thr 325	ttc Phe	gtt Val	gat Asp	aat Asn	cat His 330	gac Asp	acc Thr	gaa Glu	ccc Pro	ggc Gly 335	caa Gln	1008
	gcg Ala	ctg Leu	caa Gln 340	tca Ser	tgg Trp	gtc Val	gac Asp	cca Pro	tgg Trp 345	ttc Phe	aaa Lys	ccg Pro	ttg Leu	gct Ala 350	tac Tyr	gcc Ala	1056
35	ttt Phe	att Ile	cta Leu 355	act Thr	cgg Arg	cag Gln	gaa Glu 360	gga Gly 360	tac Tyr	ccg Pro	tgc Cys	gtc Val	ttt Phe 365	tat Tyr	ggc Gly	gac Asp	1104
40	tat Tyr 370	tat Tyr	ggc Gly	att Ile	cca Pro	caa Gln	tat Tyr 375	aac Asn	att Ile	cct Pro	tcg Ser	ctg Leu 380	aaa Lys	agc Ser	aaa Lys	atc Ile	1152
45	gat Asp 385	ccg Pro	ctc Leu	ctc Leu	atc Ile	gcg Ala 390	cgc Arg	agg Arg	gat Asp	tat Tyr	gct Ala 395	tac Tyr	gga Gly	acg Thr	caa Gln	cat His 400	1200
	gat Asp	tat Tyr	ctt Leu	gat Asp	cac His 405	tcc Ser	gac Asp	atc Ile	atc Ile	ggg Gly 410	tgg Trp	aca Thr	agg Arg	gaa Glu	ggg Gly 415	ggc Gly	1248
50	act Thr	gaa Glu	aaa Lys	cca Pro 420	gga Gly	tcc Ser	gga Gly	ctg Leu	gcc Ala 425	gca Ala	ctg Leu	atc Ile	acc Thr	gat Asp 430	ggg Gly	ccg Pro	1296
55	gga Gly	gga Gly	agc Ser 435	aaa Lys	tgg Trp	atg Met	tac Tyr	gtt Val 440	ggc Gly	aaa Lys	caa Gln	cac His	gct Ala 445	gga Gly	aaa Lys	gtg Val	1344
	ttc Phe 450	tat Tyr	gac Asp	ctt Leu	acc Thr	ggc Gly	aac Asn 455	cgg Arg	agt Ser	gac Asp	acc Thr	gtc Val 460	acc Thr	atc Ile	aac Asn	agt Ser	1392
60	gat Asp 465	gga Gly	tgg Trp	ggg Gly	gaa Glu 470	ttc Phe	aaa Lys	gtc Val	aat Asn	ggc Gly	ggc Gly 475	tcg Ser	gtt Val	tcg Ser	gtt Val	tgg Trp 480	1440

ES 2 356 703 T3

gtt cct aaa ata agt act act tcc caa ata aca ttt act gta aat aac 1488
 Val Pro Lys Ile Ser Thr Thr Ser Gln Ile Thr Phe Thr Val Asn Asn 485 490 495
 5 gcc aca acc gtt tgg gga caa aat gta tac gtt gtc ggg aat att tcg 1536
 Ala Thr Thr Val Trp Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn Ile Ser 500 505 510
 10 cag ctg ggg aac tgg gat cca gtc cac gca gtt caa atg acg ccg tct 1584
 Gln Leu Gly Asn Trp Asp Pro Val His Ala Val Gln Met Thr Pro Ser 515 520 525
 15 tct tat cca aca tgg act gta aca atc cct ctt ctt caa ggg caa aac 1632
 Ser Tyr Pro Thr Trp Thr Val Thr Ile Pro Leu Leu Gln Gly Gln Asn 530 535 540
 20 ata caa ttt aaa ttt atc aaa aaa gat tca gct gga aat gtc att tgg 1680
 Ile Gln Phe Lys Phe Ile Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val Ile Trp 545 550 555 560
 25 gaa gat ata tcg aat cga aca tac acc gtc cca act gct gca tcc gga 1728
 Glu Asp Ile Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ala Ala Ser Gly 565 570 575
 gca tat aca gcc agc tgg aac gtg ccc 1755
 Ala Tyr Thr Ala Ser Trp Asn Val Pro 580 585

<210> 8

30 <211> 585

<212> PRT

<213> stearothermophilus-CBM de bacillus

35 <400> 8

Ala Pro Phe Asn Gly Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp
 1 5 10 15
 40 Tyr Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala
 20 25 30
 45 Asn Asn Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala
 35 40 45
 50 Tyr Lys Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu
 50 55 60
 55 Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr
 65 70 75 80
 60 Gly Thr Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala
 85 90 95
 Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala
 100 105 110
 65 Asp Gly Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg
 115 120 125

ES 2 356 703 T3

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

ES 2 356 703 T3

Asp Tyr Leu Asp His Ser Asp Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Gly
 405 410 415
 5 Thr Glu Lys Pro Gly Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
 420 425 430
 10 Gly Gly Ser Lys Trp Met Tyr Val Gly Lys Gln His Ala Gly Lys Val
 435 440 445
 15 Phe Tyr Asp Leu Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Thr Ile Asn Ser
 450 455 460
 Asp Gly Trp Gly Glu Phe Lys Val Asn Gly Gly Ser Val Ser Val Trp
 465 470 475 480
 20 Val Pro Lys Ile Ser Thr Thr Ser Gln Ile Thr Phe Thr Val Asn Asn
 485 490 495
 25 Ala Thr Thr Val Trp Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn Ile Ser
 500 505 510
 30 Gln Leu Gly Asn Trp Asp Pro Val His Ala Val Gln Met Thr Pro Ser
 515 520 525
 Ser Tyr Pro Thr Trp Thr Val Thr Ile Pro Leu Leu Gln Gly Gln Asn
 530 535 540
 35 Ile Gln Phe Lys Phe Ile Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val Ile Trp
 545 550 555 560
 40 Glu Asp Ile Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ala Ala Ser Gly
 565 570 575
 45 Ala Tyr Thr Ala Ser Trp Asn Val Pro
 580 585
 <210> 9
 <211> 1755
 <212> ADN
 50 <213> JE1-CBM
 <220>
 <221> CDS
 55 <222> (1)..(1755)
 <400> 9
 60 cat cat aat ggg aca aat ggg acg atg atg caa tac ttt gaa tgg cac 48
 His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His
 1 5 10 15
 ttg cct aat gat ggg aat cac tgg aat aga tta aga gat gat gct agt 96
 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ser
 20 25 30
 65 aat cta aga aat aga ggt ata acc gct att tgg att ccg ccg gcc tgg 144

ES 2 356 703 T3

	Asn	Leu	Arg	Asn	Arg	Gly	Ile	Thr	Ala	Ile	Trp	Ile	Pro	Pro	Ala	Trp	
			35					40					45				
5	aaa	ggg	act	tcg	caa	aat	gat	gtg	ggg	tat	gga	gcc	tat	gat	ctt	tat	192
	Lys	Gly	Thr	Ser	Gln	Asn	Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Asp	Leu	Tyr	
		50					55					60					
10	gat	tta	ggg	gaa	ttt	aat	caa	aag	ggg	acg	gtt	cgt	act	aag	tat	ggg	240
	Asp	Leu	Gly	Glu	Phe	Asn	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly	
	65					70					75					80	
15	aca	cgt	agt	caa	ttg	gag	tct	gcc	atc	cat	gct	tta	aag	aat	aat	ggc	288
	Thr	Arg	Ser	Gln	Leu	Glu	Ser	Ala	Ile	His	Ala	Leu	Lys	Asn	Asn	Gly	
					85					90					95		
20	gtt	caa	gtt	tat	ggg	gat	gta	gtg	atg	aac	cat	aaa	gga	gga	gct	gat	336
	Val	Gln	Val	Tyr	Gly	Asp	Val	Val	Met	Asn	His	Lys	Gly	Gly	Ala	Asp	
				100					105					110			
25	gct	aca	gaa	aac	gtt	ctt	gct	gtc	gag	gtg	aat	cca	aat	aac	cgg	aat	384
	Ala	Thr	Glu	Asn	Val	Leu	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Asn	Asn	Arg	Asn	
			115					120					125				
30	caa	gaa	ata	tct	ggg	gac	tac	aca	att	gag	gct	tgg	act	aag	ttt	gat	432
	Gln	Glu	Ile	Ser	Gly	Asp	Tyr	Thr	Ile	Glu	Ala	Trp	Thr	Lys	Phe	Asp	
		130					135					140					
35	ttt	cca	ggg	agg	ggt	aat	aca	tac	tca	gac	ttt	aaa	tgg	cgt	tgg	tat	480
	Phe	Pro	Gly	Arg	Gly	Asn	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	Arg	Trp	Tyr	
	145					150					155					160	
40	cat	ttc	gat	ggt	gta	gat	tgg	gat	caa	tca	cga	caa	ttc	caa	aat	cgt	528
	His	Phe	Asp	Gly	Val	Asp	Trp	Asp	Gln	Ser	Arg	Gln	Phe	Gln	Asn	Arg	
					165				170						175		
45	atc	tac	aaa	ttc	cga	ggt	aaa	gct	tgg	gat	tgg	gaa	gta	gat	tcg	gaa	576
	Ile	Tyr	Lys	Phe	Arg	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Asp	Ser	Glu	
				180				185						190			
50	aat	gga	aat	tat	gat	tat	tta	atg	tat	gca	gat	gta	gat	atg	gat	cat	624
	Asn	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Val	Asp	Met	Asp	His	
			195					200					205				
55	ccg	gag	gta	gta	aat	gag	ctt	aga	aga	tgg	gga	gaa	tgg	tat	aca	aat	672
	Pro	Glu	Val	Val	Asn	Glu	Leu	Arg	Arg	Trp	Gly	Glu	Trp	Tyr	Thr	Asn	
		210					215					220					
60	aca	tta	aat	ctt	gat	gga	ttt	agg	atc	gat	gcg	gtg	aag	cat	att	aaa	720
	Thr	Leu	Asn	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Val	Lys	His	Ile	Lys	
	225					230					235					240	
65	tat	agc	ttt	aca	cgt	gat	tgg	ttg	acc	cat	gta	aga	aac	gca	acg	gga	768
	Tyr	Ser	Phe	Thr	Arg	Asp	Trp	Leu	Thr	His	Val	Arg	Asn	Ala	Thr	Gly	
					245					250					255		
70	aaa	gaa	atg	ttt	gct	gtt	gct	gaa	ttt	tgg	aaa	aat	gat	tta	ggt	gcc	816
	Lys	Glu	Met	Phe	Ala	Val	Ala	Glu	Phe	Trp	Lys	Asn	Asp	Leu	Gly	Ala	
				260				265						270			
75	ttg	gag	aac	tat	tta	aat	aaa	aca	aac	tgg	aat	cat	tct	gtc	ttt	gat	864
	Leu	Glu	Asn	Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Asn	Trp	Asn	His	Ser	Val	Phe	Asp	
			275					280					285				
80	gtc	ccc	ctt	cat	tat	aat	ctt	tat	aac	gcg	tca	aat	agt	gga	ggc	aac	912
	Val	Pro	Leu	His	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ala	Ser	Asn	Ser	Gly	Gly	Asn	
		290				295					300						
85	tat	gac	atg	gca	aaa	ctt	ctt	aat	gga	acg	gtt	gtt	caa	aag	cat	cca	960

ES 2 356 703 T3

	Tyr 305	Asp	Met	Ala	Lys	Leu 310	Leu	Asn	Gly	Thr	Val 315	Val	Gln	Lys	His	Pro 320	
5	atg Met	cat His	gcc Ala	gta Val	act Thr 325	ttt Phe	gtg Val	gat Asp	aat Asn	cac His 330	gat Asp	tct Ser	caa Gln	cct Pro	ggg Gly 335	gaa Glu	1008
10	tca Ser	tta Leu	gaa Glu	tca Ser 340	ttt Phe	gta Val	caa Gln	gaa Glu	tgg Trp 345	ttt Phe	aag Lys	cca Pro	ctt Leu	gct Ala 350	tat Tyr	gcg Ala	1056
15	ctt Leu	att Ile	tta Leu 355	aca Thr	aga Arg	gaa Glu	caa Gln	ggc Gly 360	tat Tyr	ccc Pro	tct Ser	gtc Val	ttc Phe 365	tat Tyr	ggg Gly	gac Asp	1104
20	tac Tyr	tat Tyr 370	gga Gly	att Ile	cca Pro	aca Thr	cat His 375	agt Ser	gtc Val	cca Pro	gca Ala	atg Met 380	aaa Lys	gcc Ala	aag Lys	att Ile	1152
25	gat Asp 385	cca Pro	atc Ile	tta Leu	gag Glu	gcg Ala 390	cgt Arg	caa Gln	aat Asn	ttt Phe	gca Ala 395	tat Tyr	gga Gly	aca Thr	caa Gln	cat His 400	1200
30	gat Asp	tat Tyr	ttt Phe	gac Asp	cat His 405	cat His	aat Asn	ata Ile	atc Ile	gga Gly 410	tgg Trp	aca Thr	cgt Arg	gaa Glu	gga Gly 415	aat Asn	1248
35	acc Thr	acg Thr	cat His	ccc Pro 420	aat Asn	tca Ser	gga Gly	ctt Leu	gcg Ala 425	act Thr	atc Ile	atg Met	tcg Ser	gat Asp 430	ggg Gly	cca Pro	1296
40	ggg Gly	gga Gly	gag Glu 435	aaa Lys	tgg Trp	atg Met	tac Tyr	gta Val 440	ggg Gly	caa Gln	gat Asp	aaa Lys	gca Ala 445	ggt Gly	caa Gln	gtt Val	1344
45	tgg Trp	cat His 450	gac Asp	ata Ile	act Thr	gga Gly	aat Asn 455	aaa Lys	cca Pro	ggc Gly	aca Thr	ggt Val 460	acg Thr	atc Ile	aat Asn	gca Ala	1392
50	gat Asp 465	gga Gly	tgg Trp	gcc Ala	aat Asn	ttt Phe 470	tca Ser	gta Val	aat Asn	gga Gly 475	tct Ser	ggt Val	tcc Ser	att Ile	tgg Trp 480		1440
55	gtg Val	cca Pro	aaa Lys	ata Ile	agt Ser 485	act Thr	act Thr	tcc Ser	caa Gln	ata Ile 490	aca Thr	ttt Phe	act Thr	gta Val 495	aat Asn	aac Asn	1488
60	gcc Ala	aca Thr	acc Thr	ggt Val 500	tgg Trp	gga Gly	caa Gln	aat Asn	gta Val 505	tac Tyr	ggt Val	gtc Val	ggg Gly	aat Asn 510	att Ile	tcg Ser	1536
65	cag Gln	ctg Leu	ggg Gly 515	aac Asn	tgg Trp	gat Asp	cca Pro	gtc Val 520	cac His	gca Ala	ggt Val	caa Gln	atg Met 525	acg Thr	ccg Pro	tct Ser	1584
70	tct Ser	tat Tyr 530	cca Pro	aca Thr	tgg Trp	act Thr	gta Val 535	aca Thr	atc Ile	cct Pro	ctt Leu 540	ctt Leu	caa Gln	ggg Gly	caa Gln	aac Asn	1632
75	ata Ile 545	caa Gln	ttt Phe	aaa Lys	ttt Phe 550	atc Ile	aaa Lys	aaa Lys	gat Asp	tca Ser	gct Ala 555	gga Gly	aat Asn	gtc Val	att Ile	tgg Trp 560	1680
80	gaa Glu	gat Asp	ata Ile	tcg Ser	aat Asn 565	cga Arg	aca Thr	tac Tyr	acc Thr	gtc Val 570	cca Pro	act Thr	gct Ala	gca Ala	tcc Ser 575	gga Gly	1728
85	gca Ala	tat Tyr	aca Thr	gcc Ala 580	agc Ser	tgg Trp	aac Asn	gtg Val	ccc Pro 585								1755

ES 2 356 703 T3

<210> 10

<211> 585

<212> PRT

5 <213> JE1-CBM

<400> 10

```

10      His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp His
       1          5          10          15

15      Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Asp Asp Ala Ser
              20          25          30

20      Asn Leu Arg Asn Arg Gly Ile Thr Ala Ile Trp Ile Pro Pro Ala Trp
              35          40          45

25      Lys Gly Thr Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr
       50          55          60

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

35      Thr Arg Ser Gln Leu Glu Ser Ala Ile His Ala Leu Lys Asn Asn Gly
              85          90          95

40      Val Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
              100          105          110

45      Ala Thr Glu Asn Val Leu Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn
       115          120          125

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

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

60      His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Gln Phe Gln Asn Arg
              165          170          175

65      Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Ser Glu
              180          185          190

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

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

80      Thr Leu Asn Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His Ile Lys

```

ES 2 356 703 T3

	225		230		235		240									
5	Tyr	Ser	Phe	Thr	Arg 245	Asp	Trp	Leu	Thr	His 250	Val	Arg	Asn	Ala	Thr 255	Gly
10	Lys	Glu	Met	Phe 260	Ala	Val	Ala	Glu	Phe 265	Trp	Lys	Asn	Asp	Leu 270	Gly	Ala
15	Leu	Glu	Asn 275	Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr 280	Asn	Trp	Asn	His	Ser 285	Val	Phe	Asp
20	Val	Pro 290	Leu	His	Tyr	Asn	Leu 295	Tyr	Asn	Ala	Ser	Asn 300	Ser	Gly	Gly	Asn
25	Tyr 305	Asp	Met	Ala	Lys	Leu 310	Leu	Asn	Gly	Thr	Val 315	Val	Gln	Lys	His	Pro 320
30	Met	His	Ala	Val	Thr 325	Phe	Val	Asp	Asn	His 330	Asp	Ser	Gln	Pro	Gly 335	Glu
35	Ser	Leu	Glu	Ser 340	Phe	Val	Gln	Glu	Trp 345	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala 350	Tyr	Ala
40	Leu	Ile	Leu 355	Thr	Arg	Glu	Gln	Gly 360	Tyr	Pro	Ser	Val	Phe 365	Tyr	Gly	Asp
45	Tyr	Tyr 370	Gly	Ile	Pro	Thr	His 375	Ser	Val	Pro	Ala	Met 380	Lys	Ala	Lys	Ile
50	Asp 385	Pro	Ile	Leu	Glu	Ala 390	Arg	Gln	Asn	Phe	Ala 395	Tyr	Gly	Thr	Gln	His 400
55	Asp	Tyr	Phe	Asp	His 405	His	Asn	Ile	Ile	Gly 410	Trp	Thr	Arg	Glu	Gly 415	Asn
60	Thr	Thr	His	Pro 420	Asn	Ser	Gly	Leu	Ala 425	Thr	Ile	Met	Ser	Asp 430	Gly	Pro
65	Gly	Gly	Glu 435	Lys	Trp	Met	Tyr	Val 440	Gly	Gln	Asp	Lys	Ala 445	Gly	Gln	Val
	Trp	His 450	Asp	Ile	Thr	Gly	Asn 455	Lys	Pro	Gly	Thr	Val 460	Thr	Ile	Asn	Ala
	Asp 465	Gly	Trp	Ala	Asn	Phe 470	Ser	Val	Asn	Gly	Gly 475	Ser	Val	Ser	Ile	Trp 480
	Val	Pro	Lys	Ile	Ser 485	Thr	Thr	Ser	Gln	Ile 490	Thr	Phe	Thr	Val	Asn 495	Asn
	Ala	Thr	Thr	Val	Trp	Gly	Gln	Asn	Val	Tyr	Val	Val	Gly	Asn	Ile	Ser

ES 2 356 703 T3

	500	505	510	
5	Gln Leu Gly Asn Trp Asp Pro Val His Ala Val Gln Met Thr Pro Ser 515 520 525			
10	Ser Tyr Pro Thr Trp Thr Val Thr Ile Pro Leu Leu Gln Gly Gln Asn 530 535 540			
15	Ile Gln Phe Lys Phe Ile Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val Ile Trp 545 550 555 560			
20	Glu Asp Ile Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ala Ala Ser Gly 565 570 575			
	Ala Tyr Thr Ala Ser Trp Asn Val Pro 580 585			
	<210> 11			
	<211> 1755			
25	<212> ADN			
	<213> AX379-CBM			
	<220>			
30	<221> CDS			
	<222> (1)..(1755)			
	<400> 11			
35				
	cac cat aat ggt acg aac ggc aca atg atg cag tac ttt gaa tgg tat 48 His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr 1 5 10 15			
40	cta cca aat gac gga aac cat tgg aat aga tta agg tct gat gca agt 96 Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser 20 25 30			
45	aac cta aaa gat aaa ggg atc tca gcg gtt tgg att cct cct gca tgg 144 Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Ser Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp 35 40 45			
50	aag ggt gcc tct caa aat gat gtg ggg tat ggt gct tat gat ctg tat 192 Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr 50 55 60			
	gat tta gga gaa ttc aat caa aaa gga acc att cgt aca aaa tat gga 240 Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly 65 70 75 80			
55	acg cgc aat cag tta caa gct gcg gtt aac gcc ttg aaa agt aat gga 288 Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Asn Ala Leu Lys Ser Asn Gly 85 90 95			
60	att caa gtg tat ggc gat gtt gta atg aat cat aaa ggg gga gca gac 336 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp 100 105 110			
	gct acc gaa atg gtt aaa gca gtc gaa gta aac ccg aat aat aga aat 384 Ala Thr Glu Met Val Lys Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn 115 120 125			
65	caa gaa gtg tcc ggt gaa tat aca att gag gct tgg aca aag ttt gac 432 Gln Glu Val Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp			

ES 2 356 703 T3

	130	135	140	
5	ttt cca gga cga ggt aat act cat tca aac ttc aaa tgg aga tgg tat Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr 145 150 155 160	480		
10	cac ttt gat gga gta gat tgg gat cag tca cgt aag ctg aac aat cga His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Lys Leu Asn Asn Arg 165 170 175	528		
15	att tat aaa ttc cgc ggt aaa ggg tgg gat tgg gaa gtc gat aca gaa Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu 180 185 190	576		
20	ttc ggt aac tat gat tac cta atg tat gca gat att gac atg gat cac Phe Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met Asp His 195 200 205	624		
25	cca gag gta gtg aat gag cta aga aat tgg ggt gtt tgg tat acg aat Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr Thr Asn 210 215 220	672		
30	aca tta ggc ctt gat ggt ttt aga ata gat gca gta aaa cat ata aaa Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His Ile Lys 225 230 235 240	720		
35	tac agc ttt act cgt gat tgg att aat cat gtt aga agt gca act ggc Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala Thr Gly 245 250 255	768		
40	aaa aat atg ttt gcg gtt gcg gaa ttt tgg aaa aat gat tta ggt gct Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu Gly Ala 260 265 270	816		
45	att gaa aac tat tta aac aaa aca aac tgg aac cat tca gtc ttt gat Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val Phe Asp 275 280 285	864		
50	gtt ccg ctg cac tat aac ctc tat aat gct tca aaa agc gga ggg aat Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly Gly Asn 290 295 300	912		
55	tat gat atg agg caa ata ttt aat ggt aca gtc gtg caa aag cat cca Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Lys His Pro 305 310 315 320	960		
60	atg cat gct gtt aca ttt gtt gat aat cat gat tcg caa cct gaa gaa Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro Glu Glu 325 330 335	1008		
65	gct tta gag tct ttt gtt gaa gaa tgg ttc aaa cca tta gcg tat gct Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala 340 345 350	1056		
70	ttg aca tta aca cgt gaa caa ggc tac cct tct gta ttt tat gga gat Leu Thr Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr Gly Asp 355 360 365	1104		
75	tat tat ggc att cca acg cat ggt gta cca gcg atg aaa tcg aaa att Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser Lys Ile 370 375 380	1152		
80	gac ccg att cta gaa gcg cgt caa aag tat gca tat gga aga caa aat Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Arg Gln Asn 385 390 400	1200		
85	gac tac tta gac cat cat aat atc atc ggt tgg aca cgt gaa ggg aat Asp Tyr Leu Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asn	1248		

ES 2 356 703 T3

	405								410					415					
5	aca Thr	gca Ala	cac His	ccc Pro 420	aac Asn	tcc Ser	ggt Gly	tta Leu	gct Ala 425	act Thr	atc Ile	atg Met	tcc Ser	gat Asp 430	ggg Gly	gca Ala	1296		
10	gga Gly	gga Gly	aat Asn 435	aag Lys	tgg Trp	atg Met	ttt Phe	gtt Val 440	ggg Gly	cgt Arg	aat Asn	aaa Lys	gct Ala 445	ggt Gly	caa Gln	gtt Val	1344		
15	tgg Trp	acc Thr 450	gat Asp	atc Ile	act Thr	gga Gly	aat Asn 455	aaa Lys	gcc Ala	ggt Gly	act Thr	gtt Val 460	acg Thr	att Ile	aat Asn	gct Ala	1392		
20	gat Asp 465	gga Gly	tgg Trp	ggt Gly	aat Asn	ttt Phe 470	tct Ser	gta Val	aat Asn	gga Gly	gga Gly 475	tca Ser	gtt Val	tct Ser	att Ile	tgg Trp 480	1440		
25	gta Val	aac Asn	aaa Lys	ata Ile	agi Ser 485	act Thr	act Thr	tcc Ser	caa Gln	ata Ile 490	aca Thr	ttt Phe	act Thr	gta Val	aat Asn 495	aac Asn	1488		
30	gcc Ala	aca Thr	acc Thr	gtt Val 500	tgg Trp	gga Gly	caa Gln	aat Asn	gta Val 505	tac Tyr	gtt Val	gtc Val	ggg Gly	aat Asn 510	att Ile	tcg Ser	1536		
35	cag Gln	ctg Leu	ggg Gly 515	aac Asn	tgg Trp	gat Asp	cca Pro	gtc Val 520	cac His	gca Ala	gtt Val	caa Gln	atg Met 525	acg Thr	ccg Pro	tct Ser	1584		
40	tct Ser	tat Tyr 530	cca Pro	aca Thr	tgg Trp	act Thr	gta Val 535	aca Thr	atc Ile	cct Pro	ctt Leu	ctt Leu 540	caa Gln	ggg Gly	caa Gln	aac Asn	1632		
45	ata Ile 545	caa Gln	ttt Phe	aaa Lys	ttt Phe	atc Ile 550	aaa Lys	aaa Lys	gat Asp	tca Ser	gct Ala 555	gga Gly	aat Asn	gtc Val	att Ile	tgg Trp 560	1680		
50	gaa Glu	gat Asp	ata Ile	tcg Ser	aat Asn 565	cga Arg	aca Thr	tac Tyr	acc Thr	gtc Val 570	cca Pro	act Thr	gct Ala	gca Ala	tcc Ser 575	gga Gly	1728		
55	gca Ala	tat Tyr	aca Thr	gcc Ala 580	agc Ser	tgg Trp	aac Asn	gtg Val	ccc Pro 585								1755		

<210> 12

<211> 585

<212> PRT

<213> AX379-CBM

<400> 12

55	His His Asn Gly Thr Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp Tyr 1 5 10 15
60	Leu Pro Asn Asp Gly Asn His Trp Asn Arg Leu Arg Ser Asp Ala Ser 20 25 30
65	Asn Leu Lys Asp Lys Gly Ile Ser Ala Val Trp Ile Pro Pro Ala Trp 35 40 45
70	Lys Gly Ala Ser Gln Asn Asp Val Gly Tyr Gly Ala Tyr Asp Leu Tyr 50 55 60

ES 2 356 703 T3

Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Ile Arg Thr Lys Tyr Gly
 65 70 75 80
 5 Thr Arg Asn Gln Leu Gln Ala Ala Val Asn Ala Leu Lys Ser Asn Gly
 85 90 95
 10 Ile Gln Val Tyr Gly Asp Val Val Met Asn His Lys Gly Gly Ala Asp
 100 105 110
 15 Ala Thr Glu Met Val Lys Ala Val Glu Val Asn Pro Asn Asn Arg Asn
 115 120 125
 Gln Glu Val Ser Gly Glu Tyr Thr Ile Glu Ala Trp Thr Lys Phe Asp
 130 135 140
 20 Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr His Ser Asn Phe Lys Trp Arg Trp Tyr
 145 150 155 160
 25 His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Gln Ser Arg Lys Leu Asn Asn Arg
 165 170 175
 30 Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Lys Gly Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu
 180 185 190
 Phe Gly Asn Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Ile Asp Met Asp His
 195 200 205
 35 Pro Glu Val Val Asn Glu Leu Arg Asn Trp Gly Val Trp Tyr Thr Asn
 210 215 220
 40 Thr Leu Gly Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Val Lys His Ile Lys
 225 230 235 240
 45 Tyr Ser Phe Thr Arg Asp Trp Ile Asn His Val Arg Ser Ala Thr Gly
 245 250 255
 Lys Asn Met Phe Ala Val Ala Glu Phe Trp Lys Asn Asp Leu Gly Ala
 260 265 270
 50 Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val Phe Asp
 275 280 285
 55 Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly Gly Asn
 290 295 300
 60 Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Lys His Pro
 305 310 315 320
 Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro Glu Glu
 325 330 335

ES 2 356 703 T3

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

ES 2 356 703 T3

	<210> 13																
	<211> 1755																
	<212> ADN																
5	<213> BAN-CBM																
	<220>																
	<221> CDS																
10	<222> (1)..(1755)																
	<400> 13																
15	gta	aat	ggc	acg	ctg	atg	cag	tat	ttt	gaa	tgg	tat	acg	ccg	aac	gac	48
	Val	Asn	Gly	Thr	Leu	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr	Thr	Pro	Asn	Asp	
	1				5					10					15		
20	ggc	cag	cat	tgg	aaa	cga	ttg	cag	aat	gat	gcg	gaa	cat	tta	tcg	gat	96
	Gly	Gln	His	Trp	Lys	Arg	Leu	Gln	Asn	Asp	Ala	Glu	His	Leu	Ser	Asp	
				20					25					30			
25	atc	gga	atc	act	gcc	gtc	tgg	att	cct	ccc	gca	tac	aaa	gga	ttg	agc	144
	Ile	Gly	Ile	Thr	Ala	Val	Trp	Ile	Pro	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gly	Leu	Ser	
			35					40					45				
30	caa	tcc	gat	aac	gga	tac	gga	cct	tat	gat	ttg	tat	gat	tta	gga	gaa	192
	Gln	Ser	Asp	Asn	Gly	Tyr	Gly	Pro	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asp	Leu	Gly	Glu	
		50					55					60					
35	ttc	cag	caa	aaa	ggg	acg	gtc	aga	acg	aaa	tac	ggc	aca	aaa	tca	gag	240
	Phe	Gln	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly	Thr	Lys	Ser	Glu	
	65				70						75					80	
40	ctt	caa	gat	gcg	atc	ggc	tca	ctg	cat	tcc	cgg	aac	gtc	caa	gta	tac	288
	Leu	Gln	Asp	Ala	Ile	Gly	Ser	Leu	His	Ser	Arg	Asn	Val	Gln	Val	Tyr	
				85						90					95		
45	gga	gat	gtg	gtt	ttg	aat	cat	aag	gct	ggt	gct	gat	gca	aca	gaa	gat	336
	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Asn	His	Lys	Ala	Gly	Ala	Asp	Ala	Thr	Glu	Asp	
				100					105					110			
50	gta	act	gcc	gtc	gaa	gtc	aat	ccg	gcc	aat	aga	aat	cag	gaa	act	tcg	384
	Val	Thr	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Ala	Asn	Arg	Asn	Gln	Glu	Thr	Ser	
			115					120					125				
55	gag	gaa	tat	caa	atc	aaa	gcg	tgg	acg	gat	ttt	cgt	ttt	ccg	ggc	cgt	432
	Glu	Glu	Tyr	Gln	Ile	Lys	Ala	Trp	Thr	Asp	Phe	Arg	Phe	Pro	Gly	Arg	
		130					135					140					
60	gga	aac	acg	tac	agt	gat	ttt	aaa	tgg	cat	tgg	tat	cat	ttc	gac	gga	480
	Gly	Asn	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	His	Trp	Tyr	His	Phe	Asp	Gly	
		145				150					155					160	
65	gcg	gac	tgg	gat	gaa	tcc	cgg	aag	atc	agc	cgc	atc	ttt	aag	ttt	cgt	528
	Ala	Asp	Trp	Asp	Glu	Ser	Arg	Lys	Ile	Ser	Arg	Ile	Phe	Lys	Phe	Arg	
					165					170					175		
70	ggg	gaa	gga	aaa	gcg	tgg	gat	tgg	gaa	gta	tca	agt	gaa	aac	ggc	aac	576
	Gly	Glu	Gly	Lys	Ala	Trp	Asp	Trp	Glu	Val	Ser	Ser	Glu	Asn	Gly	Asn	
				180					185					190			
75	tat	gac	tat	tta	atg	tat	gct	gat	gtt	gac	tac	gac	cac	cct	gat	gtc	624
	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Val	Asp	Tyr	Asp	His	Pro	Asp	Val	
			195					200					205				
80	gtg	gca	gag	aca	aaa	aaa	tgg	ggt	atc	tgg	tat	gcg	aat	gaa	ctg	tca	672
	Val	Ala	Glu	Thr	Lys	Lys	Trp	Gly	Ile	Trp	Tyr	Ala	Asn	Glu	Leu	Ser	
		210					215					220					
85	tta	gac	ggc	ttc	cgt	att	gat	gcc	gcc	aaa	cat	att	aaa	ttt	tca	ttt	720
	Leu	Asp	Gly	Phe	Arg	Ile	Asp	Ala	Ala	Lys	His	Ile	Lys	Phe	Ser	Phe	
						230					235					240	

ES 2 356 703 T3

	ctg	cgt	gat	tgg	gtt	cag	gcg	gtc	aga	cag	gcg	acg	gga	aaa	gaa	atg	768
	Leu	Arg	Asp	Trp	Val	Gln	Ala	Val	Arg	Gln	Ala	Thr	Gly	Lys	Glu	Met	
5					245					250					255		
	ttt	acg	gtt	gcg	gag	tat	tgg	cag	aat	aat	gcc	ggg	aaa	ctc	gaa	aac	816
	Phe	Thr	Val	Ala	Glu	Tyr	Trp	Gln	Asn	Asn	Ala	Gly	Lys	Leu	Glu	Asn	
				260					265					270			
10	tac	ttg	aat	aaa	aca	agc	ttt	aat	caa	tcc	gtg	ttt	gat	gtt	ccg	ctt	864
	Tyr	Leu	Asn	Lys	Thr	Ser	Phe	Asn	Gln	Ser	Val	Phe	Asp	Val	Pro	Leu	
			275					280					285				
15	cat	ttc	aat	tta	cag	gcg	gct	tcc	tca	caa	gga	ggc	gga	tat	gat	atg	912
	His	Phe	Asn	Leu	Gln	Ala	Ala	Ser	Ser	Gln	Gly	Gly	Gly	Tyr	Asp	Met	
		290					295					300					
	agg	cgt	ttg	ctg	gac	ggt	acc	gtt	gtg	tcc	agg	cat	ccg	gaa	aag	gcg	960
	Arg	Arg	Leu	Leu	Asp	Gly	Thr	Val	Val	Ser	Arg	His	Pro	Glu	Lys	Ala	
	305					310					315					320	
20	gtt	aca	ttt	gtt	gaa	aat	cat	gac	aca	cag	ccg	gga	cag	tca	ttg	gaa	1008
	Val	Thr	Phe	Val	Glu	Asn	His	Asp	Thr	Gln	Pro	Gly	Gln	Ser	Leu	Glu	
					325					330					335		
25	tcg	aca	gtc	caa	act	tgg	ttt	aaa	ccg	ctt	gca	tac	gcc	ttt	att	ttg	1056
	Ser	Thr	Val	Gln	Thr	Trp	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala	Tyr	Ala	Phe	Ile	Leu	
				340					345					350			
	aca	aga	gaa	tcc	ggt	tat	cct	cag	gtg	ttc	tat	ggg	gat	atg	tac	ggg	1104
	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Tyr	Pro	Gln	Val	Phe	Tyr	Gly	Asp	Met	Tyr	Gly	
			355					360					365				
30	aca	aaa	ggg	aca	tcg	cca	aag	gaa	att	ccc	tca	ctg	aaa	gat	aat	ata	1152
	Thr	Lys	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Glu	Ile	Pro	Ser	Leu	Lys	Asp	Asn	Ile	
		370					375					380					
35	gag	ccg	att	tta	aaa	gcg	cgt	aag	gag	tac	gca	tac	ggg	ccc	cag	cac	1200
	Glu	Pro	Ile	Leu	Lys	Ala	Arg	Lys	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Gly	Pro	Gln	His	
	385					390					395					400	
40	gat	tat	att	gac	cac	ccg	gat	gtg	atc	gga	tgg	acg	agg	gaa	ggt	gac	1248
	Asp	Tyr	Ile	Asp	His	Pro	Asp	Val	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu	Gly	Asp	
					405					410					415		
	agc	tcc	gcc	gcc	aaa	tca	ggt	ttg	gcc	gct	tta	atc	acg	gac	gga	ccc	1296
	Ser	Ser	Ala	Ala	Lys	Ser	Gly	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Thr	Asp	Gly	Pro	
				420					425					430			
45	ggc	gga	tca	aag	cgg	atg	tat	gcc	ggc	ctg	aaa	aat	gcc	ggc	gag	aca	1344
	Gly	Gly	Ser	Lys	Arg	Met	Tyr	Ala	Gly	Leu	Lys	Asn	Ala	Gly	Glu	Thr	
			435					440					445				
50	tgg	tat	gac	ata	acg	ggc	aac	cgt	tca	gat	act	gta	aaa	atc	gga	tct	1392
	Trp	Tyr	Asp	Ile	Thr	Gly	Asn	Arg	Ser	Asp	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Ser	
		450					455					460					
	gac	ggc	tgg	gga	gag	ttt	cat	gta	aac	gat	ggg	tcc	gtc	tcc	att	tat	1440
	Asp	Gly	Trp	Gly	Glu	Phe	His	Val	Asn	Asp	Gly	Ser	Val	Ser	Ile	Tyr	
	465					470					475					480	
55	gtt	cca	aaa	ata	agt	act	act	tcc	caa	ata	aca	ttt	act	gta	aat	aac	1488
	Val	Pro	Lys	Ile	Ser	Thr	Thr	Ser	Gln	Ile	Thr	Phe	Thr	Val	Asn	Asn	
					485					490					495		
60	gcc	aca	acc	gtt	tgg	gga	caa	aat	gta	tac	gtt	gtc	ggg	aat	att	tcg	1536
	Ala	Thr	Thr	Val	Trp	Gly	Gln	Asn	Val	Tyr	Val	Val	Gly	Asn	Ile	Ser	
				500					505					510			
65																	

ES 2 356 703 T3

	cag	ctg	ggg	aac	tgg	gat	cca	gtc	cac	gca	gtt	caa	atg	acg	ccg	tct	1584
	Gln	Leu	Gly	Asn	Trp	Asp	Pro	Val	His	Ala	Val	Gln	Met	Thr	Pro	Ser	
			515					520					525				
5	tct	tat	cca	aca	tgg	act	gta	aca	atc	cct	ctt	ctt	caa	ggg	caa	aac	1632
	Ser	Tyr	Pro	Thr	Trp	Thr	Val	Thr	Ile	Pro	Leu	Leu	Gln	Gly	Gln	Asn	
			530				535					540					
10	ata	caa	ttt	aaa	ttt	atc	aaa	aaa	gat	tca	gct	gga	aat	gtc	att	tgg	1680
	Ile	Gln	Phe	Lys	Phe	Ile	Lys	Lys	Asp	Ser	Ala	Gly	Asn	Val	Ile	Trp	
	545					550					555					560	
	gaa	gat	ata	tcg	aat	cga	aca	tac	acc	gtc	cca	act	gct	gca	tcc	gga	1728
	Glu	Asp	Ile	Ser	Asn	Arg	Thr	Tyr	Thr	Val	Pro	Thr	Ala	Ala	Ser	Gly	
					565					570					575		
15	gca	tat	aca	gcc	agc	tgg	aac	gtg	ccc								1755
	Ala	Tyr	Thr	Ala	Ser	Trp	Asn	Val	Pro								
				580					585								

<210> 14

20 <211> 585

<212> PRT

<213> BAN-CBM

25 <400> 14

	Val	Asn	Gly	Thr	Leu	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	Tyr	Thr	Pro	Asn	Asp	
	1				5					10					15		
30	Gly	Gln	His	Trp	Lys	Arg	Leu	Gln	Asn	Asp	Ala	Glu	His	Leu	Ser	Asp	
				20					25					30			
35	Ile	Gly	Ile	Thr	Ala	Val	Trp	Ile	Pro	Pro	Ala	Tyr	Lys	Gly	Leu	Ser	
			35					40					45				
40	Gln	Ser	Asp	Asn	Gly	Tyr	Gly	Pro	Tyr	Asp	Leu	Tyr	Asp	Leu	Gly	Glu	
		50					55					60					
45	Phe	Gln	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	Gly	Thr	Lys	Ser	Glu	
	65					70					75					80	
	Leu	Gln	Asp	Ala	Ile	Gly	Ser	Leu	His	Ser	Arg	Asn	Val	Gln	Val	Tyr	
					85					90					95		
50	Gly	Asp	Val	Val	Leu	Asn	His	Lys	Ala	Gly	Ala	Asp	Ala	Thr	Glu	Asp	
				100					105					110			
55	Val	Thr	Ala	Val	Glu	Val	Asn	Pro	Ala	Asn	Arg	Asn	Gln	Glu	Thr	Ser	
			115					120					125				
60	Glu	Glu	Tyr	Gln	Ile	Lys	Ala	Trp	Thr	Asp	Phe	Arg	Phe	Pro	Gly	Arg	
		130					135					140					
65	Gly	Asn	Thr	Tyr	Ser	Asp	Phe	Lys	Trp	His	Trp	Tyr	His	Phe	Asp	Gly	
	145					150					155					160	

ES 2 356 703 T3

Ala Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Ile Ser Arg Ile Phe Lys Phe Arg
 165 170 175
 5
 Gly Glu Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Ser Ser Glu Asn Gly Asn
 180 185 190
 10
 Tyr Asp Tyr Leu Met Tyr Ala Asp Val Asp Tyr Asp His Pro Asp Val
 195 200 205
 15
 Val Ala Glu Thr Lys Lys Trp Gly Ile Trp Tyr Ala Asn Glu Leu Ser
 210 215 220
 Leu Asp Gly Phe Arg Ile Asp Ala Ala Lys His Ile Lys Phe Ser Phe
 225 230 235 240
 20
 Leu Arg Asp Trp Val Gln Ala Val Arg Gln Ala Thr Gly Lys Glu Met
 245 250 255
 25
 Phe Thr Val Ala Glu Tyr Trp Gln Asn Asn Ala Gly Lys Leu Glu Asn
 260 265 270
 Tyr Leu Asn Lys Thr Ser Phe Asn Gln Ser Val Phe Asp Val Pro Leu
 275 280 285
 30
 His Phe Asn Leu Gln Ala Ala Ser Ser Gln Gly Gly Gly Tyr Asp Met
 290 295 300
 35
 Arg Arg Leu Leu Asp Gly Thr Val Val Ser Arg His Pro Glu Lys Ala
 305 310 315 320
 40
 Val Thr Phe Val Glu Asn His Asp Thr Gln Pro Gly Gln Ser Leu Glu
 325 330 335
 Ser Thr Val Gln Thr Trp Phe Lys Pro Leu Ala Tyr Ala Phe Ile Leu
 340 345 350
 45
 Thr Arg Glu Ser Gly Tyr Pro Gln Val Phe Tyr Gly Asp Met Tyr Gly
 355 360 365
 50
 Thr Lys Gly Thr Ser Pro Lys Glu Ile Pro Ser Leu Lys Asp Asn Ile
 370 375 380
 55
 Glu Pro Ile Leu Lys Ala Arg Lys Glu Tyr Ala Tyr Gly Pro Gln His
 385 390 395 400
 Asp Tyr Ile Asp His Pro Asp Val Ile Gly Trp Thr Arg Glu Gly Asp
 405 410 415
 60
 Ser Ser Ala Ala Lys Ser Gly Leu Ala Ala Leu Ile Thr Asp Gly Pro
 420 425 430
 65

ES 2 356 703 T3

Gly Gly Ser Lys Arg Met Tyr Ala Gly Leu Lys Asn Ala Gly Glu Thr
 435 440 445
 5 Trp Tyr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ser Asp Thr Val Lys Ile Gly Ser
 450 455 460
 10 Asp Gly Trp Gly Glu Phe His Val Asn Asp Gly Ser Val Ser Ile Tyr
 465 470 475 480
 15 Val Pro Lys Ile Ser Thr Thr Ser Gln Ile Thr Phe Thr Val Asn Asn
 485 490 495
 20 Ala Thr Thr Val Trp Gly Gln Asn Val Tyr Val Val Gly Asn Ile Ser
 500 505 510
 25 Gln Leu Gly Asn Trp Asp Pro Val His Ala Val Gln Met Thr Pro Ser
 515 520 525
 30 Ser Tyr Pro Thr Trp Thr Val Thr Ile Pro Leu Leu Gln Gly Gln Asn
 530 535 540
 35 Ile Gln Phe Lys Phe Ile Lys Lys Asp Ser Ala Gly Asn Val Ile Trp
 545 550 555 560
 40 Glu Asp Ile Ser Asn Arg Thr Tyr Thr Val Pro Thr Ala Ala Ser Gly
 565 570 575
 45 Ala Tyr Thr Ala Ser Trp Asn Val Pro
 580 585
 50 <210> 15
 <211> 87
 <212> ADN
 45 <213> *Bacillus licheniformis*
 <220>
 <221> CDS
 50 <222> (1)..(87)
 <400> 15
 55 atg aaa caa caa aaa cgg ctt tac gcc cga ttg ctg acg ctg tta ttt 48
 Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe
 1 5 10 15
 gcg ctc atc ttc ttg ctg cct cat tct gca gcc gcg gca 87
 Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ala Ala
 20 25
 60 <210> 16
 <211> 29
 65 <212> PRT
 <213> *Bacillus licheniformis*

ES 2 356 703 T3

<400> 16

Met Lys Gln Gln Lys Arg Leu Tyr Ala Arg Leu Leu Thr Leu Leu Phe
1 5 10 15

Ala Leu Ile Phe Leu Leu Pro His Ser Ala Ala Ala Ala
20 25

<210> 17

<211> 1758

<212> ADN

<213> BSG(AB)-CBM

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1758)

<400> 17

gca ccg ttt aac ggc ttt aac ggc acc atg atg cag tat ttt gaa tgg 48
Ala Pro Phe Asn Gly Phe Asn Gly Thr Met Met Gln Tyr Phe Glu Trp
1 5 10 15

tac ttg ccg gat gat ggc acg tta tgg acc aaa gtg gcc aat gaa gcc 96
Tyr Leu Pro Asp Asp Gly Thr Leu Trp Thr Lys Val Ala Asn Glu Ala
20 25 30

aac aac tta tcc agc ctt ggc atc acc gct ctt tgg ctg ccg ccc gct 144
Asn Asn Leu Ser Ser Leu Gly Ile Thr Ala Leu Trp Leu Pro Pro Ala
35 40 45

tac aaa gga aca agc cgc agc gac gta ggg tac gga gta tac gac ttg 192
Tyr Lys Gly Thr Ser Arg Ser Asp Val Gly Tyr Gly Val Tyr Asp Leu
50 55 60

tat gac ctc ggc gaa ttc aat caa aaa ggg acc gtc cgc aca aaa tac 240
Tyr Asp Leu Gly Glu Phe Asn Gln Lys Gly Thr Val Arg Thr Lys Tyr
65 70 75 80

gga aca aaa gct caa tat ctt caa gcc att caa gcc gcc cac gcc gct 288
Gly Thr Lys Ala Gln Tyr Leu Gln Ala Ile Gln Ala Ala His Ala Ala
85 90 95

gga atg caa gtg tac gcc gat gtc gtg ttc gac cat aaa ggc ggc gct 336
Gly Met Gln Val Tyr Ala Asp Val Val Phe Asp His Lys Gly Gly Ala
100 105 110

gac ggc acg gaa tgg gtg gac gcc gtc gaa gtc aat ccg tcc gac cgc 384
Asp Gly Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg
115 120 125

aac caa gaa atc tcg ggc acc tat caa atc caa gca tgg acg aaa ttt 432
Asn Gln Glu Ile Ser Gly Thr Tyr Gln Ile Gln Ala Trp Thr Lys Phe
130 135 140

gat ttt ccc ggg cgg ggc aac acc tac tcc agc ttt aag tgg cgc tgg 480
Asp Phe Pro Gly Arg Gly Asn Thr Tyr Ser Ser Phe Lys Trp Arg Trp
145 150 155 160

tac cat ttt gac ggc gtt gat tgg gac gaa agc cga aaa ttg agc cgc 528
Tyr His Phe Asp Gly Val Asp Trp Asp Glu Ser Arg Lys Leu Ser Arg
165 170 175

att tac aaa ttc cgt ggc aag gct tgg gat tgg gaa gta gac acg gaa 576
Ile Tyr Lys Phe Arg Gly Lys Ala Trp Asp Trp Glu Val Asp Thr Glu
180 185 190

ttc gga aac tat gac tac tta atg tat gcc gac ctt gat atg gat cat 624

ES 2 356 703 T3

	Phe	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Met	Tyr	Ala	Asp	Leu	Asp	Met	Asp	His	
			195					200					205				
5	ccc Pro	gaa Glu	gtc Val	gtg Val	acc Thr	gag Glu	ctg Leu	aaa Lys	aac Asn	tgg Trp	ggg Gly	aaa Lys	tgg Trp	tat Tyr	gtc Val	aac Asn	672
	210						215					220					
10	aca Thr	acg Thr	aac Asn	att Ile	gat Asp	ggg Gly	ttc Phe	cgg Arg	ctt Leu	gat Asp	gcc Ala	gtc Val	aag Lys	cat His	att Ile	aag Lys	720
	225					230					235					240	
	ttc Phe	agt Ser	ttt Phe	ttt Phe	cct Pro	gat Asp	tgg Trp	ttg Leu	tcg Ser	tat Tyr	gtg Val	cgt Arg	tct Ser	cag Gln	act Thr	ggc Gly	768
					245					250					255		
15	aag Lys	ccg Pro	cta Leu	ttt Phe	acc Thr	gtc Val	ggg Gly	gaa Glu	tat Tyr	tgg Trp	agc Ser	tat Tyr	gac Asp	atc Ile	aac Asn	aag Lys	816
				260					265					270			
20	ttg Leu	cac His	aat Asn	tac Tyr	att Ile	acg Thr	aaa Lys	aca Thr	gac Asp	gga Gly	acg Thr	atg Met	tct Ser	ttg Leu	ttt Phe	gat Asp	864
			275					280					285				
	gcc Ala	ccg Pro	tta Leu	cac His	aac Asn	aaa Lys	ttt Phe	tat Tyr	acc Thr	gct Ala	tcc Ser	aaa Lys	tca Ser	ggg Gly	ggc Gly	gca Ala	912
	290						295					300					
25	ttt Phe	gat Asp	atg Met	cgc Arg	acg Thr	tta Leu	atg Met	acc Thr	aat Asn	act Thr	ctc Leu	atg Met	aaa Lys	gat Asp	caa Gln	ccg Pro	960
	305					310					315					320	
30	aca Thr	ttg Leu	gcc Ala	gtc Val	acc Thr	ttc Phe	gtt Val	gat Asp	aat Asn	cat His	gac Asp	acc Thr	gaa Glu	ccc Pro	ggc Gly	caa Gln	1008
					325					330					335		
	gcg Ala	ctg Leu	caa Gln	tca Ser	tgg Trp	gtc Val	gac Asp	cca Pro	tgg Trp	ttc Phe	aaa Lys	ccg Pro	ttg Leu	gct Ala	tac Tyr	gcc Ala	1056
35				340					345					350			
	ttt Phe	att Ile	cta Leu	act Thr	cgg Arg	cag Gln	gaa Glu	gga Gly	tac Tyr	ccg Pro	tgc Cys	gtc Val	ttt Phe	tat Tyr	ggt Gly	gac Asp	1104
			355					360					365				
40	tat Tyr	tat Tyr	ggc Gly	att Ile	cca Pro	caa Gln	tat Tyr	aac Asn	att Ile	cct Pro	tcg Ser	ctg Leu	aaa Lys	agc Ser	aaa Lys	atc Ile	1152
	370						375					380					
45	gat Asp	ccg Pro	ctc Leu	ctc Leu	atc Ile	gcg Ala	cgc Arg	agg Arg	gat Asp	tat Tyr	gct Ala	tac Tyr	gga Gly	aca Thr	cag Gln	cac His	1200
	385					390					395					400	
	gac Asp	tat Tyr	att Ile	gac Asp	agt Ser	gcg Ala	gat Asp	att Ile	atc Ile	ggt Gly	tgg Trp	acg Thr	cgg Arg	gaa Glu	gga Gly	gtg Val	1248
50					405					410					415		
	gct Ala	gaa Glu	aaa Lys	gca Ala	aat Asn	tca Ser	gga Gly	ctg Leu	gct Ala	gca Ala	ctc Leu	att Ile	acc Thr	gac Asp	ggg Gly	cct Pro	1296
				420					425					430			
55	ggc Gly	gga Gly	agc Ser	aaa Lys	tgg Trp	atg Met	tat Tyr	gtt Val	gga Gly	aaa Lys	caa Gln	cac His	gct Ala	ggc Gly	aaa Lys	acg Thr	1344
			435					440					445				
60	ttt Phe	tat Tyr	gat Asp	tta Leu	acc Thr	ggc Gly	aat Asn	cga Arg	agt Ser	gat Asp	aca Thr	gtg Val	aca Thr	atc Ile	aat Asn	gct Ala	1392
	450						455					460					
	gat Gly	gga Gly	tgg Gly	gga Gly	gaa Gly	ttt Gly	aaa Gly	gtc Gly	aat Gly	gga Gly	ggg Gly	tct Gly	gta Gly	tcc Gly	ata Gly	tgg Gly	1440

ES 2 356 703 T3

	Asp	Gly	Trp	Gly	Glu	Phe	Lys	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Ile	Trp	
	465					470				475						480	
5	ggt	cca	aaa	ata	agt	act	act	tcc	caa	ata	aca	ttt	act	gta	aat	aac	1488
	Val	Pro	Lys	Ile	Ser	Thr	Thr	Ser	Gln	Ile	Thr	Phe	Thr	Val	Asn	Asn	
					485					490					495		
10	gcc	aca	acc	ggt	tgg	gga	caa	aat	gta	tac	ggt	gtc	ggg	aat	att	tcg	1536
	Ala	Thr	Thr	Val	Trp	Gly	Gln	Asn	Val	Tyr	Val	Val	Gly	Asn	Ile	Ser	
				500					505					510			
15	cag	ctg	ggg	aac	tgg	gat	cca	gtc	cac	gca	ggt	caa	atg	acg	ccg	tct	1584
	Gln	Leu	Gly	Asn	Trp	Asp	Pro	Val	His	Ala	Val	Gln	Met	Thr	Pro	Ser	
			515					520					525				
20	tct	tat	cca	aca	tgg	act	gta	aca	atc	cct	ctt	ctt	caa	ggg	caa	aac	1632
	Ser	Tyr	Pro	Thr	Trp	Thr	Val	Thr	Ile	Pro	Leu	Leu	Gln	Gly	Gln	Asn	
		530					535					540					
25	ata	caa	ttt	aaa	ttt	atc	aaa	aaa	gat	tca	gct	gga	aat	gtc	att	tgg	1680
	Ile	Gln	Phe	Lys	Phe	Ile	Lys	Lys	Asp	Ser	Ala	Gly	Asn	Val	Ile	Trp	
	545				550						555					560	
30	gaa	gat	ata	tcg	aat	cga	aca	tac	acc	gtc	cca	act	gct	gca	tcc	gga	1728
	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Arg	Thr	Tyr	Thr	Val	Pro	Thr	Ala	Ala	Ser	Gly	
				565						570					575		
35	gca	tat	aca	gcc	agc	tgg	aac	gtg	ccc	tag							1758
	Ala	Tyr	Thr	Ala	Ser	Trp	Asn	Val	Pro								
				580				585									
40	<210> 18																
	<211> 585																
	<212> PRT																
	<213> BSG(AB)-CBM																
45	<400> 18																
50	Ala	Pro	Phe	Asn	Gly	Phe	Asn	Gly	Thr	Met	Met	Gln	Tyr	Phe	Glu	Trp	
	1			5						10					15		
55	Tyr	Leu	Pro	Asp	Asp	Gly	Thr	Leu	Trp	Thr	Lys	Val	Ala	Asn	Glu	Ala	
				20					25					30			
60	Asn	Asn	Leu	Ser	Ser	Leu	Gly	Ile	Thr	Ala	Leu	Trp	Leu	Pro	Pro	Ala	
			35				40						45				
65	Tyr	Lys	Gly	Thr	Ser	Arg	Ser	Asp	Val	Gly	Tyr	Gly	Val	Tyr	Asp	Leu	
	50						55					60					
70	Tyr	Asp	Leu	Gly	Glu	Phe	Asn	Gln	Lys	Gly	Thr	Val	Arg	Thr	Lys	Tyr	
	65					70					75				80		
75	Gly	Thr	Lys	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Ala	Ile	Gln	Ala	Ala	His	Ala	Ala	
				85					90					95			
80	Gly	Met	Gln	Val	Tyr	Ala	Asp	Val	Val	Phe	Asp	His	Lys	Gly	Gly	Ala	
			100						105					110			
85	Asp Gly Thr Glu Trp Val Asp Ala Val Glu Val Asn Pro Ser Asp Arg																

ES 2 356 703 T3

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

ES 2 356 703 T3

	385		390		395		400									
5	Asp	Tyr	Ile	Asp	Ser	Ala	Asp	Ile	Ile	Gly	Trp	Thr	Arg	Glu	Gly	Val
					405					410					415	
10	Ala	Glu	Lys	Ala	Asn	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	Thr
			435					440					445			
20	Phe	Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly	Asn	Arg	Ser	Asp	Thr	Val	Thr	Ile	Asn	Ala
	450						455					460				
25	Asp	Gly	Trp	Gly	Glu	Phe	Lys	Val	Asn	Gly	Gly	Ser	Val	Ser	Ile	Trp
	465					470					475					480
30	Val	Pro	Lys	Ile	Ser	Thr	Thr	Ser	Gln	Ile	Thr	Phe	Thr	Val	Asn	Asn
					485					490					495	
35	Ala	Thr	Thr	Val	Trp	Gly	Gln	Asn	Val	Tyr	Val	Val	Gly	Asn	Ile	Ser
				500					505					510		
40	Gln	Leu	Gly	Asn	Trp	Asp	Pro	Val	His	Ala	Val	Gln	Met	Thr	Pro	Ser
			515					520					525			
45	Ser	Tyr	Pro	Thr	Trp	Thr	Val	Thr	Ile	Pro	Leu	Leu	Gln	Gly	Gln	Asn
	530						535					540				
50	Ile	Gln	Phe	Lys	Phe	Ile	Lys	Lys	Asp	Ser	Ala	Gly	Asn	Val	Ile	Trp
	545					550					555					560
55	Glu	Asp	Ile	Ser	Asn	Arg	Thr	Tyr	Thr	Val	Pro	Thr	Ala	Ala	Ser	Gly
					565					570					575	
60	Ala	Tyr	Thr	Ala	Ser	Trp	Asn	Val	Pro							
				580					585							

<210> 19

<211> 40

<212> ADN

<213> artificial

<220>

<223> cebador

<220>

<221> misc feature

<222> (1)..(40)

ES 2 356 703 T3

	<400> 19	
	ctcattctgc gcaaattcta agccgcggca atgggacgct	40
5	<210> 20	
	<211> 40	
	<212> ADN	
10	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
15	<220>	
	<221> misc feature	
	<222> (1)..(40)	
20	<400> 20	
	atttggaag tagtacttat taaattgaaa tcttgaaca	40
25	<210> 21	
	<211> 40	
	<212> ADN	
30	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
35	<220>	
	<221> mise feature	
	<222> (1)..(40)	
40	<400> 21	
	ctcattctgc cgctgatgca gtaaatggca agccgcggca	40
45	<210> 22	
	<211> 40	
	<212> ADN	
50	<213> artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
55	<220>	
	<221> misc feature	
60	<222> (1)..(40)	
	<400> 22	
	atttggaag tagtacttat taaattgaaa ttttgaaca	40
65	<210> 23	

ES 2 356 703 T3

	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
5	<220>	
	<223> cebador	
10	<220>	
	<221> misc feature	
	<222> (1)..(40)	
15	<400> 23	
	ctcattctgc acggctttaa gcaccgttta agccgcggca	40
20	<210> 24	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
25	<220>	
	<223> cebador	
30	<220>	
	<221> misc feature	
	<222> (1)..(40)	
35	<400> 24	
	atttgggaag tagtacttat ttaggaacc caaaccgaaa	40
40	<210> 25	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
45	<220>	
	<223> cebador	
50	<220>	
	<221> misc feature	
	<222> (1)..(40)	
55	<400> 25	
	ctcattctgc agccgcggca catcataatg ggacaaatgg	40
60	<210> 26	
	<211> 40	
	<212> ADN	
65	<213> artificial	
	<220>	

ES 2 356 703 T3

	<223> cebador	
	<220>	
5	<221> misc feature	
	<222> (1)..(40)	
	<400> 26	
10	atttggaag tagtacttat ccattgtcc cattatgatg	40
	<210> 27	
15	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
20	<220>	
	<223> cebador	
	<220>	
25	<221> misc feature	
	<222> (1)..(40)	
	<400> 27	
30	ctcattctgc agccgcggca caccataatg gtacgaacgg	40
	<210> 28	
35	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
40	<220>	
	<223> cebador	
	<220>	
45	<221> misc feature	
	<222> (1)..(40)	
	<400> 28	
50	atttggaag tagtacttat ttgtttacc caaatagaaa	40
	<210> 29	
55	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> artificial	
60	<220>	
	<223> cebador	
	<220>	
65	<221> misc feature	
	<222> (1)..(40)	

ES 2 356 703 T3

<400> 29

ctcattctgc cgctgatgca gtaaattggca agccgcggca

40

5

<210> 30

<211> 40

<212> ADN

10 <213> artificial

<220>

<223> cebador

15

<220>

<221> misc feature

<222> (1)..(40)

20

<400> 30

atttggaag tagtacttat taaatggaga ttttgaaca

40

25

<210> 31

<211> 40

<212> ADN

30 <213> artificial

<220>

<223> cebador

35

<220>

<221> misc feature

<222> (1)..(40)

40

<400> 31

ctcattctgc acggctttaa gcaccgttta agccgcggca

40

45

<210> 32

<211> 40

<212> ADN

50 <213> artificial

<220>

<223> cebador

55

<220>

<221> misc feature

<222> (1)..(40)

60

<400> 32

atatagtcgt gctgtgttcc gtaagcataa tccctgcgcg

40

65

<210> 33

ES 2 356 703 T3

<211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 10 <220>
 <221> misc feature
 <222> (1)..(22)
 15 <400> 33
 ctgcatcagg gctgcggcat cc 22
 20 <210> 34
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> artificial
 25 <220>
 <223> cebador
 30 <220>
 <221> misc feature
 <222> (1)..(22)
 35 <400> 34
 ctgcatcagg gctgcggcat cc 22
 40 <210> 35
 <211> 483
 <212> PRT
 45 <213> BLA it *B. licheniformis*
 <220>
 <221> mat peptide
 50 <222> (1)..(483)
 <400> 35
 55 **A**la **A**sn **L**eu **A**sn **G**ly **T**hr **L**eu **M**et **G**ln **T**yr **P**he **G**lu **T**rp **T**yr **M**et **P**ro
 1 5 10 15
 60 **A**sn **A**sp **G**ly **G**ln **H**is **T**rp **A**rg **A**rg **L**eu **G**ln **A**sn **A**sp **S**er **A**la **T**yr **L**eu
 65

ES 2 356 703 T3

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

ES 2 356 703 T3

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

Val Gln Arg

50 <210> 36
<211> 514
<212> PRT
<213> BSG *B. stearothermophilus*

55 <220>
<221> malt peptide
<222> (1)..(514)

60 <400> 36

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

ES 2 356 703 T3

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

ES 2 356 703 T3

	290		295		300											
5	Phe 305	Asp	Met	Arg	Thr	Leu 310	Met	Thr	Asn	Thr	Leu 315	Met	Lys	Asp	Gln	Pro 320
10	Thr	Leu	Ala	Val	Thr 325	Phe	Val	Asp	Asn	His 330	Asp	Thr	Glu	Pro	Gly 335	Gln
15	Ala	Leu	Gln	Ser 340	Trp	Val	Asp	Pro	Trp 345	Phe	Lys	Pro	Leu	Ala 350	Tyr	Ala
20	Phe	Ile	Leu 355	Thr	Arg	Gln	Glu	Gly 360	Tyr	Pro	Cys	Val	Phe 365	Tyr	Gly	Asp
25	Tyr	Tyr 370	Gly	Ile	Pro	Gln	Tyr 375	Asn	Ile	Pro	Ser	Leu 380	Lys	Ser	Lys	Ile
30	Asp 385	Pro	Leu	Leu	Ile	Ala 390	Arg	Arg	Asp	Tyr	Ala 395	Tyr	Gly	Thr	Gln	His 400
35	Asp	Tyr	Leu	Asp	His 405	Ser	Asp	Ile	Ile	Gly 410	Trp	Thr	Arg	Glu	Gly 415	Gly
40	Thr	Glu	Lys	Pro 420	Gly	Ser	Gly	Leu	Ala 425	Ala	Leu	Ile	Thr	Asp 430	Gly	Pro
45	Gly	Gly	Ser 435	Lys	Trp	Met	Tyr	Val 440	Gly	Lys	Gln	His	Ala 445	Gly	Lys	Val
50	Phe	Tyr 450	Asp	Leu	Thr	Gly	Asn 455	Arg	Ser	Asp	Thr	Val 460	Thr	Ile	Asn	Ser
55	Asp 465	Gly	Trp	Gly	Glu	Phe 470	Lys	Val	Asn	Gly	Gly 475	Ser	Val	Ser	Val	Trp 480
60	Val	Pro	Arg	Lys	Thr 485	Thr	Val	Ser	Thr	Ile 490	Ala	Arg	Pro	Ile	Thr 495	Thr
65	Arg	Pro	Trp	Thr 500	Gly	Glu	Phe	Val	Arg 505	Trp	Thr	Glu	Pro	Arg 510	Leu	Val
	Ala	Trp														
	<210> 37															
	<211> 482															
	<212> PRT															
	<213> BAN <i>B. amiloliquefacience</i>															

ES 2 356 703 T3

<220>

<221> mat peptide

<222> (1)..(482)

5

<400> 37

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

ES 2 356 703 T3

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

<210> 38

<211> 485

<212> PRT

<213> SP722 *bacillus* sp.

<220>

<221> mat peptide

<222> (1)..(485)

ES 2 356 703 T3

<400> 38

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

ES 2 356 703 T3

	260	265	270
5	Gly Ala Leu Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val	275	280
10	Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Asn Ser Gly	290	300
15	Gly Asn Tyr Asp Met Ala Lys Leu Leu Asn Gly Thr Val Val Gln Lys	305	310
20	His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro	325	330
25	Gly Glu Ser Leu Glu Ser Phe Val Gln Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala	340	350
30	Tyr Ala Leu Ile Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr	355	360
35	Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Ser Val Pro Ala Met Lys Ala	370	380
40	Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Asn Phe Ala Tyr Gly Thr	385	390
45	Gln His Asp Tyr Phe Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu	405	410
50	Gly Asn Thr Thr His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp	420	430
55	Gly Pro Gly Gly Glu Lys Trp Met Tyr Val Gly Gln Asn Lys Ala Gly	435	440
	Gln Val Trp His Asp Ile Thr Gly Asn Lys Pro Gly Thr Val Thr Ile	450	460
	Asn Ala Asp Gly Trp Ala Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser	465	470
	Ile Trp Val Lys Arg	485	

<210> 39

<211> 485

60 <212> PRT

<213> SP690 *bacillus* sp.

<220>

65 <221> mat peptide

<222> (1)..(485)

ES 2 356 703 T3

<400> 39

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

ES 2 356 703 T3

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

<210> 40

<211> 485

<212> PRT

<213> AA560 *bacillus* sp.

<220>

<221> mat peptide

<222> (1)..(485)

ES 2 356 703 T3

<400> 40

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

ES 2 356 703 T3

	260	265	270
5	Gly Ala Ile Glu Asn Tyr Leu Asn Lys Thr Asn Trp Asn His Ser Val	275	280
10	Phe Asp Val Pro Leu His Tyr Asn Leu Tyr Asn Ala Ser Lys Ser Gly	290	300
15	Gly Asn Tyr Asp Met Arg Gln Ile Phe Asn Gly Thr Val Val Gln Arg	305	310
20	His Pro Met His Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ser Gln Pro	325	330
25	Glu Glu Ala Leu Glu Ser Phe Val Glu Glu Trp Phe Lys Pro Leu Ala	340	345
30	Tyr Ala Leu Thr Leu Thr Arg Glu Gln Gly Tyr Pro Ser Val Phe Tyr	355	360
35	Gly Asp Tyr Tyr Gly Ile Pro Thr His Gly Val Pro Ala Met Lys Ser	370	375
40	Lys Ile Asp Pro Ile Leu Glu Ala Arg Gln Lys Tyr Ala Tyr Gly Arg	385	390
45	Gln Asn Asp Tyr Leu Asp His His Asn Ile Ile Gly Trp Thr Arg Glu	405	410
50	Gly Asn Thr Ala His Pro Asn Ser Gly Leu Ala Thr Ile Met Ser Asp	420	425
55	Gly Ala Gly Gly Asn Lys Trp Met Phe Val Gly Arg Asn Lys Ala Gly	435	440
60	Gln Val Trp Thr Asp Ile Thr Gly Asn Arg Ala Gly Thr Val Thr Ile	450	455
65	Asn Ala Asp Gly Trp Gly Asn Phe Ser Val Asn Gly Gly Ser Val Ser	465	470
	Ile Trp Val Asn Lys	475	480
		485	

<210> 41

<211> 481

<212> PRT

<213> LE429 *B. lich.* variante

<220>

<221> mat peptide

<222> (1)..(481)

ES 2 356 703 T3

<400> 41

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

ES 2 356 703 T3

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

<210> 42

<211> 417

<212> PRT

<213> *Pseudomonas saccharofila*

<220>

<221> mat peptide

<222> (1)..(417)

ES 2 356 703 T3

<400> 42

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

ES 2 356 703 T3

	260		265		270
5	Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr	275	280	285	
10	Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly	290	295	300	
15	Gln His His Trp Ala Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala	305	310	315	320
20	Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Ser His Met	325	330	335	
25	Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg	340	345	350	
30	Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly	355	360	365	
35	Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val	370	375	380	
40	Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly	385	390	395	400
45	Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp	405	410	415	
50	Arg				